

Aus der Klinik für Augenheilkunde
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ. Prof. Dr. med. Gerd Geerling

Evaluation von regenerationsassoziierten Faktoren der kornealen Nervenregeneration

Dissertation

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

vorgelegt von
Cosima Rose
(2022)

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

Gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. Dr. Stefan Schrader

Zweitgutachterin: Prof. Dr. Charlotte von Gall

Meiner geliebten Familie gewidmet

Veröffentlichungen

Im Zuge dieser Arbeit ist die folgende Publikation entstanden:

Mertsch S, Neumann I, Rose C, Schargus M, Geerling G, Schrader S.

The effect of Rho Kinase inhibition on corneal nerve regeneration in vitro and in vivo.

Ocul Surf. 2021 Oct; 22:213-223. doi: 10.1016/j.jtos.2021.08.011. Epub 2021 Aug 19.

PMID: 344196 [1]

Das Projekt wurde auf folgenden Konferenzen und Kongressen vorgestellt:

1. Cosima Rose, Gerd Geerling, Stefan Schrader, Sonja Mertsch

„Evaluation der Effekte von STAT3-Inhibitor und Rho Kinase Inhibitor auf die korneale Nervenregeneration“ – Posterpräsentation im Rahmen des DOG Jahreskongresses 2018 in Bonn

2. Cosima Rose, Sonja Mertsch

„Evaluation von Faktoren der kornealen Nervenregeneration in vitro und in vivo unter Nutzung neuartiger 3D Modelle basierend auf biologischen Materialien für die Augenoberflächenrekonstruktion“ - Projektvorstellung im Rahmen des Sicca-Förderpreis 2017 des Ressorts Trockenes Auge und Oberflächenerkrankungen im Berufsverband der Augenärzte Deutschlands (BVA) gestiftet von der Firma Bausch + Lomb, 28. September 2017, 115. Jahrestagung der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft (DOG), Berlin

3. Sonja Mertsch, Cosima Rose, Gerd Geerling and Stefan Schrader

“Analysis of the Influence of a Rho Kinase Inhibitor on Corneal Nerve Regeneration Using Novel 3D In Vitro Models”- Cornea and Ocular Surface Biology and Pathology (GRS) Gordon Research Seminar Ventura 17.-18.2.2018 (Vortrag)

4. Sonja Mertsch, Cosima Rose, Gerd Geerling and Stefan Schrader

“Analysis of the Influence of a Rho Kinase Inhibitor on Corneal Nerve Regeneration Using Novel 3D In Vitro Models” Cornea and Ocular Surface Biology and Pathology Gordon Research Conference Ventura, 18.-23.2.2018 (Poster)

5. Mertsch S, Rose C, Schrader S, Geerling G

„Korneale Nervenregeneration im 3D-Modell – Ein Weg neue Medikamente zu testen?“ - RWA 2018 Düsseldorf 26.01.2018 (Vortrag)

6. Mertsch S, Rose C, Geerling G, Schrader S,

„Untersuchung der Funktion des Rho Kinase Inhibitors Y27632 in einem neuen 3D Modell zur Analyse der kornealen Nervenregeneration“ 28.9. – 01.10.2017, 115. Jahrestagung der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft (DOG) 2017 Berlin (Poster)

Zusammenfassung

Die Neurotrophe Keratopathie (NK) ist eine degenerative Hornhauterkrankung, bei der es durch Schädigung der kornealen Innervation zum Verlust der trophischen und sensorischen Funktion der Kornea und damit zu erheblichen Störungen der Integrität der Augenoberfläche kommen kann. Ursächlich werden virale Infektionen, chirurgische Eingriffe und Systemerkrankungen diskutiert. Seit wenigen Jahren besteht die einzige Möglichkeit einer kausalen Behandlung der NK mit dem rekombinanten Nervenwachstumsfaktor NGF, welche allerdings sehr kostenintensiv und nicht für jeden Patienten geeignet ist. Das Therapiespektrum ist generell begrenzt und die Behandlungsoptionen zielen derzeit eher auf die symptomatische als auf die kausale Therapie der Erkrankung ab.

Ziel dieser Arbeit war es daher, weitere neue regenerationsassoziierte Faktoren für die korneale Nervenregeneration zu identifizieren. In einem 2D *in vitro* Modell wurden die Einflüsse verschiedener Substanzen auf Vitalität, Faserwachstum, Faserverzweigung und Faserregeneration von murinen sensorischen Nervenzellen untersucht.

Es konnte zunächst gezeigt werden, dass die Substanzen in den genutzten Konzentrationen keine negativen Effekte auf das Zellüberleben hatten. Die Zugabe von NGF steigerte sogar das Zellüberleben. Die Zugabe von Conoidin A, STAT3 Inhibitor und VEGF-A führte zu einer Reduktion des Faserwachstums. Für NGF und- PI3K Inhibitor fand sich hingegen eine Steigerung der Faserlänge und somit ein regenerativer Einfluss. Die Zugabe von ROCK Inhibitor, PRX2, SIRT1 Aktivator sowie SIRT1 Inhibitor hatte keinen signifikanten Einfluss auf das Faserwachstum. Des Weiteren wurde die Nervenfaserverzweigung mithilfe eines *Single Neuron Assays* untersucht. Die Zugabe von STAT3 Inhibitor und Conoidin A führte zu einer signifikanten Abnahme und die Zugabe von NGF zu einer signifikanten Zunahme der Faserverzweigung. Durch die Zugabe der anderen Faktoren kam es nicht zu einer signifikanten Änderung des Verzweigungsgrades der Nervenfasern.

Im finalen Schritt erfolgte die Expressionsanalyse der Substanzen mittels quantitativer real time-PCR. Diese ergab, dass die Inhibition von ROCK nach 48 Stunden zu einer Abnahme der relativen mRNA Expression von ROCK 2 führte.

Zusammenfassend konnten in dieser Studie einige vielversprechende regenerationsassoziierte Faktoren identifiziert werden. Diese könnten nach weiteren Untersuchungen *in vitro* und *in vivo* eine Grundlage für die Entwicklung von neuen Behandlungsformen der NK darstellen.

Abstract

Neurotrophic Keratopathy (NK) is a degenerative corneal disease, which is caused by corneal nerve impairment and can lead to severe ocular surface disease, corneal ulcers and may result in a loss of vision. Causes for NK are for example viral infections, former surgery as well as systematic diseases such as diabetes mellitus.

Most therapeutic options aim for a reduction of the symptoms and only one treatment, the human recombinant nerve growth factor, has been found recently to address the underlying causes of NK. This treatment option is still cost-intensive and may not be suitable for every single patient.

It was therefore the aim of this work to identify new regenerative substances for corneal nerve regeneration. In a *2D in vitro* model using murine, sensory nerves we examined the substances' effects on cell vitality, nerve fibre length and branching as well as fibre regeneration.

First of all, we were able to show that treating the neurons with the chosen substances did not lead to a reduction of cell vitality. NGF treatment even increased neuronal survival.

The effects of the substances on fibre regeneration and length were evaluated by a wound healing assay. Conoidin A, STAT3 Inhibitor and VEGF-A led to a reduction of fibre length, whereas NGF treatment seemed to enhance fibre length, even if not significantly. ROCK inhibitor, PRX2, SIRT1 activator and SIRT1 inhibitor did not influence neuronal fibre length significantly.

For Evaluation of neuronal fibre branching, we used a single neuron assay. Treatment with STAT3 inhibitor and Conoidin A led to significant reduction of fibre branching while NGF significantly promoted fibre branching. Treating the nerves with ROCK inhibitor, PRX2, SIRT1 activator and inhibitor did not modify fibre branching significantly.

The analysis of mRNA Expression has shown that the inhibition of ROCK did reduce relative mRNA expression of ROCK 2 significantly.

In conclusion, this study identified novel factors involved in nerve regeneration by using murine sensory nerves. After further *in vitro* and *in vivo* experiments, the presented candidates may outline new treatment options for NK.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
BDNF	<i>brain derived neurotrophic factor</i>
ConA	Conoidin A
cDNA	<i>complementary deoxyribonucleic acid</i> (dt. komplementäre Desoxyribonukleinsäure)
CGRP	<i>calcitonin-gen-related peptide</i>
Ct	<i>threshold cycle</i>
d	<i>day</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethyl Sulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> (dt. Desoxyribonukleinsäure, DNS)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DPEC	Diethylpyrocarbonat
DRG	<i>Dorsal Root Ganglia</i>
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
Engl.	Englisch
FBS	<i>Fetal bovine Serum</i> (dt. Fetales Kälberserum)
GAP-43	<i>growth associated protein 43</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GDNF	<i>glial derived neurotrophic factor</i>
GNFL	Gesamtnervenfaserlänge
h	<i>hour(s)</i> (dt. Stunde(n))
max	maximal
min	Minute
ml	milliliter
mM	millimolar
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
MW	Mittelwert
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat

NGF	<i>Nerve Growth Factor</i> (dt. Nervenwachstumsfaktor)
ng/ml	nanogramm pro milliliter
NK	Neurotrophe Keratopathie
ns	nicht signifikant
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PFA	Paraformaldehyd
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PRGF	<i>plasma enriched in growth factor</i>
PRX2	Peroxiredoxin 2
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (dt. Polymerasekettenreaktion)
p57NTR	<i>75kD-neurotrophin receptor</i>
qrt PCR	<i>quantitative real-time polymerase chain reaction</i>
RGTA	<i>ReGeneration Agent</i> (dt. Regenerations Agentur)
ROCK	<i>Rho associated coiled-coil containing protein kinase 1</i> oder <i>Rho-associated protein kinase</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (dt. Ribonukleinsäure, RNS)
RNase	Ribonuklease
ROI	<i>Region of Interest</i>
Rpm	<i>Rounds per minute</i> (dt. Umdrehungen pro Minute)
SD	<i>standard deviation</i> (Standardabweichung)
SEM	<i>standard error of mean</i> (Standardfehler)
STAT3	<i>Signal transducer and activator of transcription 3</i>
Tab.	Tabelle
TG	Trigeminales Ganglion
TrkA	Tropomyosin receptor kinase A
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i> (dt. vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor)
WST-1	<i>water soluble tetrazolium-1</i>
µl	mikroliter
µM	mikromolar
ZNS	Zentrales Nervensystem

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Grundlagen	1
1.1.1	Anatomie der Kornea.....	1
1.1.2	Der sensible korneale Nervenplexus	2
1.1.3	Neurophysiologie der Kornea und Wundheilung	5
1.2	Die Neurotrophe Keratopathie (NK).....	5
1.2.1	Epidemiologie	5
1.2.2	Ätiologie und Pathomechanismus.....	6
1.2.3	Symptome und Klassifikation.....	9
1.2.4	Behandlung und therapeutische Perspektiven.....	10
1.3	Auswahl der Faktoren	11
1.4	Ziele der Arbeit.....	16
2	Material und Methoden	17
2.1	Materialien	17
2.1.1	Versuchstiere	17
2.1.2	Faktoren	17
2.1.3	Chemikalien und Lösungen	18
2.1.4	Nährmedien.....	19
2.1.5	Verbrauchsmaterialien und Kits	19
2.1.6	Geräte	21
2.1.7	Programme und Primer	22
2.2	Methoden.....	23
2.2.1	Präparation der <i>DRG</i>	24
2.2.2	Kultivierung der <i>DRG</i>	25
2.2.3	Evaluation des Wachstumsuntergrundes.....	26
2.2.4	Wachstum der <i>DRG</i>	27
2.2.5	WST-1 Assay	28
2.2.6	Trypanblaufärbung	29
2.2.7	Scratch Assay	30
2.2.8	Single Neuron Assay	30
2.2.9	Auswertung der Assays mittels ImageJ und NeuronJ	31
2.2.10	Immunfluoreszenzfärbung	32
2.2.11	RNA Isolierung aus Zellen	33
2.2.12	cDNA Synthese	34
2.2.13	Quantitative real time PCR	35
2.2.14	Statistische Analyse.....	37

3	Ergebnisse.....	38
3.1	Wachstum der Nervenzellen	38
3.2	Zellviabilität und Zellvitalität.....	40
3.2.1	WST-1 Assay	40
3.2.2	Trypanblaufärbung	43
3.3	Analyse der Nervenregeneration im Scratch Assay.....	53
3.4	Analyse der Nervenfaserverzweigung im Single Neuron Assay	65
3.5	Quantitative real-time PCR.....	77
4	Diskussion	79
4.1	Relevanz der kornealen Nerven bei der Entstehung der NK.....	79
4.2	Evaluation der Faktoren im murinen 2D <i>in vitro</i> Modell.....	80
4.3	Identifikation von neuen regenerationsassoziierten Faktoren	82
4.4	Vielversprechende neue regenerationsassoziierte Faktoren	83
4.4.1	NGF.....	84
4.4.2	ROCK Inhibitor	85
4.4.3	Peroxiredoxine 2 und Conoidin A	86
4.4.4	SIRT 1 Aktivator und Inhibitor	87
4.4.5	STAT3 Inhibitor.....	88
4.4.6	VEGF-A.....	88
4.4.7	PI3K Inhibitor.....	90
4.5	Evaluation von Vitalität, Faserwachstum und Faserverzweigung.....	91
4.6	Schlussfolgerungen.....	96
4.7	Ausblick.....	97
5	Anhang	112
5.1	Abbildungsverzeichnis.....	112
5.2	Tabellenverzeichnis.....	113
6	Danksagung	

1 EINLEITUNG

1.1 GRUNDLAGEN

1.1.1 Anatomie der Kornea

Die Kornea ist eine wichtige Komponente des humanen Sehapparats. Die Brechkraft der Kornea wird mit 43 Dioptrien (dpt) angegeben und beträgt etwa 2/3 der Gesamtdioptrie des menschlichen Auges (65 dpt). Somit ist die Hornhaut essenziell für das menschlichen Sehen.

Anatomisch ist die Kornea eine transparente, avaskuläre Schicht im vorderen Augenabschnitt und wird an der Limbusregion ringförmig von der Sklera abgegrenzt. Insgesamt hat die zentrale Kornea eine Dicke von circa 550 µm, peripher ist die Hornhaut dicker und misst circa 770 µm [2]. Die Kornea besteht aus zellulären und azellulären Komponenten. Unterschieden werden fünf Schichten: Epithel mit Basalmembran, Bowman Lamelle, Stroma, Descemet Membran und Endothel. Seit 2013 wird das Vorhandensein einer sechsten Schicht, einer pre-Descemet Membran, auch Dua-Schicht genannt, diskutiert [3].

Das mehrschichtige Epithel besteht im Zentrum aus fünf bis sieben Zellschichten und ist circa 50 µm dick. Die Zellen des Epithels sind in einem engen, adhäsiven Zellverband angeordnet, so dass physiologisch keine Flüssigkeit in das Epithel eintreten kann [4] und eine ödematöse Schwellung der Kornea vermieden wird [5].

Dem Epithel liegt innen die Bowman Lamelle an. Diese circa 12 µm dünne Schicht besteht aus Kollagenen der Typen I und V sowie Proteoglykanen. Die Bowman Lamelle besitzt keine Regenerationsfähigkeit und korneale Verletzungen, die die Bowman Lamelle betreffen, führen meist zu einer Narbe.

Es schließt sich das korneale Stroma an. Das Stroma besteht vorrangig aus Typ I Kollagen, aber auch aus Typ IV und Typ XII Kollagen [6]. Neben den Kollagenen finden sich im anterioren Stroma ebenfalls Bestandteile der extrazellulären Matrix und Keratozyten. Die Kollagenfasern im Stroma bilden ein stabiles Gitter. Die gleichmäßige Anordnung der Kollagenfasern sowie das Flüssigkeitsgleichgewicht innerhalb der Kornea sind obligat für ihre Transparenz [7].

Die dem Stroma innen aufliegende Descemet Membran ist eine circa 7 µm dünne elastische Membran, die das Stroma vom Endothel trennt.

Die innerste Schicht der Hornhaut wird durch das Endothel gebildet. Das einschichtige Endothel grenzt die Kornea zur Vorderkammer ab. Die Zellzahl des Endothels nimmt im Laufe des Lebens ab, da Endothelzellen mit zunehmendem Alter ihre Teilungsfähigkeit verlieren [8]. Im Endothel gelegen befinden sich Pumpen, die den Flüssigkeitshaushalt in der Kornea regulieren und damit die Transparenz der Hornhaut gewährleisten [9].

Die kornealen Schichten dienen der Stabilität und Integrität der Augenoberfläche und die intakte Morphologie jeder einzelnen Schicht ist essenziell für die Funktion der Kornea.

1.1.2 Der sensible korneale Nervenplexus

In der Kornea ist die Dichte von sensiblen Nervenfasern höher als in allen anderen Geweben des menschlichen Körpers [10]. Neben der sensorischen Funktion vermitteln korneale Nerven den Lidschlussreflex sowie die Modulation der Tränenproduktion [11]. Bei einer Schädigung der kornealen Nerven, kommt es zum Untergang von Epithelzellen und damit zu Störungen der Augenoberfläche [12].

Der Hauptversorgungsnerve der sensiblen Hornhautinnervation ist der *Nervus trigeminus*, dessen Kerngebiete in der Pons cerebri liegen. Zu den trigeminalen Kernen gehört der *Nucleus mesencephalicus n. trigemini*, die *Nuclei principales n. trigemini* und *spinalis n. trigemini* und *Nucleus motorius n. trigemini*.

Nach Vereinigung zum *Nervus trigeminus* tritt der Nerv ins Cavum trigeminale ein (Abb. 1). Dort lagern sich die sensiblen Fasern zum *Ganglion trigeminale* zusammen. Aus dem *Ganglion trigeminale* zweigen die drei Hauptäste des *Nervus trigeminus* (*N. ophthalmicus*, *N. maxillaris*, *N. mandibularis*) ab. Neben den Nervenfasern aus dem *Ganglion trigeminale* wird die Kornea zu einem kleinen Teil aus dem *Ganglion cervicale superius* innerviert [13].

Der *Nervus ophthalmicus* verläuft nach Verlassen des *Ganglion trigeminale* an der lateralen Wand des Sinus cavernosus und verzweigt sich dann in drei Äste (*N. lacrimalis*, *N. frontalis*, *N. nasociliaris*), welche unterschiedliche Strukturen der Augenoberfläche und Adnexe des Auges versorgen. Der *N. lacrimalis* innerviert sensorisch die Tränendrüse, das laterale Augenlid und die Bindehaut. Der *N. frontalis* versorgt das Oberlid, Anteile der Stirn und die Schleimhaut der Stirnhöhlen sensibel. Der *N. nasociliaris*, welcher medial der Orbita verläuft, innerviert neben der Kornea auch den Tränensack sowie Nasenspitze und Anteile der Nasenschleimhaut [14–16]. Der nasociliare Nerv bildet nicht nur den kornealen

Nervenplexus, sondern gibt auch Äste zur Innervation des *Musculus ciliaris* ab. Zusätzlich gibt der nasociliare Anteil des *Nervus ophthalmicus* sechs kurze ciliare Nerven und zwei lange ciliare Nerven ab, die durch die Sklera eintretend, ringförmig um die Kornea verlaufen und so den perikornealen limbalen Nervenplexus bilden. Dieser Plexus hat sowohl sensorische als auch vegetative Anteile, die vasomotorische Funktionen vermitteln [17].

Die kornealen Nerven treten von der Peripherie aus in die Kornea ein. Die Dichte der subbasalen Nerven und Nervenendigungen nehmen von der Peripherie in Richtung Zentrum zu [18]. Im Bereich des kornealen Limbus sind noch Myelinscheiden um die Nervenfasern herum angeordnet. Bei Durchtritt in die Kornea verlieren die Fasern das Perineurium und die Myelinisierung [19]. Die Nervenfasern ziehen dann strangförmig in das Zentrum der Kornea.

Innerhalb der Kornea lassen sich drei verschiedene homogene Nervengeflechte identifizieren: Der stromale Nervenplexus, der subepitheliale Nervenplexus und der subbasale Nervenplexus. Der subbasale Nervenplexus befindet sich zwischen Bowman Lamelle und den basalen Epithelzellen [20]. Die Nervenfasern im subbasalen Nervenplexus sind in wirbelartigen Bündeln angeordnet. Sie weisen eine geringere Faserdicke auf und bilden mehr Verzweigungspunkte als die stromalen Nervenfasern [17]. Im subbasalen Nervenplexus sind schätzungsweise 19.000 bis 44.000 Axone zu finden [21]. Die Neuriten des subbasalen Nervenplexus sind gitterartig angeordnet [22].

Der Verlauf der Hornhautnerven endet mit deren freien Nervenendigungen im kornealen Epithel [23], welche mit einer ungefähren Gesamtzahl von 315.000 bis 630.000 Nervenendigungen angegeben werden [19]. Andere Nervenfasern innervieren direkt die in der Hornhaut vorkommenden Keratozyten [24].

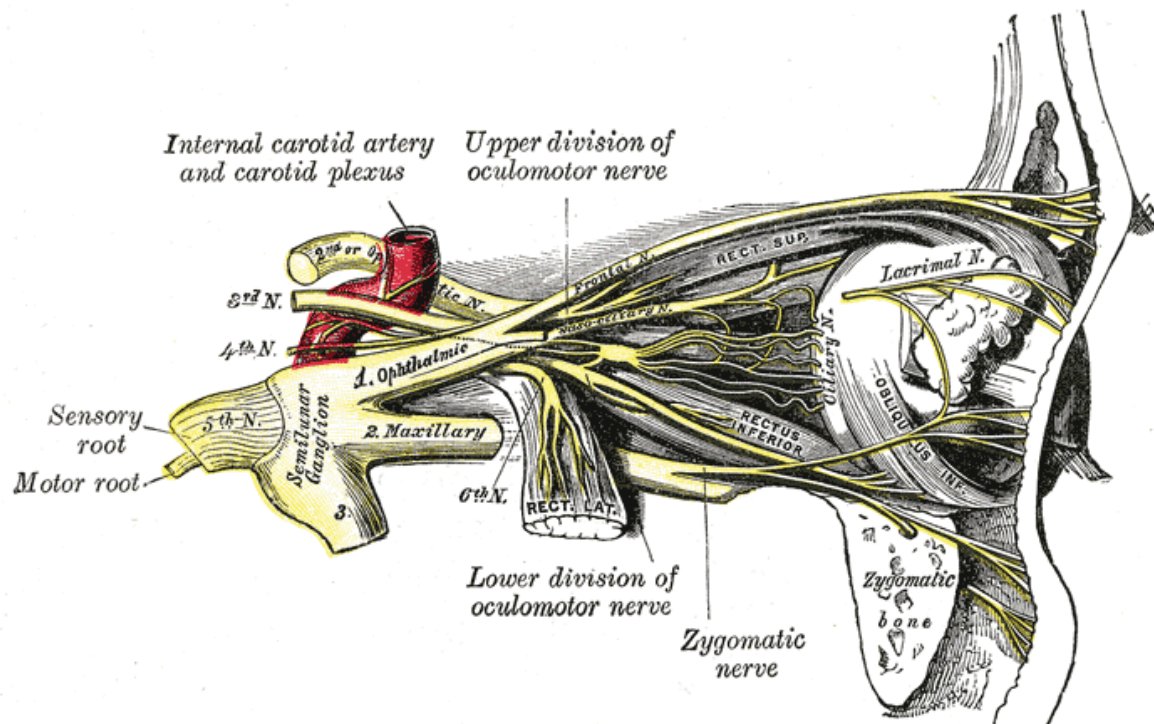


Abb. 1: Anatomische Darstellung des Verlaufs des N. Trigeminus [25]

Die korneale Innervation vermittelt über verschiedene Rezeptoren die Wahrnehmung von Reizen. Es lassen sich selektive Mechanonozizeptoren von Temperaturrezeptoren und polymodalen Rezeptoren unterscheiden. Jeder Rezeptortyp führt zur Differenzierung von sensorischen Phänomenen. Die Aktivität von polymodalen Rezeptoren, etwa durch eine korneale Wunde, die eine lokale Entzündung hervorruft, führt beispielsweise zur Wahrnehmung von Hyperalgesie und spontanem Schmerz [26]. Die Temperaturrezeptoren, im Falle der Kornea vor allem Kälterezeptoren, können beispielsweise die Abkühlung der Augenoberfläche detektieren [27], wodurch vermehrt Tränenflüssigkeit gebildet wird [28]. Unabhängig von der Stimulation einer speziellen Rezeptorgruppe führt die Irritation der kornealen Nerven zum Lidschluss und vermehrten Produktion von Tränenflüssigkeit.

Insgesamt ist die Architektur der humanen kornealen Nerven komplex. Die vielfältigen und wichtigen Funktionen der Hornhautnerven im Sinne von Vermittlung der Sensibilität sind essenziell für den Schutz und den Erhalt der Augenoberfläche.

1.1.3 Neurophysiologie der Kornea und Wundheilung

Die Neurophysiologie der Kornea wird seit mehr als 50 Jahren erforscht. In der Hornhaut sind deshalb bereits mehrere neurotrophe Substanzen und Neuromediatoren bekannt, die zur kornealen Regeneration und Wundheilung beitragen.

Die wichtigsten bereits untersuchten Substanzen, die Teil der zellulären Kommunikation zwischen Neuronen und Epithelzellen sind, ist beispielsweise der „*nerve growth factor*“ (*NGF*), der „*glial derived neurotrophic factor* (*GDNF*), der „*brain derived neurotrophic factor*“ (*BDNF*) und der „*epidermal growth factor*“ (*EGF*) [19]. Einige dieser Faktoren finden sich vermehrt in den limbalen Zellen der Kornea und scheinen einen Effekt auf den Erhalt dieser limbalen kornealen Stammzellen zu haben [29]. Eine Gewebsverletzung des Epithels führt beispielsweise zur Ausschüttung von Neuropeptiden (wie Substanz P und *calcitonin-related peptide* (*CRGP*)), welche wiederum eine pro-inflammatorische Wirkung, im Falle von Substanz P, beziehungsweise eine immunsuppressive Wirkung, durch *CRGP*, haben [30].

Als zelluläre Antwort auf die neuronale Reaktion schütten auch die kornealen Epithelzellen Faktoren aus, wie zum Beispiel *NGF* und *GDNF*, die wiederum das Wachstum und Überleben der Nervenzellen [31] und somit insgesamt die Regeneration der Kornea fördern [32].

Durch das Vorhandensein der durch Wechselwirkung ausgeschütteten Substanzen kann die korneale Homöostase aufrechterhalten und die Migration, Zellproliferation, sowie Adhäsion und Differenzierung der Epithelzellen unterstützt werden [33].

1.2 DIE NEUROTROPHE KERATOPATHIE (NK)

Die Neurotrophe Keratopathie (NK) ist eine degenerative Hornhauterkrankung, bei der es durch Schädigung der kornealen Nerven zu erheblichen Störungen der Integrität der Augenoberfläche kommen kann [34].

1.2.1 Epidemiologie

Bei der NK handelt es sich um eine seltene Erkrankung, eine sogenannte „orphan disease“ (ORPHA137596). Die Zahl der Betroffenen wird mit fünf oder weniger Betroffenen pro

10.000 angegeben [35]. Man geht davon aus, dass circa 6% der Patienten mit Herpes Keratitis eine NK entwickeln, die wiederum eine Prävalenz von 149/100.000 hat [36]. Es ist weiter beschrieben, dass circa 12.8% der Patienten, die eine Herpes Zoster Keratitis aufweisen, eine NK entwickeln. Die Herpes Zoster Keratitis hat eine Prävalenz von 26/100.000 [37]. Insgesamt kann man die Prävalenz der NK von den mit ihr assoziierten Grunderkrankungen ableiten, sodass von einer Prävalenz der NK von unter 1,6/10.000 auszugehen ist [38]. Die NK ist somit als eine seltene Erkrankung zu werten, die allerdings wahrscheinlich häufiger auftritt als die vorhandenen epidemiologischen Daten implizieren.

1.2.2 Ätiologie und Pathomechanismus

Die ätiologischen Faktoren sowie die zugrunde liegenden Pathomechanismen der NK sind vielfältig. Zu den häufigsten Ursachen der NK zählen vor allem korneale Herpesinfektionen, chemische Verätzungen, thermische Läsionen sowie Folgen neurochirurgischer Eingriffe in topografischer Nähe zum Verlauf des *Nervus Trigeminus* [34].

Okuläre Erkrankungen und ophthalmologische Eingriffe sind häufig ursächlich für die Entstehung einer NK. Infektionen des vorderen Augenabschnitts vor allem mit Herpes Simplex oder Varizella Zoster gehen vielfach mit einer Schädigung des kornealen Nervenplexus einher. Im Verlauf dieser Infektionen zeigen sich Komplikationen wie die Reduktion der kornealen Sensibilität sowie die Verminderung der Tränensekretion [39]. Diese Komplikationen können zu persistierenden Epitheldefekten führen. Dies wurde in Studien durch die Darstellung und Vermessung der kornealen Gesamtnervenfasernlänge zum Beispiel mittels konfokaler *in-vivo*-Mikroskopie gezeigt [40]. Hornhautdystrophien, die in fast allen Schichten der Hornhaut auftreten können, führen bisweilen zur Entwicklung einer NK. Besonders wenn eine subepitheliale Beteiligung vorliegt oder das Stroma betroffen ist, können klinisch Befunde einer NK auftreten.

Neben ophthalmologischen Erkrankungen können auch Augenoperationen zur Entwicklung einer NK führen. Hier führt eine direkt Schädigung des subbasalen Nervenplexus durch häufig durchgeführte Eingriffe wie der Laser-in-situ-Keratomileusis (LASIK) [41], der photorefraktiven Keratektomie und der perforierenden Keratoplastik zum Verlust von Nervenfasern. Eine Studie von 2004 zeigte, dass auch nach drei Jahren post-LASIK der subbasale Nervenplexus im Hinblick auf die Nervenfaserdichte nicht den präoperativen Stand zeigte [42]. Insgesamt ist durch die mechanische Schädigung der Nerven die iatrogene Entwicklung einer NK nicht auszuschließen. Auch Medikamente, die topisch angewendet werden, können den kornealen Nervenplexus beeinflussen, so zum Beispiel

der β -Blocker Timolol, der zur Augeninnendrucksenkung angewendet wird [43]. Zusätzlich stehen auch konservierungsmittelhaltige Augentropfen, insbesondere jene mit Benzalkoniumchlorid im Zusammenhang mit kornealer Neurotoxizität, Inflammation und reduzierter Tränenproduktion [44].

Auch systemische Erkrankungen, wie Diabetes mellitus können die Kornea im Rahmen einer NK betreffen [45]. Hier lassen sich zum Beispiel Nervenfaserschäden im subbasalen Nervenplexus finden [46]. Im Rahmen des demografischen Wandels und durch Zunahme der Inzidenz von Stoffwechselerkrankungen insgesamt, wird die Therapie der kornealen Manifestation neue Therapieoptionen und Behandlungskonzepte fordern. Auch zentralnervöse Störungen wie Neoplasien im Hirnstamm können zur Ausbildung einer NK führen. Zu diesen zentralnervösen Störungen zählen unter anderem auch vaskuläre Störungen, wie Insulte aber auch degenerative Störungen wie Morbus Parkinson oder Morbus Alzheimer als auch die Multiple Sklerose [34]. Bei neurochirurgischen Eingriffen können Schädigungen im gesamten Verlauf der trigeminalen Innervation, vom Hirnstamm über die Schädelbasis bis in die Orbita, auftreten [47]. Diese zentrale Störung kann im Verlauf zur klinischen Manifestation einer NK führen. Genetische Ursachen sind selten. Zu nennen sind hier die kongenitalen kranialen Dysinnervationssyndrome, welche mit einer zentralen Schädigung wichtiger Nerven einhergehen und meist durch eine Kernaplasie entstehen. Beim Möbius Syndrom kommt es beispielsweise zu einer okulofazialen Parese und Lähmungsstrabismus sowie in seltenen Fällen auch zu Ohrmissbildungen, Schwerhörigkeit und Taubheit. Bei Patienten, die an einem Möbius Syndrom erkrankt sind, finden sich auch Anzeichen einer NK [48].

Pathomechanismus

Nach gegenwärtiger Ansicht scheint die Kombination mehrerer Faktoren bei der Pathogenese der NK eine Rolle zu spielen. Die wichtigsten Faktoren sind ein reduzierter Lidschlussreflex durch verminderte Hornhautsensibilität, Verminderung der Tränenproduktion [11], Reduktion der Sekretion von trophischen Faktoren und ein gestörter Epithelzellmetabolismus [49]. Die Wechselwirkung zwischen diesen Mechanismen führt zu einer gestörten Regenerationsfähigkeit der Hornhaut. Das Vorliegen dieser Gegebenheiten führt dann zum klinischen Bild der NK (Abb. 2).

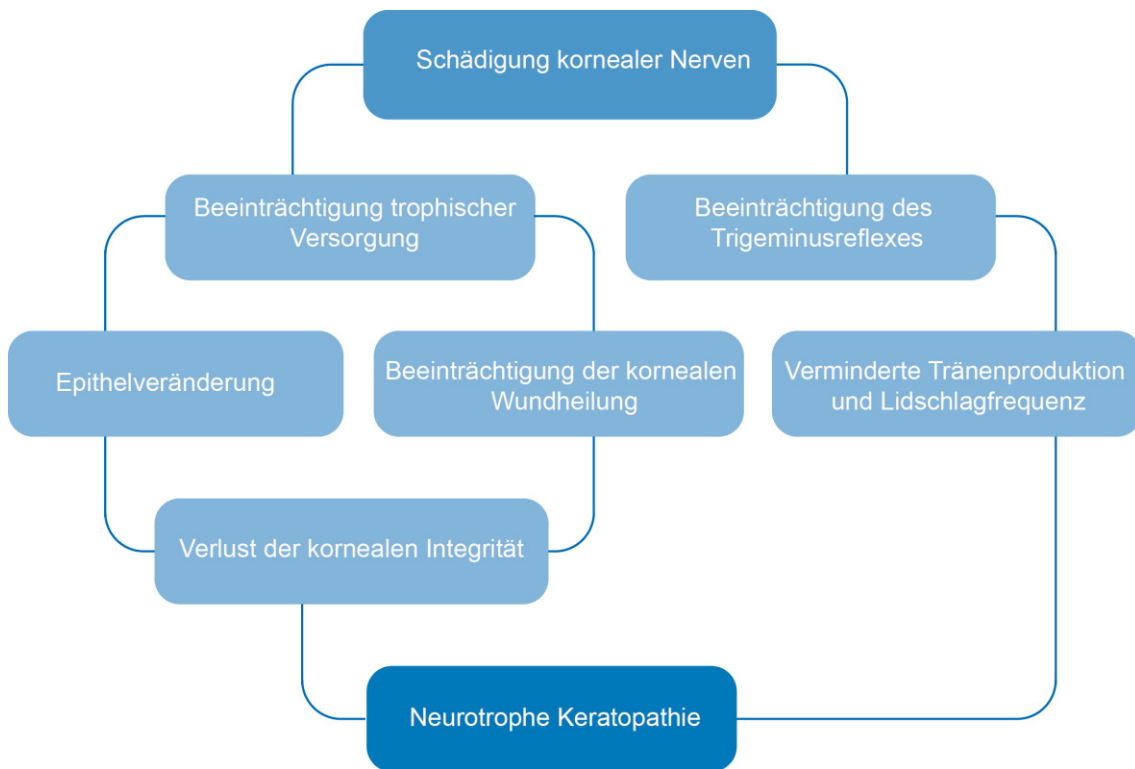


Abb. 2: Pathogenese der NK

Modifiziert nach Mastropasqua et al. (2016) [50]

1.2.3 Symptome und Klassifikation

Im frühen Stadium stellen sich Patienten, die an einer NK erkrankt sind mit Symptomen wie Trockenem Auge, Photophobie und Sehstörungen vor. Im Verlauf der Erkrankung nehmen Symptome wie Schmerz oder Fremdkörpergefühl eher ab, da durch die Schädigung der Innervation eine Hypästhesie auftritt. Sobald der zentrale Bereich der Kornea betroffen ist, kann es zu einer erheblichen Abnahme des Visus kommen [34].

Klinisch wird die NK nach Mackie von 1995 [51] in drei Stadien unterteilt werden. Seit 2018 wurde eine Klassifikation vorgeschlagen, die die NK in eine milde, moderate und schwere Form einteilt (Tab. 1).

Tabelle 1: modifizierte Klassifikation nach klinischen Aspekten
Modifiziert nach Dua et al. (2018)

Mild	Moderat	Schwer
Epitheliale Irregularitäten ohne Epitheldefekt, Tränenfilminstabilität, Hyperästhesie mit reduzierter Sensibilität in 1 oder >1 Quadranten	Epitheldefekt ohne Stromadefekt, Hypästhesie/Anästhesie der Hornhaut	Stromale Beteiligung, Ulzerationen, Perforation mit Hypästhesie/Anästhesie der Hornhaut

Zentrales diagnostisches Instrument neben der Anamnese ist die ophthalmologische Untersuchung. In der Spaltlampenuntersuchung sollten besonders Lider (Lidstellung, Lidschlussfrequenz, Lidschluss) sowie Konjunktiva (Zeichen einer Entzündung) und Kornea (Epitheldefekte und Endothelpräzipitate) untersucht werden. Auch die Hornhautsensibilität sollte getestet werden. Zusätzlich sollte eine orientierende neurologische Untersuchung durchgeführt werden, um eventuelle extraorbitale Ursachen der NK zu diagnostizieren. Hier muss bei Verdacht auf eine neurologische Genese eine Schädigung im Verlauf des Nervus Trigemini oder intrakranielle Neoplasien ausgeschlossen werden [52].

1.2.4 Behandlung und therapeutische Perspektiven

Die Therapie der NK umfasst sowohl konservative als auch operative Optionen. Ein Großteil der zur Verfügung stehenden Therapien sind allerdings nicht kausaler, sondern vor allem symptomatischer Natur.

Für die konservative Behandlung sollten grundsätzlich topische epitheltoxische Medikamente wie nichtsteroidale Antiphlogistika, Kortikosteroide oder konservierungsmittelhaltige Augentropfen abgesetzt werden, da diese die Entstehung einer NK fördern oder die Ausprägung der NK verstärken können [53].

Die weitere Therapie der NK erfolgt stadiengerecht. Zur Basistherapie zählt die Optimierung der Benetzung mit zum Beispiel hyaluronsäurehaltigen Tränenersatzmitteln, welche Symptome wie Fremdkörpergefühl lindert und die Epithelialisierung fördern sollen [34]. Zusätzlich werden therapeutische Kontaktlinsen empfohlen, die die Hornhaut schützen. Verwendet werden hier unter anderem Silikonhydrogellinsen und bei therapieresistenten Epitheldefekten auch Sklerallinsen [53]. Eine Kombination von Gelkontaktlinsen mit Serum Augentropfen kann sinnvoll sein [54]. Autologe Serumaugentropfen werden bei Epitheldefekten heutzutage vielfach erfolgreich eingesetzt [55, 56]. Sie werden aus dem Serum des jeweiligen Patienten hergestellt und enthalten patienteneigene Nährstoffe und Wachstumsfaktoren, die sich positiv auf die Regeneration des Epithels auswirken [57]. Seit 2017 steht in Deutschland die einzige kausale Therapieform der NK zur Verfügung. Die Nutzung des rekombinanten humanen Nervenwachstumsfaktors (Cenegermin, engl. *rhNGF*) ist zwar eine kostenintensive jedoch ein sinnvolle Ergänzung zu den aktuell verfügbaren Therapieoptionen [58, 59]. Eine Multicenter Studie von 2020 belegt die Wirksamkeit [60], sodass in der Regel ab Stadium 2 (moderate NK) eine Therapie mit NGF empfohlen wird.

Die operative Therapie wird bei Patienten mit fortgeschrittenen Verläufen favorisiert. Wenn sich aus einer Erosion ein persistierendes Ulkus entwickelt hat, werden operative Maßnahmen erforderlich, um eine Perforation zu vermeiden. Neben einer iatrogenen Schutzptosis [61], kommen auch invasive Verfahren wie die laterale Tarsorrhaphie zum Einsatz. Neben der mechanischen Deckung des Epithels können Amnionmembrantransplantate durch die Freisetzung von Wachstumsfaktoren positive Effekte auf die Reepithelialisierung der Kornea haben [53]. Eine chirurgische Deckung mit Teilen der Bindehaut kann ebenfalls zu einem mechanischen Schutz genutzt werden und zur trophischen Unterstützung der Wundheilung führen [57]. Sollte eine Perforation der Hornhaut vorhanden sein, ist eine Hornhauttransplantation (Keratoplastik) meist unumgänglich [53]. Leider führt die in der Regel schlechte Wundheilung sowie das erhöhte

Risiko einer Entzündung bei Patienten mit NK häufig zu Rezidiven und Komplikationen, welche dann zum Teil chirurgisch schwierig zu behandeln sind.

Therapeutische Perspektiven

Regenerationsassoziierte Faktoren für die Kornea bieten potenzielle Therapieansätze für die NK. So ist bereits eine Vielzahl an Faktoren hinsichtlich potenzieller Effekte auf die Nervenregeneration untersucht worden. Um nur eines von vielen Beispielen zu nennen, ist das sogenannte „*ReGeneration Agent*“ (RGTA) ein vielversprechender Kandidat für eine neue kausale Therapieform der NK. In klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass der Einsatz von RGTA bei Patienten mit chronischen kornealen Ulzerationen zu einer Abnahme des Schmerzes sowie zur verbesserten Abheilung von Ulzera führte [62–64]. Eine randomisierte Doppelblindstudie sollte folgen, um die Effektivität von RGTA bei chronischen kornealen Ulzerationen zu prüfen.

Generell ist die Behandlung vor allem der schweren Form der NK anspruchsvoll. Eine frühe Diagnosestellung und Einleitung der Therapie ist daher von großer Bedeutung. Neue topisch anwendbare Substanzen zum Erhalt der kornealen Nerven, zur epithelialen Regeneration und zur Wiederherstellung der Matrixarchitektur der Kornea sind innovative Therapieansätze und versprechen neue Perspektiven für die komplexe Behandlung der NK.

1.3 AUSWAHL DER FAKTOREN

Nervenzellen des peripheren Nervensystems sind im Vergleich zu denen des zentralen Nervensystems zur Regeneration befähigt. Das Auswachsen der Nervenfasern nach Axotomie ist vornehmlich durch das Vorhandensein von neurotrophen Faktoren und das Fehlen einer zellulären, auch „gliale“ Narbe genannt, die im ZNS mitunter die Regeneration beeinträchtigt [65], bestimmt. Das enge Zusammenspiel zwischen ausgeschütteten Wachstumsfaktoren und Nervenzellen wurde in Vorarbeiten zu dieser Studie untersucht. Es konnten beispielsweise in früheren Studien in retinalen Ganglienzellen von Weißbüschelaffen und Nagetieren verschiedene Faktoren identifiziert werden, die in den Regenerationsprozess von retinalen Nervenzellen eingebunden waren und eine altersabhängige Regulation zeigten [66]. Initiale Untersuchungen von unserer Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass die im Zentralnervensystem bereits identifizierten Substanzen auch in der Kornea und in regenerierenden peripheren Nervenzellen teilweise in erhöhter Konzentration vorlagen. Die nach Literaturrecherche und Expressionsanalyse

in der Kornea vielversprechendsten Kandidaten wurden dann für diese Studie ausgewählt. Für einige der genutzten Kandidaten gab es bereits in der Literatur valide Hinweise darauf, dass diese Faktoren regenerationsassoziierte Effekte auf Nervenzellen haben könnten. Folgende Faktoren wurden eingehender auf ihre Wirkung auf regenerationsfähige sensible murine Nervenzellen untersucht.

Nerve growth factor (NGF)

Im Rahmen von *in vitro* und *in vivo* Tierstudien wurde bereits gezeigt, dass NGF positive Effekte auf das Wachstum von Nervenfasern hat. Beispielsweise auch auf das korneale Nervenwachstum nach LASIK [67, 68]. NGF spielt unter anderem durch die Modulation von neuronalen Funktionen eine Rolle in der Balance zwischen sensorischem und sympathischem Nervensystem [69]. In der Hornhaut erfolgt die Expression der Rezeptoren für NGF TrkA und p57NTR durch korneale Epithelzellen, Endothelzellen, Keratozyten und auch Neurone [31]. Es wurde ebenfalls bereits gezeigt, dass es zu einer Zunahme der NGF-Expression bei sich regenerierenden kornealen Epithelzellen kam, und dass ein Verlust von NGF durch Blockierung des Signalwegs zu einer Abnahme des Neuritenwachstums führte [32]. Die Ausschüttung von NGF hat vielfältige Effekte auf die kornealen Zellen und Nerven und ermöglicht die Wechselwirkung zwischen diesen unterschiedlichen Zelltypen.

Seit 2017 ist NGF in Form eines humanen rekombinanten Faktors (Cenergermin) zur Behandlung der NK zugelassen. Studien hinsichtlich der Effektivität und Verträglichkeit von NGF lieferten vielversprechende Ergebnisse und betonten damit, dass NGF eine aussichtsreiche Option zur Therapie dieser komplexen degenerativen Erkrankung darstellen kann [58–60, 70, 71]. Eine Wochendosis des topisch zu applizierenden NGF kostet aktuell circa 2824,71 Euro und ist damit sehr kostenintensiv. Da allerdings bereits eingehend gezeigt wurde, dass NGF nervenregenerationsassoziiert ist, dient NGF in dieser Studie als Positivkontrolle.

Rho Kinase Inhibitor (ROCK Inhibitor)

Rho Kinase (ROCK) ist eine Serin/Threonin Protein Kinase, die in die Regulation und Modulation des zellulären Zytoskeletts zum Beispiel von humanen Fibroblasten involviert ist. Speziell in neuronalen Zellen spielt ROCK eine Rolle in der Zelladhäsion, der Apoptose, dem Zellüberleben sowie der Reorganisation und der allgemeinen Zellmorphologie [72, 73]. Aktuell wird eine ROCK Inhibition bereits in verschiedenen Bereichen der Ophthalmologie untersucht. Bei der Glaukomtherapie führen die ROCK Inhibitoren Ripasudil und Netarsudil

zur Änderung der Trabekelmaschenwerksstruktur, sodass Kammerwasser vermehrt abfließen kann und der Augeninnendruck sinkt [74–76]. Im kornealen Endothel führte die ROCK Inhibition zur Suppression der Apoptoserate. Hinweise darauf bestehen, dass dies zu einer verbesserten endothelialen Wundheilung führen kann [77, 78]. Auch bei Patienten mit einer Fuchs'schen Endotheldystrophie kann die Gabe von ROCK Inhibitor eine therapeutische Perspektive darstellen, da die Gabe von beispielsweise Ripasudil Augentropfen die korneale endotheliale Wundheilung positiv beeinflusst [79]. Bezogen auf die Axonregeneration im zentralen Nervensystem ist bereits bekannt, dass die Inhibition von ROCK zu einer Steigerung der Axonregeneration führen kann [80–83]. Eine kürzlich veröffentlichte Studie konnte zeigen, dass die Inhibition von Rho Kinase mittels Zugabe des spezifischen ROCK Inhibitors Y27632 in peripheren Neuronen von Ratten zu einer Steigerung der prozentualen Neuritenlänge führte [84]. Auch bei Fasudil, ein ähnlich wirksamer ROCK Inhibitor, wurden bereits regenerationsassoziierte Effekte im peripheren Nervensystem mithilfe eines Mausmodells aufgezeigt [85]. Um die aussichtsreichen Ergebnisse der Rho Kinase bezüglich der Nervenregeneration eingehender hinsichtlich eines möglichen Effekts auf korneale Nerven zu untersuchen, stellte ROCK Inhibitor in der zuvor getroffenen Auswahl einen der vielversprechendsten Kandidaten für unsere Untersuchung dar.

Peroxiredoxin 2 (PRX2) und Peroxiredoxin 2-Inhibitor (Conoidin A)

Peroxiredoxine werden in humanen kornealen Endothelzellen exprimiert und schützen dort die Zellen vor oxidativem Stress durch den Entzug von zellulärem Wasserstoffperoxid [86]. In Analysen wurde beispielweise nachgewiesen, dass bei Patienten, die an einer Fuchs'schen Endotheldystrophie erkrankt waren, deutlich niedrige Level von PRX-2, -3, -5 im Vergleich zu gesunden Probanden nachweisbar waren [87]. Dies zeigt, dass die Peroxiredoxine generell eine Rolle in der Kornea spielen und auch Rezeptoren für die Peroxiredoxine vorhanden sind. Mithilfe einer Zellkultur von Nervenzellen des zentralen Nervensystems konnte gezeigt werden, dass PRX2 die Akkumulation von ROS und folglich so einen Schutz der Zellen vor oxidativem Stress darstellt [88]. Peroxiredoxine könnten Neurone sogar vor Neurotoxizität schützen [89], zum Beispiel auch bei Patienten mit Multipler Sklerose [90]. Insgesamt scheint Peroxiredoxin 2 durch antioxidative und antientzündliche Eigenschaften signifikant neuroprotektive Effekte im zentralen Nervensystem von beispielsweise Ratten zu haben [91]. Bezüglich der Effekte von Peroxiredoxinen auf das periphere Nervensystem gibt es bereits Hinweise in der Literatur, dass diese überexprimiert werden, wenn es zu Nervenschädigung kommt. So ist bekannt, dass in Säugetieren wie Mäusen alle Peroxiredoxine vorhanden sind, mit gewissen

Präferenzen für einzelne Zelltypen [92]. Nach einer Verletzung des N. ischiadicus im Mausmodell wurde zum Beispiel gezeigt, dass Peroxiredoxine in Hinterwurzelganglienzellen überexprimiert werden. Um die funktionellen Einflüsse auf Nervenzellen des peripheren Nervensystems genauer zu analysieren, wurden deshalb in dieser Studie PRX2 und Conoidin A, der die Peroxiredoxine unspezifisch hemmt, untersucht.

SIRT1 Aktivator und SIRT1 Inhibitor

Sirtuine sind Histon-Deacetylasen, die in verschiedene physiologische und pathophysiologische Prozesse des menschlichen Körpers eingebunden sind [93]. SIRT1 ist beispielsweise mit der DNA-Reparatur, metabolischen Regulationsmechanismen, Zellalterung, oxidativem Stress, Angiogenese und Inflammationen am Auge assoziiert [94]. Speziell bezogen auf den vorderen Augenabschnitt zeigte sich im Mausmodell bei diabetisch trockenem Auge zunächst eine gesteigerte und im Verlauf der Erkrankung eine verminderte Expression von SIRT1 [94]. Im Bereich des hinteren Augenabschnitts wurde der Effekt von SIRT1 auf die retinale Alterung [95] und auf retinale Erkrankungen [96] in Mäusen diskutiert. Hier wurde speziell am Beispiel des Sehnervs im Mausmodell gezeigt, dass die intravitreale Zugabe von SIRT1 dosisabhängige neuroprotektive Effekte hatte, wohingegen die Inhibition von SIRT1 durch Sirtinol diese Neuroprotektion blockierte [97]. Es konnte auch nachgewiesen werden, dass die Überexpression von SIRT1 über den sogenannten mTOR Signalweg zu einer Förderung des Wachstums von peripheren murinen Neuronen sowie einer Steigerung des Zellüberlebens führte [98]. Aufgrund der komplexen Wirkmechanismen von SIRT1 und den damit verbundenen Signalwegen, sind die Effekte von SIRT1 speziell auf murine Hinterwurzelganglienzellen noch wenig beschrieben. Deshalb wurde SIRT1 und dessen spezifischer Inhibitor Sirtinol in dieser Arbeit verwendet, um die funktionellen Effekte auf die Nervenzellen zu analysieren.

Signal transducer and activator of transcription 3-Inhibitor (STAT3 Inhibitor)

STAT3 ist ein ubiquitär im menschlichen Körper vorkommendes zytoplasmatisches Protein, das extrazelluläre Signale über die Stimulation von Liganden wie IL-6, dem „*epidermal growth factor*“ (EGF) oder dem „*ciliary neurotrophic factor*“ (CNTF) vermittelt. Dies führt zur Aktivierung von zellulären Kinasen (JAK/STAT3-Signalweg), welche weitere biochemische Reaktionen katalysieren. Die Aktivierung von STAT3 spielt eine wichtige Rolle in multiplen Phasen der Wundheilung, zellulären Proliferation, Migration und Regulation von

Inflammation in humanen Zelllinien [99, 100]. Im Mausmodell führt die reduzierte Aktivität von STAT3 zur Verzögerung der Wundheilung in der Kornea [101]. Durch exogen zugeführtes CNTF kam es zu einer Reaktivierung von STAT3 in murinen Nervenzellen [102]. Hinsichtlich der Effekte von STAT3 auf das periphere Nervensystem ist bereits gezeigt worden, dass nach einer Verletzung des N. ischiadicus STAT3 verstärkt in murinen Hinterwurzelganglienzellen nachweisbar war [103]. Diese Hinweise sollten in der vorliegenden Arbeit weiter untersucht und der funktionelle Effekt auf murine sensorische Nervenzellen genauer evaluiert werden.

Vascular Endothelial Growth Factor A (VEGF-A)

VEGF-A ist ein angiogenes Protein, das im menschlichen Körper neuroprotektive Effekte hat. Beispielsweise stimuliert es in murinen, kortikalen Zelllinien die Neurogenese [104]. Es wurde bereits im Mausmodell in heilenden Corneae nach Epitheldefekt nachgewiesen [105]. Eine Schädigung der Hornhaut führte hier in Mäusen zu einer verstärkten Expression des VEGF-A Rezeptors. VEGF-A steht im Zusammenhang mit neurotrophen Effekten und es wurde im Mausmodell bereits die Bedeutung für die korneale Nervenregeneration gezeigt [106]. In einer *in vitro* Mausstudie konnten negative Effekte des Anti-VEGF-A Antikörpers auf das Faserwachstum auf sensible Nervenzellen gezeigt werden. Dieser Effekt war auch *in vivo* reproduzierbar [107]. Da Anti-VEGF-Antikörper wie Bevacizumab ausgesprochen häufig zur intravitrealen Anwendung in der Augenheilkunde kommt, war die Untersuchung der Effekte von VEGF-A von besonderem Interesse.

Phosphoinositid 3 Kinase Inhibitor (PI3K Inhibitor)

Der PI3K Inhibitor ist über den PI3K/AKT/mTOR-Signalweg in für den Menschen essenzielle Zellfunktionen wie beispielsweise Wachstumskontrolle und Zellmetabolismus eingebunden. Aktuell spielt der PI3K Inhibitor vor allem für die Therapie verschiedener Karzinome eine Rolle, weil eine Inhibition von PI3K zur Suppression von einigen Tumoren wie dem Ovarial- oder Endometriumkarzinom führt [108]. Es wurde bereits gezeigt, dass die intrathekale Gabe von PI3K Inhibitor im Mausmodell nach Verletzung eines peripheren Nervens zu einer Reduktion von mechanischem Schmerz und Hyperalgesie führte [109]. Der PI3K/Akt Signalweg könnte also bei den Regulationsmechanismen von neuropathischem Schmerz auch im Menschen eingebunden sein. Da der PI3K/AKT-Signalweg auch unter anderem durch VEGF-A aktiviert wird [110], war für diese Arbeit von Interesse, welchen Effekt eine direkte Inhibition dieses Signalwegs auf die murinen peripheren Nervenzellen hat.

1.4 ZIELE DER ARBEIT

Die Neurotrophe Keratopathie ist eine degenerative Hornhauterkrankung, bei der es durch Schädigung der kornealen Innervation zu Augenoberflächenstörungen, Hornhautulzerationen sowie konsekutiver Erblindung kommen kann. Das Therapiespektrum ist begrenzt. Aktuell steht lediglich eine konservative Therapiemöglichkeit zur Verfügung, die die Erkrankung kausal behandelt. Praktikabel ist zum derzeitigen Zeitpunkt die symptomatische Therapie der Komplikationen.

Ziel dieser Arbeit ist daher die Identifizierung neuer regenerationsassoziierter Faktoren für die korneale Nervenregeneration, um auf dieser Grundlage neue Therapiemöglichkeiten aufzeigen zu können.

Unter Verwendung von murinen sensorische Nervenzellen sollen die Effekte von verschiedenen Faktoren auf das Wachstum und die Regenerationsfähigkeit der Nervenzellen *in vitro* untersucht werden. Dazu werden sowohl rekombinante Proteine als auch die entsprechenden chemischen Inhibitoren genutzt, um sowohl mögliche Effekte einer Überexpression als auch einer Inhibition auf das Nervenfaserverwachstum zu untersuchen. Zur Evaluation möglicher toxischer Effekte der ausgewählten Substanzen, wird zunächst ein Vitalitätsassay durchgeführt. Zur funktionellen Analyse der verschiedenen Substanzen hinsichtlich des Wachstums von geschädigten Nervenfasern, folgt ein Wundheilungsassay. Mit einem sogenannten Single Neuron Assay werden die Effekte der Substanzen auf einzelne Zellen hinsichtlich ihrer Faserverzweigung untersucht. Veränderungen der mRNA Expression durch Gabe der Substanzen wird anschließend auf molekularer Ebene mittels quantitativer real time PCR nachgewiesen.

So können im Rahmen dieses Projekts die vielversprechendsten Kandidaten für weitergehende Untersuchungen identifiziert werden.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 MATERIALIEN

2.1.1 Versuchstiere

Die Versuchstiere stammen aus der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und Wissenschaftliche Tierschutzaufgaben der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, genehmigt unter dem Tierversuchsantrag nach §4 mit dem AZ O13/15 vom 30.06.2015. Es handelte sich um acht bis zwölf Wochen alte weibliche Mäuse (*Mus musculus*) der Linie C57BL/6J. Die tierexperimentellen Arbeiten wurden unter der Projektnummer O13/15 durchgeführt. Die Tiere wurden unter einem Tag-/Nachtrhythmus von je 12 Stunden und freiem Zugang zu Futter (ssniff Spezialdiäten GmbH, Deutschland) und Wasser gehalten.

2.1.2 Faktoren

Alle in dieser Arbeit verwendeten Faktoren werden in der folgenden Tabelle 2 mit Angabe der verwendeten Konzentration, sowie Herstellerangaben und Seriennummern angegeben.

Tabelle 2: Auflistung aller genutzten Substanzen und final genutzten Konzentrationen mit Herstellerangaben

Substanz	Konzentration	Hersteller	Seriennummer
Nerve Growth Factor (NGF)	100 ng/ml	Abcam	Ab9796
Peroxiredoxin 2 (PRX2)	500 nM	Abcam	Ab85331
Peroxiredoxin 2 Inhibitor (Conoidin A)	5 μ M	Cayman	18080-67-6
PI3K Inhibitor (LY294002)	5 μ M	Selleckchem	S1105
Rho Kinase Inhibitor (Y27632)	100 μ M	Selleckchem	S1049
SIRT1 Aktivator (SRT1720)	100 nM	Selleckchem	S1129
SIRT1 Inhibitor (Sirtinol)	5 μ M	Selleckchem	S2804
STAT3 Inhibitor (SH545)	25 nM	Selleckchem	S7337
Vascular endothelial growth factor (VEGF-A)	100 nM	Abcam	Ab62134

2.1.3 Chemikalien und Lösungen

Die verwendeten Chemikalien und Lösungen sind in der folgenden Tabelle 3 mit Herstellerangaben und Seriennummern aufgeführt.

Tabelle 3: Liste der verwendeten Chemikalien und Lösungen

Reagenz	Hersteller	Seriennummer
2-Propanolol		
5-Fluoro-2'-Deoxyuridine	Sigma Aldrich	F0503-100MG
DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol)	Sigma Aldrich	D9542-1MG
DEPC (Diethylpyrocarbonat), min. 97%	Roth	K028.1
DMSO	Sigma Aldrich, Steinheim	D4540-100ML
Ethanol Vol. 96% und 70%		
FBS	Biochrom	0615
Isofluran	Piramal Healthcare	B101m15b
Kollagenase 10000U/ml	Worthington	M4B14747
Laminin	Sigma Aldrich, Steinheim	11 243 217 001
L-glutamin 200mM	Sigma Aldrich	G-7513
Neurobasal	Gibco	21103-049
Nuklease-freies Wasser	Nalgene	AM9937
PCR Mastermix2 (Power SYBR Green, Applied Biosystems)	Invitrogen	4367659
PFA 4%	Sigma Aldrich	MFCD00133991
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) pH 7,2	Sigma Aldrich	D8537-500 ml
Poly-D-Lysin Hydrobromid	Sigma Aldrich	P1024-100MG
Polyvenylalkohol (MOWIOL)	Sigma Aldrich	81381 - 250 G
Steriles DEPC-behandeltes Wasser	Invitrogen Ambion	10289104
Tetrazoliumsalz (WST-1)	Roche	05015944001
Triton x 100	Sigma Aldrich	X100-500 ml
Trypanblau Lösung	Sigma Aldrich	T8154
Trypsin-EDTA	Sigma Aldrich	T4174

Tabelle 4: List der verwendeten Antikörper

Antikörper	Hersteller	Seriennummer
Anti-beta III Tubulin	Abcam	ab78078
Alexa Fluor® 594 Affini Pure Donkey Anti-Mouse IgG (H+L) rot	Jackson Immunoresearch	715-585-150

2.1.4 Nährmedien

Den verwendeten Nährmedien wurden unter sterilen Bedingungen folgende Zusätze zugefügt (Tab. 5).

Tabelle 5: Liste der Nährmedien unter Angabe der hinzugefügten Zusätze

Medium	Zusätze	Hersteller	Seriennummer
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) high Glucose AQE	+ 10% <i>FBS</i> + 1% Penicillin/Streptomycin + 1% 5-Fluoruracil	Thermo Fisher Scientific Biochrom Sigma Aldrich	12100046 0615 P4333
Neurobasal™ Medium	+ 2% <i>B-27 Supplement</i> , +1% Penicillin/Streptomycin (mit 10000 Einheiten Penicillin und 10 mg Streptomycin/ml) + 0,01% L-glutamin 200 mM	Gibco Sigma Aldrich Sigma Aldrich	17504-044 P4333 G-7513

2.1.5 Verbrauchsmaterialien und Kits

Bei den verwendeten Verbrauchsmaterialien wie Reaktionsröhrchen (*Eppendorf Tubes*) handelt es sich um Produkte der Firma Eppendorf Hamburg. Die Plastik Pipettenspitzen stammen von der Firma Sarstedt. Die serologischen Pipetten wurden von Coming oder StarLab bezogen. Weitere Verbrauchsmaterialien sind in der folgenden Tabelle 6 aufgeführt.

Tabelle 6: List der verwendeten Verbrauchsmaterialien und Kits

Material	Größe	Hersteller	Seriennummer
<i>Lumox Dishes</i>	35mm	Sarstedt	94.6077.331
MicroAmp Fast-96-well-plate (PCR-Platte)		Applied Biosystems	4346907
Nunc® Lab-Tek® II Chamber Slide™	8.6 cm ² /well	ThermoFisher Scientific	154534PK
Optical Adhesive MicroAmp Folien		Applied Biosystems	4311971
Sterican Safety Einmalkanülen	23 Gx1 0,6x25 mm	Braun	4670045S-01
Zellkulturplatten 48-well	1,1cm ² /well	Nunc, Thermo Fisher Scientific	10235552
96-well	0,29 cm ² /well	Sarstedt	83.3924
Zellkulturschalen	35mm	Nunc, Thermo Fisher Scientific	10789241
Zentrifugationsröhrchen	15 ml 50 ml 0,5ml	Cornig	431470 431472 0030124332
Eppendorf Tubes	1,5ml 2ml	Eppendorf	0030124804 0030124707

Zur standardisierten Durchführung der RNA Isolierung sowie der cDNA Synthese wurden Kits verwendet, die in der folgenden Tabelle 7 mit Bestandteilen, Herstellerangaben sowie Seriennummern aufgeführt sind.

Tabelle 7: Liste der Kits mit Angaben der Bestandteile

Kit	Bestandteile	Hersteller	Seriennummer
GenElute Mammalian Total RNA Miniprep Kit, 350 purifications	1 × 1 ml 10x RT <i>Buffer</i> 1 × 1 ml 10x RT <i>Random Primers</i> 1 × 0,2 m. 25x dNTP Mix (100 mM) 2 × 0,1 ml Reverse Transkriptase (50 U/μL)	Sigma Aldrich	RTN350-1KT
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, 200 reactions	<i>Lysis Solution</i> 2-Mercaptoethanol <i>Wash Solution 1</i> <i>Wash Solution 2</i> <i>Elution Solution</i> <i>GenElute Filtration Columns</i> <i>GenElute Binding Column</i> Reaktionsröhrchen 2,0 ml	Invitrogen	4368814

2.1.6 Geräte

Die für diese Arbeit verwendeten Geräte wurden in der Tabelle 8 aufgeführt.

Tabelle 8: Liste der verwendeten Geräte

Gerätebezeichnung	Hersteller	Seriennummer
Applied Biosystems™ 7500 Real-Time PCR fast System	Applied Biosystems	275 016 232
CO2-Inkubator HERAcell 240i	Thermo Fisher Scientific	420 11531
Mastercycler	Eppendorf Hamburg	
Mikroskop: CM4000B	Leica	34 06 59
Mikroskop: Meditec	Carl Zeiss	66 13 10 19 35
Mikroskop: Type 11 090 137 001	Leica	11 52 12 57 34 33 85
Neubauer Zählkammer (improved)	Carl Roth	T729.1
Pipetten 10 µl, 20 µl, 100 µl, 1000 µl, <i>research plus</i>	Eppendorf Hamburg	
Pinzette Inox Nr. 5	Dumont	2-1033
Präparationsbesteck Federschere, leicht gebogen Chirurgische Schere Mikroschere Vanas, gebogen	Geuder AG Windlab	 G-19600 G-31315 33 51 14025
Spektralphotometer NanoDrop 2000/2000c	Thermo Fisher Scientific	
Sterilbank Type S2020 1.2	Thermo Fisher Scientific	41 31 54 75
Vortex Genie 2	Scientific Industries	
Wasserbad WNB 7	Memmert	
Zentrifuge: Centrifuge 5424	Eppendorf Hamburg	54 24 AJI 13 82 34
Zentrifuge: Heraeus Megafuge16	Thermo Fisher Scientific	
Zentrifuge: Star lab plate centrifuge	Star Lab	K4081093

2.1.7 Programme und Primer

Für die Generierung der Daten anhand der fotografischen Dokumentation sowie die Auswertung der daraus entstandenen Daten, wurden die in der folgenden Tabelle 9 aufgeführten Programme verwendet.

Tabelle 9: Liste der verwendeten Programme

Programm	Version
Excel, Microsoft 365	Version 16.0.13328.20130
ImageJ	Version 1.52p National Institutes of Health, USA
NeuronJ Plug-In	Version 1.4.3
Software Mikroskop Leica Type 11 090 137 001	Application Suite V4.2.
Applied Biosystems™ 7500 and 7500 Fast Real-Time PCR System	V2.3.

Tabelle 10: Liste der verwendeten Primer inklusive Sequenzen

Primer	Forward Sequence	Reverse Sequence
ROCK1	TGGTAAAGGTAATCGGCAGAGG	ACTATTGGCAAACGCCATGAT
ROCK2	TTGGTTCGTCATAAGGCATCAC	TGTTGGCAAAGGCCATAATATCT
LIMK	ATGAGGTTGACGCTACTTTGTTG	CTACACTCGCAGCACCTGAA
NGF	GTAGACCCCAGACTGTTTAAGAAAC G	GTACCATGGGCCTGGAAGTCTA G
G43	GGAGAAGGATGATGCTCCCG	TTTGGCTTCGTCTACAGCGT
SRT	TGCCATCATGAAGCCAGAGA	AACATCGCGTCTCCAAGGA
GSK3 β	TGGCAGCAAGGTAACCACAG	CGGTTCTTAAATCGTTGTCTG
NT3	CTGATCGGATCCGGAGGAAG	ACCTGTAAGATCGTGGCAGAA
CDC42	GAGTGCTCTGCCCTCACAC	GGCTCTTCTTCGGTTCTGG
BDNF	CAAGTTCCCAGCGGTCTTC	TCTGGCAAAGATGAGCTCGG
CNTF	TTTCACCCCAGACTGAAGGTG	TTCTGTTCCAGAAGCGCCAT
GAPD H	AGGTCGGTGTGAACGGATTTG	TGTAGACCATGTAGTTGAGGTC A

2.2 METHODEN

Für dieses Projekt wurden murine Hinterwurzelganglienzellen (engl. *dorsal root ganglia cells*, Abk. *DRG*) aus dem Spinalkanal der Mäuse präpariert, dissoziiert und kultiviert. Es erfolgte ein Vitalitätsassay, Scratch Assay und Single Neuron Assay unter Zugabe der zu untersuchenden Substanzen. Die Expressionsanalyse wurde anschließend mittels quantitativer *real-time* PCR durchgeführt (Abb. 3).

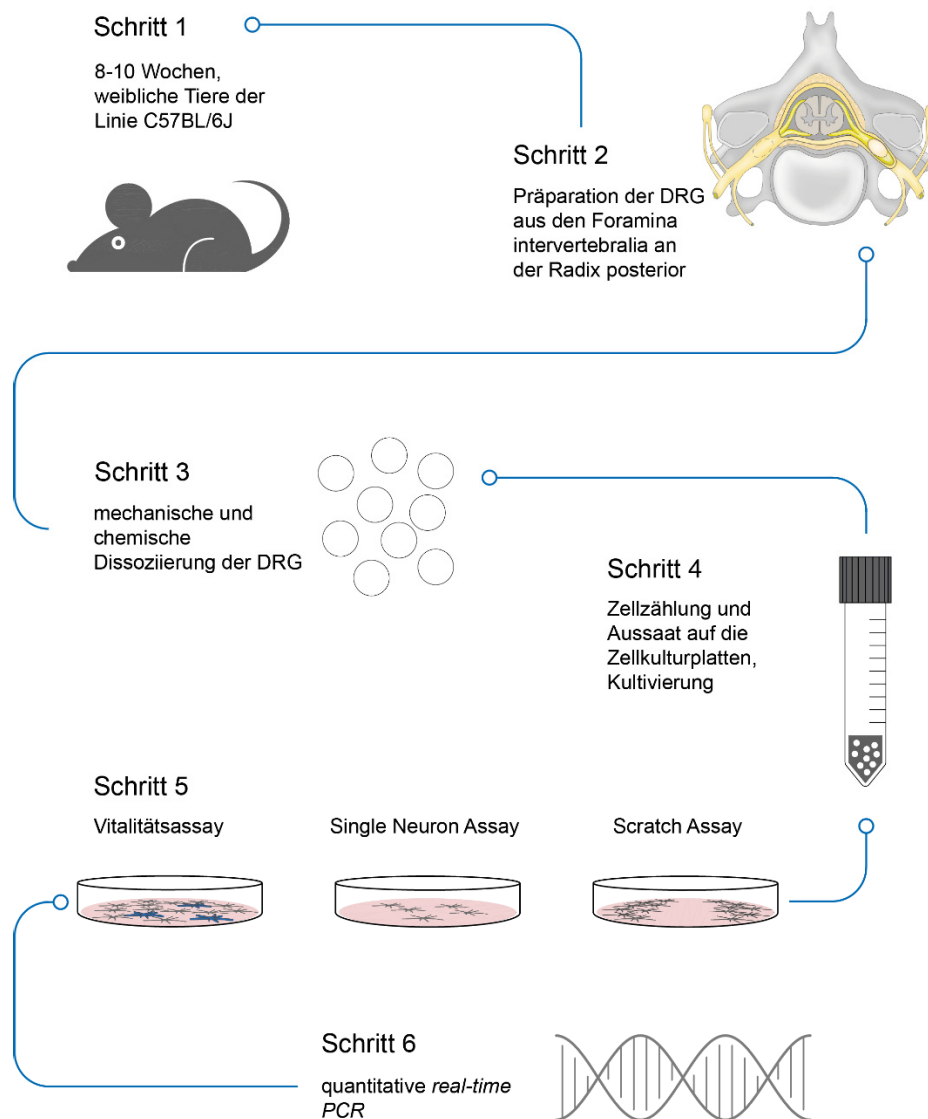


Abb. 3: schematische Darstellung des Versuchsaufbaus

2.2.1 Präparation der DRG

Zur optimalen Lagerung der DRG während der Präparation sollte eine lückenlose Kühlung sichergestellt werden. Dazu werden vor der Präparation zwei unbeschichtete 35 mm große Zellkulturschalen (Thermo Fisher Scientific) mit 5 ml gekühltem *DMEM* Nährmedium unter Zugabe der in Tabelle 5 genannten Zusätze und eine dritte Petrischale mit einzelnen, erbsengroßen Tropfen des *DMEM* Mediums befüllt und auf Eis gelegt.

Die Hinterwurzelganglien werden *post mortem* aus 8-10 Wochen alten weiblichen Mäusen der Linie C57BL/6J entnommen. Dazu wurden die Tiere durch Verwendung einer letalen Überdosis Isofluran und anschließender zervikaler Dislokation getötet. Das Fell der Tiere wurde mittels 70%igem Ethanol desinfiziert. Anschließend folgte die Dekapitation der Tiere unter Nutzung einer Knochenschere. Für die Darstellung der Wirbelsäule wurde die dekapitierte Maus in dorsaler Lage auf einer Styroporunterlage mittels Kanülen distal an den Extremitäten fixiert. Daraufhin erfolgte die ventrale Hautinzision von kaudal nach kranial und die Eröffnung des Peritoneums. Das gesamte Peritoneum sowie die intakten Harnwegs- und Geschlechtsorgane wurden *in toto* entfernt. Darm und die Blase blieben intakt, um Kontaminationen Bakterien zu vermeiden. Der Thorax wurde durch das seitliche Durchtrennen der Rippen eröffnet und die Thoraxorgane entfernt. Um Zugang zum Wirbelkanal zu gewinnen, folgte ein horizontaler Schnitt knapp oberhalb der Hinterläufe, die dadurch inklusive der paravertebralen Muskulatur und des Schwanzes abgesetzt wurden. Dadurch ergab sich am lumbalen Ende der Wirbelsäule eine Öffnung zum Wirbelkanal. In diese Öffnung wurde kaudal eine Schere eingeführt und die *Processus transversii* der Wirbelkörper beidseits aufgetrennt. So konnten alle Wirbelkörpersegmente von kaudal nach cervical seitlich durchtrennt werden und der ventrale Anteil der *Columna vertebralis* abgehoben werden. Dadurch liegt das Rückenmark frei zugänglich.

Die nachfolgende Präparation der DRG erfolgte unter dem OP-Stereomikroskop (Carl Zeiss Meditec) (Abb. 4). Die DRG, welche eine Ansammlung der Nervenzellsomata der sensiblen Neuronen darstellen, liegen in den *Foramina intervertebralia* an der *Radix posterior* der Spinalnerven. Auf Höhe jedes Rückenmarkssegments findet sich beidseits je ein Hinterwurzelganglion. Um die DRG aus den Foramina intervertebralia entnehmen zu können, wird das Rückenmark vorsichtig mit einer Pinzette an die Seite gelegt. Die DRG können anhand ihrer Form leicht identifiziert werden und vorsichtig mithilfe einer feinen Pinzette (Dumont Inox Nr. 5) aus den Foramina intervertebralia entnommen werden. Um Quetschungen der Nervenzellen zu vermeiden, werden nur die Nervenfasern, nicht das Ganglion selbst mit einer feinen Pinzette fixiert. Zur Herstellung einer möglichst reinen neuronalen Zellkultur folgt im nächsten Schritt die Nachpräparation der entnommenen DRG

in einer dritten unbeschichteten Zellkulturschale. In diese Petrischale wurden vier bis fünf einzelne Tropfen des *DMEM* Vollmediums mittels einer 1000 µl Pipette vorgelegt. Dies vereinfachte die Feinpräparation, da sich die *DRG* erstens leichter mit der Pinzette fixieren und präparieren lassen und zweitens ein geringeres Präparationsvolumen verbraucht wird. Mittels einer gebogenen Mikroschere nach Vanas zur Feinpräparation werden Bindegewebs- und Nervenfaserverreste, das sogenannte Epineurium, weitestgehend entfernt. Die vollständig präparierten *DRG* werden dann in eine dritte Petrischale mit 5 ml frischem eisgekühlten Neurobasal Medium (mit den in Tabelle 5 aufgeführten Zusätzen) überführt. Diese Petrischale wird bis zur weiteren Prozessierung der *DRG* auf Eis gelagert.

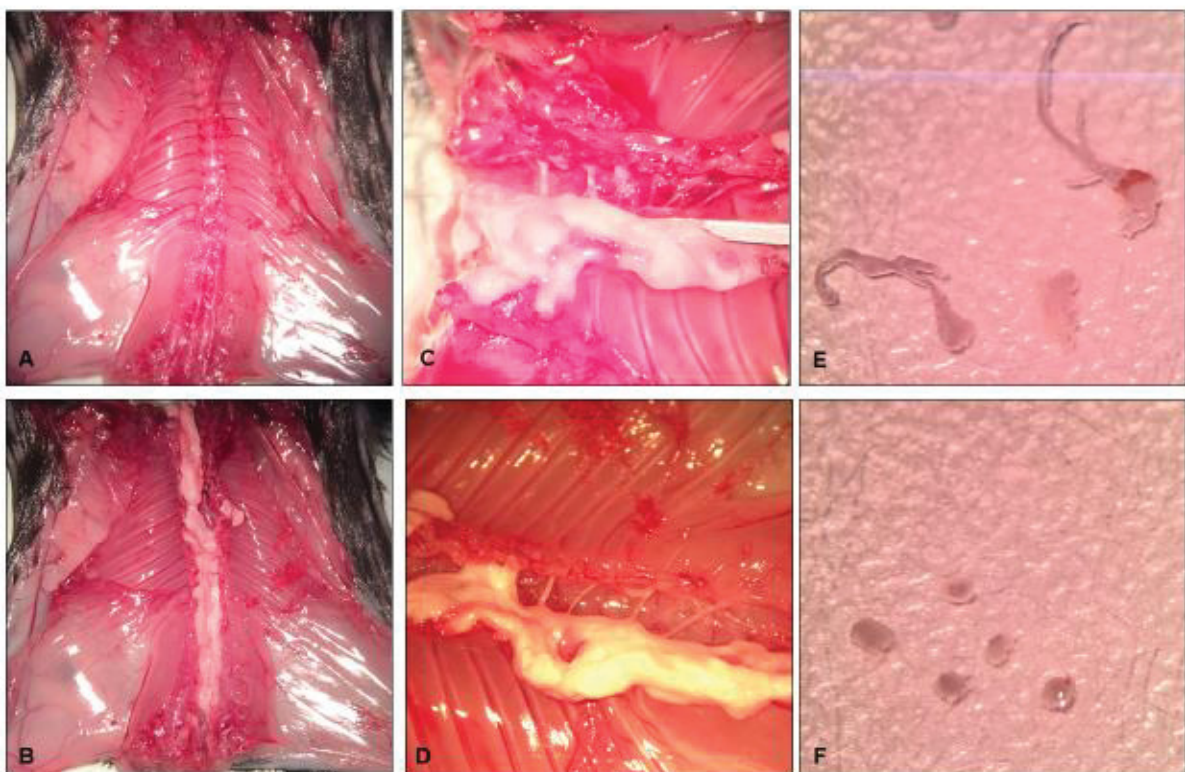


Abb. 4: Präparation der DRG

Zur Darstellung der Wirbelsäule wurden Thorax- und Abdomenorgane entfernt (A). Der Spinalkanal wurde eröffnet und das Rückenmark freigelegt (B). Die DRG (C cervical, D thorakal) befinden sich in den Foramina intervertebralia. Die extrahierten DRG (E) wurden in eisgekühltem Kulturmedium nachpräpariert und somit das Epineurium und die Nervenfasern entfernt (F).

2.2.2 Kultivierung der DRG

Die Kultivierung der DRG sowie alle Zellkulturarbeiten werden unter sterilen Bedingungen unter einer Sicherheitswerkbank durchgeführt. Nach der Präparation der DRG erfolgt deren Dissoziation und Kultivierung.

Nach der Überführung der DRG inklusive des Lagermediums in ein 15 ml Zentrifugationsröhrchen, erfolgte das Entfernen des Überstandes durch einen Zentrifugationsschritt bei 1000 *rounds per minute (rpm)* für fünf Minuten. Für die Dissoziation der DRG wurde 2 ml des zuvor auf 37 °C erwärmten Neurobasal Mediums, 1,5 ml 1x Trypsins und 500 µl vorgewärmter Kollagenase-II hinzugefügt. Nach gründlichem Resuspendieren mittels einer 1000 µl Pipette, erfolgte die Inkubation der *DRG* für 30 Minuten bei 37 °C in einem Wasserbad. Während der Inkubationszeit wurde das Falcon mehrmals schonend geschwenkt, so dass sich die Zellen voneinander lösten und um den Dissoziationsprozess zu beschleunigen. Nach Ablauf der Inkubationszeit erfolgte neben der enzymatischen Dissoziation eine mechanische Dissoziation der *DRG*. Mithilfe einer 10 ml Spritze und einer Kanüle (Sterican Safety Einmalkanülen 23 Gx1 0,6x25 mm) wurden die *DRG* vorsichtig vereinzelt, indem die Zellen zwischen vier und fünf Mal mithilfe der Spritze auf und ab gespült wurden. Es folgte ein erneuter Zentrifugationsschritt bei 1000 *rpm* für fünf Minuten. Der Überstand wurde im Anschluss vorsichtig abgenommen. Die nun dissoziierten Zellen wurden daraufhin dreimalig mit 2 ml sterilem erwärmtem *PBS* (Sigma Aldrich) gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde dann der Überstand abgenommen und in das Falcon 1 ml frisches, erwärmtes Neurobasal Medium inklusiver oben aufgeführter Zusätze hinzugefügt.

Die Zählung der Zellen erfolgte mittels Neubauer Zählkammer

Hierfür wurde die Zellsuspension resuspendiert und anschließend 10 µl in eine vorbereitete Neubauerzählkammer gegeben. Dann folgte die Auszählung mittels Neubauerzählkammer unter dem Lichtmikroskop (Leica). Dabei wurden jeweils vier Quadranten ausgezählt. Anhand einer festgelegten Formel ($Zellzahl/ml = Mittelwert * Verdünnungsfaktor * 10^4 Zellen/ml$) konnte dann die Zellzahl der Zellsuspension pro 1 ml ermittelt werden. Die Präparation von bis zu vier Versuchstieren pro Ansatz ergab je nach Erfolg der Präparation zwischen 150.000 und 200.000 Zellen. Die Zellen wurden anschließend je nach Versuch in einer definierten Zahl in unterschiedlichen Ansätzen auf unbeschichtete oder mit Poly-D-Lysin und Laminin beschichtete Kulturplatten gegeben und in Neurobasal Medium mit den oben aufgeführten Zusätzen kultiviert.

2.2.3 Evaluation des Wachstumsuntergrundes

Um den idealen Wachstumsuntergrund für die neuronale Zellkultur zu evaluieren, erfolgte die Ausplattierung der Zellen sowohl auf unbeschichteten „*Lumox Dishes*“ (35mm, Sarstedt), als auch auf Poly-D-Lysin und Laminin beschichteten Zellkulturschalen.

Die Besonderheit der *Lumox Dish* stellt der Boden dar, der aus einer flüssigkeitsundurchlässigen, aber sauerstoffpermeablen Membran besteht.

Jeweils $2,25 \times 10^4$ Neurone wurden pro *Lumox Dish* in 2,5 ml Neurobasal Medium ausgesät. Es erfolgte die Inkubation der Neurone für maximal 96 Stunden bei 37°C. Das Wachstum der Neurone auf den *Lumox Dishes* wurde mittels Fotos dokumentiert.

In einem weiteren Versuchsansatz wurden die Neurone auf zuvor beschichtete 48-well Zellkulturplatten ausgesät. Die Beschichtung bestand aus einer Kombination von Poly-D-Lysin und Laminin. Die Beschichtung erfolgte mit 0,15 mg/ml Poly-D-Lysin Hydrobromid (Sigma P1024-100MG) in 1x PBS. Diese Lösung wurde für 24 Stunden auf die zu beschichtenden Platten gegeben und bei 37°C inkubiert. Es erfolgten drei Waschschrte mit 1x PBS, gefolgt von der Laminin Beschichtung. Dazu wurde 0,015 mg/ml Laminin (Roche-Sigma 11 243 217 001) in 1x PBS für eine Stunde auf die Zellkulturplatten gegeben. Vor der weiteren Nutzung wurde die Zellkulturplatte dreimalig mit 1x PBS gewaschen.

2.2.4 Wachstum der DRG

Nicht-dissoziierte DRG wurden direkt nach der Präparation mittels eines Skalpells in zwei Hälften geteilt. Jeweils eine Hälfte wurde in ein zuvor mit Poly-D-Lysin und Laminin beschichtetes *well* eines *Chamber Slide* gegeben. Nach kurzem Antrocknen wurden die *wells* mit 250 µl Neurobasal Medium (inklusive 2% B-27 Supplement, 1% Penicillin und Streptomycin, 0,01% L-glutamin 200 mM, siehe Tab. 5) aufgefüllt. Die nicht-dissoziierten DRG wurden für 96 Stunden bei 37°C inkubiert und am Mikroskop fotografiert. Der Auswachsversuch der nicht-dissoziierten DRG ist in Abbildung 5 beispielhaft gezeigt.

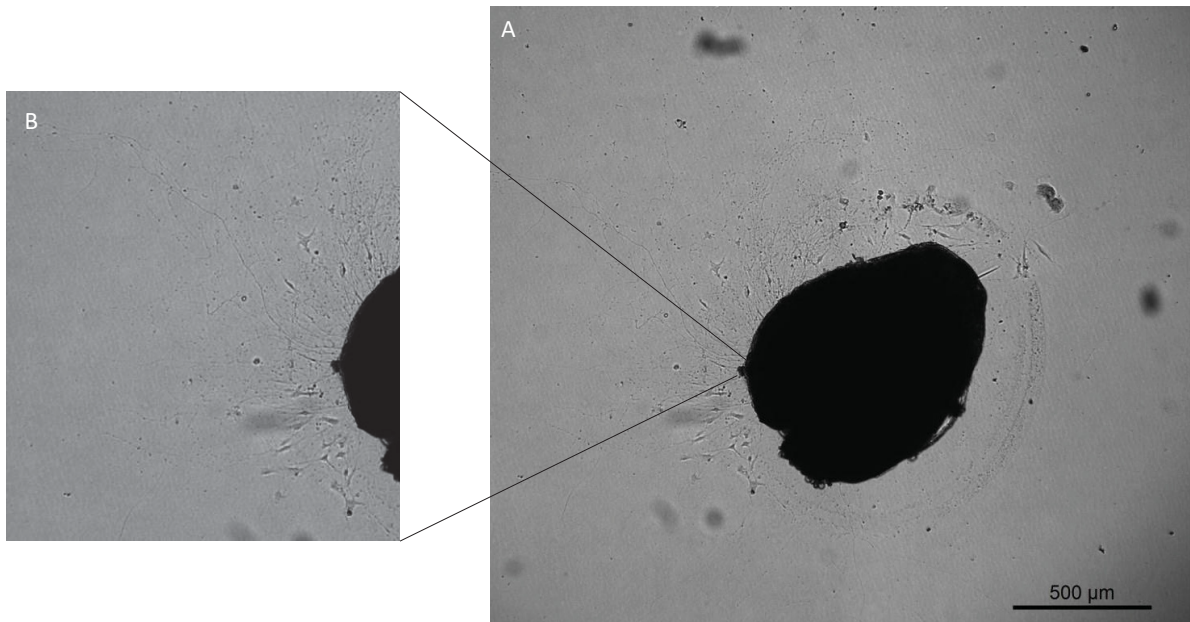


Abb. 5: Nicht-dissoziiertes DRG auf Chamber Slide 4 Tage nach Aussaat

Die lichtmikroskopische Darstellung eines nicht-dissoziierten DRG (A) Vergrößerung: 40x, Maßstab: 500 µm, (B) zeigt einen Bildausschnitt desselben DRG und bringt die einzelnen Fasern zur Darstellung.

2.2.5 WST-1 Assay

Zur Untersuchung der Zellviabilität wurde ein sogenannte WST-1 Assay durchgeführt.

Mit dem WST-1 Assay (**w**ater **s**oluble **t**etrazolium-1 Assay) wird im Überstand des Mediums die Spaltung des wasserlöslichen Tetrazoliumsalzes WST-1 in einen Formazan-Farbstoff durch zelluläre mitochondriale Dehydrogenasen gemessen [111]. Diese Enzyme sind lediglich in Zellen aktiv, die einen aktiven Metabolismus aufweisen. Eine Zunahme der Zellzahl führt zu einer erhöhten Aktivität der Dehydrogenasen und damit gleichzeitig zur Bildung von größeren Mengen des Formazan-Farbstoffes. Das Absterben von Zellen hingegen führt entsprechend zu einer Abnahme des messbaren Farbstoffes. Die Menge des entstandenen Farbstoffes kann durch die Messung der Absorption quantifiziert werden. Die Höhe der Absorption korreliert dabei mit der Anzahl der metabolisch aktiven Zellen.

Je Messzeitpunkt wurde eine 96-*well*-Zellkulturplatte verwendet. Als Ausgangspunkt wurde der sogenannte 0 Stunden (0 h) Wert gemessen, an dem die Zellen gerade adhären geworden sind, um eine mögliche Variabilität bei der Zellzahl zu minimieren. Nach der 0 Stunden Messung wurden die zu testenden Substanzen auf die Zellkulturplatten gegeben. Weitere Messungen folgten nach 24 Stunden und 48 Stunden. Es wurden 15 *wells* für die

Kontrollen und je 15 *wells* für die Substanzzugabe verwendet. Zusätzlich wurden zwei *wells* für die Leerprobe verwendet. Die Zellzahl pro *well* betrug 1.5×10^3 . In verschiedenen Versuchsansätzen wurden die Zellkulturplatten unterschiedlich lange inkubiert. Die Standardinkubationszeit beim WST-1 Assay beträgt zwei Stunden [112]. Die Proben wurden in unserem Experiment bis zu 12 Stunden inkubiert, da sensorische Neurone nicht teilungsfähig sind und eine sehr langsame Umsetzung des Farbstoffes aufzeigten. Der Überstand wurde dann entnommen und auf eine neue Zellkulturplatte gegeben. Dann erfolgte die Messung der Platte in einem Mikrotiterplatten-Lesegerät (Elisa Reader, LabSystems Multiskan EX) bei 570 nm.

2.2.6 Trypanblaufärbung

Da der zuvor verwendete WST-1 Zellviabilitätsassay keine valide Aussage für die Nervenzellen lieferte wurde für die Quantifizierung der neuronalen Zellvitalität eine Trypanblaufärbung durchgeführt. Die Trypanblaufärbung ist eine etablierte Methode, vitale Zellen von toten Zellen zu unterscheiden. Dafür wurden je drei mit Poly-D-Lysin und Laminin beschichtete 96-*well*-Zellkulturplatten pro Versuchsansatz verwendet. Der Zeitpunkt, an dem die Zellen adhärent geworden waren, wurde als Ausgangspunkt gewählt, der sogenannte 0 Stunden Wert. Weitere Messungen folgten nach 24 und nach 48 Stunden. Pro Versuchsansatz wurden je drei *wells* ohne Substanzzugabe (Kontrollen) sowie je drei *wells* pro Substanz analysiert. In jedes *well* wurden 3×10^3 Zellen in 150 μl Neurobasal Medium gegeben. Nach 24 Stunden waren die Zellen adhärent und es wurde die erste Auszählung durchgeführt. Nach der Absaugung des Mediums, wurde 75 μl der Trypanblaulösung (0,4%) in einer 1:1 Verdünnung mit 75 μl *DMEM* Nährmedium auf die Zellen gegeben. Anschließend folgte die Inkubation der Zellen für fünf Minuten bei Raumtemperatur. Es folgte ein Waschschrift mit sterilem PBS nach Ablauf der Inkubationszeit. Die Zellen wurden daraufhin mithilfe des Lichtmikroskops (Leica) fotografiert und ausgezählt. Es wurden jeweils zehn zufällig ausgewählte Bildausschnitte (engl. *high power fields*) bei einer 100-fachen Vergrößerung für die Auszählung verwendet. Die Identifikation der Zellen als „vital“ erfolgte, wenn sie nicht angefärbt wurden. Zellen wurden als „avital“ bezeichnet, wenn sie den Farbstoff internalisiert hatten und somit gänzlich blau angefärbt wurden. Nach weiteren 24 Stunden folgte eine erneute Trypanblaufärbung, um nachzuweisen, dass die Substanzen auch nach 48 Stunden keinen toxischen Effekt auf die Zellkultur zeigen.

2.2.7 Scratch Assay

Die Durchführung eines Scratch Assays dient der Analyse der Regenerationsfähigkeit von Nervenfasern. Dafür wurden je *well* 7.5×10^3 Neurone auf einer Poly-D-Lysin und Laminin beschichteten 48-*well*-Zellkulturplatte für 48 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach 48 Stunden Wachstum waren die Zellen adhärent und es zeigte sich ein Fasernetz aus Nervenfasern. Nun konnte mittels einer 1000 µl Pipettenspitze von 12 Uhr bis 6 Uhr ein definiertes Areal durch den Zellrasen gekratzt (engl. *scratched*) werden. Dadurch wurden die bereits ausgewachsenen Fasern durchtrennt und eine „Wunde“ geschaffen werden. Anschließend erfolgte ein Waschschrift. Daraufhin wurden die Neurone mit Neurobasal Nährmedium inklusive der Zusätze versetzt sowie mit den Substanzen in einer zuvor definierten Konzentration (siehe Tabelle 4) versetzt. Zusätzlich wurden Kontrollen ohne Substanzzugabe mitgeführt. Das *Scratch*-Areal wurde auf der Unterseite der Platte an verschiedenen Stellen mittels eines Punktes markiert, um für den zeitlichen Verlauf immer die identische Stelle auswerten zu können. Das Scratch Areal wurde im Verlauf nach 24 und 48 Stunden an drei unterschiedlichen Stellen fotografiert.

Ein Teil der Zellen wurde für anschließende immunhistochemische Färbungen mit Paraformaldehyd (4%) fixiert und dann bei 4 °C gelagert oder für molekularbiologische Zwecke mittels Trypsinisierung (Trypsin-EDTA 0,5% (1x)) abgelöst und bei -20 °C aufbewahrt.

2.2.8 Single Neuron Assay

Zur Analyse des Verzweigungsgrades der Fasern eines einzelnen Neurons wurde ein sogenannter *Single Neuron Assay* durchgeführt. Für den *Single Neuron Assay* wurden jeweils 1000 Zellen pro *well* in 250 µl Neurobasal Medium auf eine Poly-D-Lysin und Laminin beschichtete 48-*well*-Zellkulturplatte ausgesät. Die 48-*well*-Platten mit den Neuronen wurden für den *Single Neuron Assay* dann für 24 Stunden bei 37 °C inkubiert und daraufhin mit den Substanzen versetzt (Tab. 2). Anschließend erfolgte die lichtmikroskopische Fotografie. Nach 24 Stunden und 48 Stunden wurden dieselben Neurone jeweils erneut fotografiert. Zwischen den lichtmikroskopischen Aufnahmen erfolgte die Inkubation bei 37° C. Die Zellen wurden nach Beendigung des Experimentes für molekularbiochemische Untersuchungen mit Trypsin (Trypsin-EDTA 0,5% (1x)) von den Zellkulturplatten abgelöst, dreimalig mit *PBS* gewaschen und bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

2.2.9 Auswertung der Assays mittels ImageJ und NeuronJ

Die Auswertung der lichtmikroskopischen Aufnahmen für den Scratch Assay und Single Neuron Assay erfolgte mittels *ImageJ* und *NeuronJ*.

Für den Scratch Assay wurden drei Bilder des Scratch Areal (p1, p2, p3) der drei Versuchstage (0h, 24h, 48h) geöffnet. Die Bilder wurden vor der Auswertung von mir kodiert und somit verblindet. Dann wurde im 0 h Bild die Größe des *Scratch Areal* mittels *freehand selection* nachgezeichnet. Mithilfe des *ROI Managers* (engl. *Region of interest*, ROI) konnte das eingezeichnete *Scratch Areal* gespeichert werden. Dieses *Scratch Areal* wurde nun in das zweite und dritte Bild projiziert. Das Bild wurde dann als „8-bit“-Bild abgespeichert, um später mittels *NeuronJ* geöffnet werden zu können. Nach dem Öffnen von *NeuronJ* (→ Plugins → *NeuronJ*) konnten nun die Nervenfasern, die in das *Scratch Areal* und somit über die Markierung gewachsen waren nach 24 h und 48 h Wachstum vermessen werden. Hierfür wurde die Funktion *add trackings* ausgewählt, mit der man sukzessive jede Faser einzeln nachzeichnen kann. Sobald alle Fasern verfolgt wurden, die in das *Scratch Areal* eingewachsen waren, wurde die Funktion *measure trackings* ausgewählt. Das Ergebnis der Messung enthielt neben der Gesamtfaserlänge in μm ebenfalls die Anzahl der Messungen und die minimale, maximale und durchschnittliche Längenmessung in μm .

Für den Single Neuron Assay wurde eine in der Neurowissenschaft gängige Methode, die sogenannte Sholl Analyse verwendet. Diese Analyse wird verwendet, um Verzweigungsmuster von Neuronen zu untersuchen. Hier werden konzentrische Kreise um den Zellkern in einem definierten Abstand projiziert und anschließend die Schnittpunkte der Nervenfasern mit diesen Kreisen bestimmt [113]. In dieser Arbeit wurden sieben konzentrische Kreise, ebenfalls mittels der *ROI* Funktion von *ImageJ*, um den Zellkörper herum projiziert (Abb. 6). Gemessen ausgehend vom ersten konzentrischen Kreis, der nah am Zellkörper liegt, bis zum äußersten Kreis wurde damit ein Gesamtabstand von 120 μm erreicht. Die Kreise haben einen Abstand von 20 μm zueinander. Dann wurden die Schnittpunkte (engl. *intersections*) der ausgewachsenen Nervenfasern mit diesen konzentrischen Kreisen manuell gezählt. Mithilfe dieser Methode können Rückschlüsse auf den Verzweigungsgrad der Nervenfasern gezogen werden, da mehr Schnittpunkte mehr Aufzweigungen bedeuten.

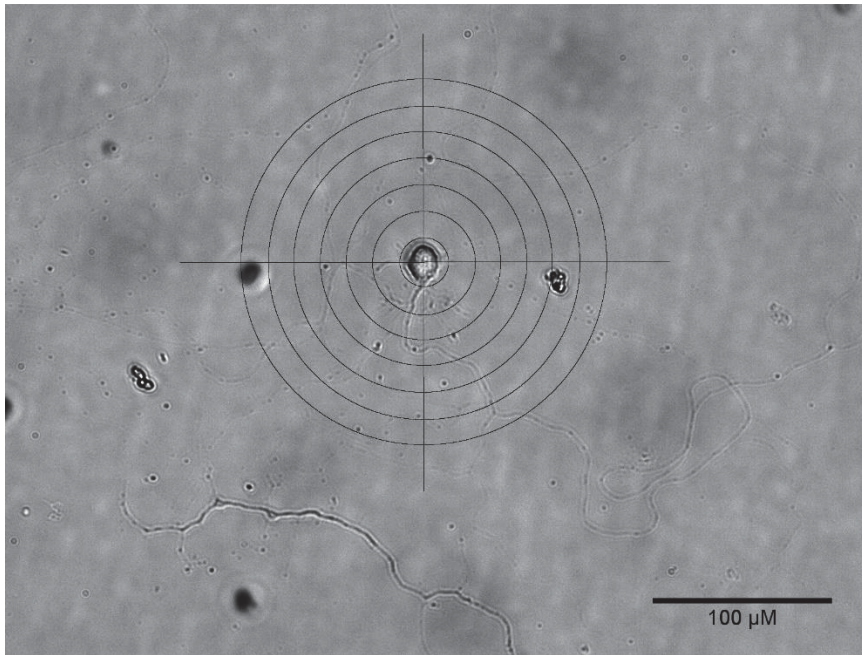


Abb. 6: Auswertung des Single Neuron Assays mittels *ImageJ*

Darstellung der Auswertung des Single Neuron Assays. Es wurden sieben konzentrische Kreise in einem Gesamtabstand von 120 µm um das Zellsoma projiziert, um die Schnittpunkte (*intersections*) der Nervenfasern mit den Kreisen zu quantifizieren. Maßstab: 100 µm

2.2.10 Immunfluoreszenzfärbung

Eine indirekte Immunfluoreszenzfärbung dient dem Nachweis eines spezifischen Antigens in Zellen. In diesem Fall wird die Immunfluoreszenzfärbung genutzt, um die ausgewachsenen Fasern genauer darstellen zu können.

Für die Immunfluoreszenzfärbung der Neurone wurden die Zellen auf den 8-Kammern *Chamber Slides* ausgesät. Die Zellen wurden mit PFA (4%) für 15 Minuten fixiert und bei 4 °C in 1x *PBS* aufbewahrt. Nach einem Waschschrift mit sterilem *PBS* wurde ein Blockierungsschritt durchgeführt, um zu verhindern, dass die Antikörper unspezifische Bindungen eingehen und somit zu Hintergrundfärbungen führen. Hierfür wurden eine Mischung aus *FBS* (5%) und sterilem *PBS* mit 0,25% TritonX100 hinzugefügt und bei Raumtemperatur für 45 Minuten inkubiert.

Für die Immunfluoreszenzfärbung wurde als primärer Antikörper der monoklonale Antikörper Anti β -III Tubulin (IgG1, Maus, TU-20, Abcam) zu den Neuronen gegeben und über Nacht wurde der Antikörper nun bei 4 °C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen dreimalig mit sterilem *PBS* für jeweils 10 Minuten gewaschen. Es folgte erneut ein Blockierungsschritt mit einer Mischung aus *FBS* (5%) und sterilem *PBS* mit 0,25% TritonX100 bei Raumtemperatur für 45 Minuten. Als Zweitantikörper wurde Alexa

Fluor® 594 AffiniPure Donkey Anti-Mouse IgG Antikörper (Jackson ImmunoResearch) in einer Konzentration von 1:400 genutzt. Nach Ablauf der Inkubationszeit mit dem Sekundärantikörper folgten erneut drei Waschschr tte mit sterilem 1x *PBS* sowie ein erneuter Blockierungsschritt. Zur Abdichtung der Deckgläschen wurde daraufhin Mowiol (Sigma Aldrich) verwendet. Die Auswertung und Fotografie der immunhistochemisch gefärbten Neurone erfolgte unter dem Mikroskop (Leica).

2.2.11 RNA Isolierung aus Zellen

Für weiterführende molekularbiologische Untersuchungen wurden die zuvor ausgesäten Neurone verwendet. Die Neurone wurden mittels Trypsin-EDTA wie in Kap. 2.2.8. beschrieben abgelöst und bei 2000 *rpm* für fünf Minuten pelletiert. Das Pellet wurde in 50 μ l *PBS* resuspendiert und anschließend 300 μ l des RNA-stabilisierenden Reagenz RNAlater der Firma Qiagen hinzugefügt. Dieses Reagenz ermöglicht eine stabile Lagerung der RNA bei 4°C für bis zu vier Wochen ohne, dass eine Denaturierung durch RNA spaltende Enzyme erfolgt. Für eine längere Lagerung wurden die Proben auf -20°C gelagert.

Für die RNA-Isolierung aus den Zellen wurde das RNA-Kit GenElute™ Mammalian Total RNA Miniprep Kit der Firma Sigma Aldrich den Herstellerangaben entsprechend verwendet.

Die Zellen wurden zunächst lysiert. Dafür wurde eine Gebrauchslösung bestehend aus 10 μ l β -Mercaptoethanol und 990 μ l der Lysefl ssigkeit (*Lysis Solution*) hergestellt. Davon wurden dann jeweils 250 μ l auf die Zellen gegeben. Nach vorsichtiger Resuspension erfolgte die Lagerung der Reaktionsröhrchen auf Eis.

Im nächsten Schritt wurde das Lysat nach Protokoll auf die blaue Säule (*GenElute Filtration Column*) pipettiert und anschließend bei 14680 *rpm* für 60 Sekunden zentrifugiert. Nach Zugabe von 250 μ l Ethanol (70% in DEPC Wasser) wurde erneut vorsichtig resuspendiert. Das Eluat wurde auf die *GenElute Binding Column* gegeben und bei Raumtemperatur für fünf Minuten inkubiert. Dann folgte ein erneuter Zentrifugationsschritt für 15 Sekunden bei 14680 *rpm*. In diesem Schritt erfolgte die Bindung der RNA an die Säule, so dass die Säule anschließend herausgenommen werden und der Durchfluss verworfen werden konnte. Nun wurde das Lysat mit 450 μ l Waschflüssigkeit (*Wash Solution 1*) gewaschen und erneut zentrifugiert. Der entstandene Durchfluss wurde verworfen und der Waschschr tt wiederholt. Dann folgte eine erneute Zentrifugation für zwei Minuten bei 14680 *rpm*. Anschließend konnte der Durchfluss verworfen und die Probe erneut für eine Minute zentrifugiert werden.

Für die Eluierung wurde die Säule (*GenElute Binding Column*) in ein neues RNase-freies Reaktionsröhrchen gegeben. Auf die Säule wurden dann 30 µl der Elutionsflüssigkeit (*Elution Solution*) gegeben. Dann folgte eine fünfminütige Inkubation bei Raumtemperatur und im Anschluss eine erneute Zentrifugation. Anschließend wurde das Eluat erneut auf die Säule gegeben zusammen mit 20 µl frischen Elutionspuffers. Nach fünfminütiger Inkubationszeit wurde das Reaktionsröhrchen erneut für eine Minute bei 14680 rpm zentrifugiert. Die Säule wurde anschließend verworfen und das Eluat auf den mRNA Gehalt hin gemessen.

Die Quantität und Qualität der isolierten mRNA wurde mithilfe des Spektralphotometers (NanoDrop™ 2000/2000c, Thermo Fisher Scientific) bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Um auf die Konzentration der RNA in der Probe schließen zu können, wird die optische Dichte genutzt. Bei 260 nm Wellenlänge entspricht die RNA Konzentration 40 µg/ml einer optischen Dichte von 1,0. Es wird im Verlauf ebenfalls die Konzentration bei einer Wellenlänge von 280 nm gemessen. Das Verhältnis der Extinktionen von OD260/OD280 liegt bei einer Protein-, DNA-freien RNA-Präparation zwischen 1,9 und 2,1. Das Gerät berechnet automatisch die Konzentration der RNA.

Die Formel hierzu lautet:

$$c(\text{RNA}) = \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{OD}_{260} \times 40 \text{ } [\mu\text{g/ml}] \text{ mit } \text{OD}_{260} = \text{Extinktion bei } 260 \text{ nm}$$

Nach der photometrischen Messung der RNA wurden die Proben in einzelnen Reaktionsröhrchen bei -80 °C gelagert.

2.2.12 cDNA Synthese

Mittels reverser Transkription ist es möglich, aus der zuvor isolierten RNA eine einzelsträngige, komplementäre DNA-Basensequenz (cDNA, engl. *complementary deoxyribonucleic acid*) zu synthetisieren. Die Reaktion wird hier durch eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, der Reversen Transkriptase, durchgeführt.

Um die cDNA zu synthetisieren, wurde das *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Invitrogen, ThermoFisher Scientific) verwendet.

Zunächst wurde die mRNA aufgetaut. Es wurde 1 µg RNA eingesetzt und mittels sterilem DPEC Wasser auf ein Gesamtvolumen von 14,2 µl gebracht. Anschließend wurde eine Gebrauchslösung (*Mastermix*) vorbereitet.

Für den *Mastermix* wurden je Reaktion 2,0 µl RT Puffer, 0,8 µl Desoxyribonukleosidtriphosphat (dNTP), 2,0 µl *Random Primer*, 1,0 µl Reverse Transkriptase (50U/µl) sowie 4,2 µl steriles Wasser verwendet. Nun wurden 5,8 µl des *Mastermixes* mit 14,2 µl der RNA zusammengegeben und wenige Sekunden vermischt und zentrifugiert. Zusätzlich wurden als Kontrolle in ein Reaktionsröhrchen anstelle der mRNA steriles Wasser und der *Mastermix* gegeben. Nun konnte mithilfe des *Mastercyclers* (Eppendorf, Hamburg) die cDNA unter folgendem Programm in folgender Abfolge synthetisiert werden.

1. 10 Minuten bei 25 °C
2. 120 Minuten bei 37 °C
3. 5 Minuten bei 85 °C
4. Ab dann konstant 4 °C

Anschließend erfolgte Lagerung der cDNA bei -20 °C.

2.2.13 Quantitative real time PCR

Die synthetisierte cDNA konnte nun zur Analyse der Genexpression im Rahmen einer quantitativen *real-time* Polymerasekettenreaktion (qrtPCR) verwendet werden. Die PCR ist eine Methode, die zur Amplifizierung einer bestimmten DNA-Sequenz dient. Für die PCR wurde nuklease-freies Wasser (Nalgene AM9937), PCR-*Mastermix* (*Power SYBR Green PCR Mastermix 2*, Applied Biosystems), eine 96-well-Kulturplatte (*MicroAmp Fast-96-well-plate*, Applied Biosystems 4346907) und eine farblose Folie zum Abkleben der PCR-Platte (*Optical Adhesive MicroAmp*, Applied Biosystems 4311971) verwendet.

Die Herstellung für 9 µl des *Mastermix* erfolgte folgendermaßen:

Tabelle 11: Angabe der Bestandteile des *Mastermix*

Bestandteil	Menge in µl
<i>Power SYBR Green Mastermix 2</i>	5 µl
Forward Primer 10µM	0,2 µl
Reverse Primer 10µM	0,2 µl
steriles Wasser (DEPC)	3,6 µl

Im letzten Schritt wurde zu dem vorgelegten *Mastermix* 1 µl der zu testenden cDNA in die *wells* der 96-*well*-Platte gegeben. Zusätzlich wurden Kontroll-*wells* mit 1 µl sterilem Wasser und 9 µl des *Mastermixes* vorbereitet. Nachfolgend erfolgte Zentrifugierung der 96-*well*-Platte (*Star lab plate* Zentrifuge), damit sich die Flüssigkeit am Boden luftblasenfrei absetzen konnte. Im Anschluss folgte die Durchführung von 40 Zyklen zur Amplifikation des PCR-Produktes.

Der PCR-Cycler wurde folgendermaßen programmiert:

1. 2 Minuten bei 50 °C
2. 10 Minuten bei 95 °C
3. 40 Zyklen à 15 Sekunden bei 95 °C
4. 40 Zyklen à 1 Minute bei 60 °C
5. 15 Sekunden bei 95 °C
6. 1 Minute bei 60 °C
7. 30 Sekunden bei 95 °C
8. 15 Sekunden bei 60 °C

Die Polymerase Kettenreaktion wird zur Amplifizierung von spezifischen DNA-Sequenzen durchgeführt. Bei der quantitativen real time PCR erfolgt die Darstellung der Produkte in Echtzeit. Nachdem also alle Zyklen durchlaufen wurden, war das Fluoreszenzsignal intensiver, je mehr PCR-Produkt amplifiziert wurde. Dieses proportionale Verhältnis wurde anschließend in einer Schmelzkurve abgebildet, welche in Echtzeit während der Amplifikation (engl. *real time*) abgelesen und dann analysiert werden konnte. Als *Housekeeping*-Gen diente GAPDH. Dieses Gen wird unabhängig vom Zelltyp oder Zellstadium exprimiert und ist nicht reguliert [114]. Es wurden die Primer ROCK 1, ROCK 2, G43, LIMK, Tubulin, NGF, SRT, PRX2, GSK3 β , NT3, CDC42, BDNF, CNTF verwendet. Nach der Durchführung der qrtPCR wurde mittels der verwendeten PCR Auswertungssoftware (Applied Biosystems™ 7500 and 7500 Fast Real-Time PCR System) eine Basislinie (engl. *Baseline*) ausgewählt, bei der eine festgelegte Mindestmenge an Fluoreszenzfarbstoff (engl. *threshold*) detektiert werden kann. Der Wert, der dafür von Relevanz ist, ist der sogenannte „*Threshold Cycle*“ (Abk.: Ct). Der Ct gibt eine Zyklusnummer an, bei der eine gewisse Menge an Amplifikationsprodukt die Schwelle zur Detektion überschreitet. Der Ct-Wert verhält sich umgekehrt proportional zur Expression eines Gens. Je niedriger der Ct-Wert ist, desto größer ist die detektierte Anzahl von Kopien des Zielgens. Um die Genexpression nachfolgend interpretieren zu können, wurde in der vorliegenden Arbeit dann die relative Quantifizierung verwendet [115]. Bei dieser $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ -

Methode werden die gemessenen Ct-Werte auf eine interne Kontrolle, in diesem Fall Neurone, die ebenfalls aus dem Scratch Assay stammen aber nicht mit einem Faktor behandelt wurden, bezogen.

2.2.14 Statistische Analyse

Um die Validität der Daten zu garantieren, wurden die Assays wenn möglich als unabhängige Triplets durchgeführt. Für die statistische Analyse wurde Graph Pad Prism 9 (Version Graph Pad Prism 9.0.0 121, GraphPad Software, Inc., San Diego, California) verwendet. Um die Daten für die statistische Auswertung verwenden zu können, wurden diese zunächst auf eine vorliegende Normalverteilung überprüft. Eine Normalverteilung innerhalb der mittels Signifikanztests verglichenen Stichproben wurde mithilfe des Kolmogorov-Smirnov/Shapiro-Wilk Tests getestet. Für die Stichproben, die eine Normalverteilung zeigten, konnte im Folgenden der ungepaarte *student's* t-Test für unabhängige Stichproben mit 95% Konfidenzintervall (CI) angewendet werden, da ein Unterschied zwischen den Mittelwerten zweier Gruppen (Kontrollgruppe und Substanzgruppe) miteinander verglichen wurden.

Für Stichprobengruppen, für die keine Normalverteilung angenommen werden konnte, wurde der Mann-Whitney-U-Test angewendet. Dieses nicht parametrischen Verfahren kommt zur Anwendung beim Vergleich von zwei nicht normalverteilten, unabhängigen Stichproben.

Ein signifikanter Unterschied lag bei einer Fehlerwahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ vor. Dies wurde mit * gekennzeichnet (* $< 0,05$, ** $< 0,01$, *** $< 0,001$, **** $< 0,0001$). Bei einer Fehlerwahrscheinlichkeit von $p > 0,05$ wurde dies mit ns (Abk.: nicht signifikant) gekennzeichnet. Die Daten werden in dieser Arbeit durch Säulendiagramme und Boxplots visualisiert. Wenn nicht anders angegeben, werden in den Säulendiagrammen jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen (engl. *standard deviation*, Abk.: *SD*) und im Falle der Boxplots typischerweise die Mediane mit Angabe der minimalen und maximalen Werte (als *Whiskers*) dargestellt.

3 ERGEBNISSE

3.1 WACHSTUM DER NERVENZELLEN

Zunächst erfolgte der Vergleich unterschiedlicher Wachstumsböden. Es wurden *Lumox* Platten, unbeschichtete Zellkulturplatten und zusätzlich mit Poly-D-Lysin und Laminin beschichtete Zellkulturplatten hinsichtlich des Anwachsens der Zellen und des Auswachsens der Nervenfasern miteinander verglichen. Die *Lumox* Platten besitzen einen dünnen Folienboden, der aufgrund der Gasdurchlässigkeit und der kurzen Diffusionswege einen optimalen Gasaustausch gewährleistet. Die Poly-D-Lysin und Laminin Beschichtung wurde in der Arbeitsgruppe bereits erfolgreich zur Anzucht von murinen Neuronen etabliert. Die Nutzung der *Lumox* Platten führte zu einem vermehrten Wachstum von Satellitenzellen und Schwann-Zellen (Abb. 7 A). Im Vergleich zu den Poly-D-Lysin und Laminin beschichteten Platten waren weniger Neurone nach 48 Stunden adhärent und die Nervenfasern wuchsen auf den *Lumox* Platten langsamer aus. Außerdem wurde die Folie durch den mechanischen *Scratch* leicht beschädigt. Folglich kamen Poly-D-Lysin und Laminin beschichtete Zellkulturplatten zur Anwendung (Abb. 7 B), die ein beschleunigtes Auswachsen der Nervenfasern ermöglichten und nicht durch den mechanischen *Scratch* beschädigt wurden.

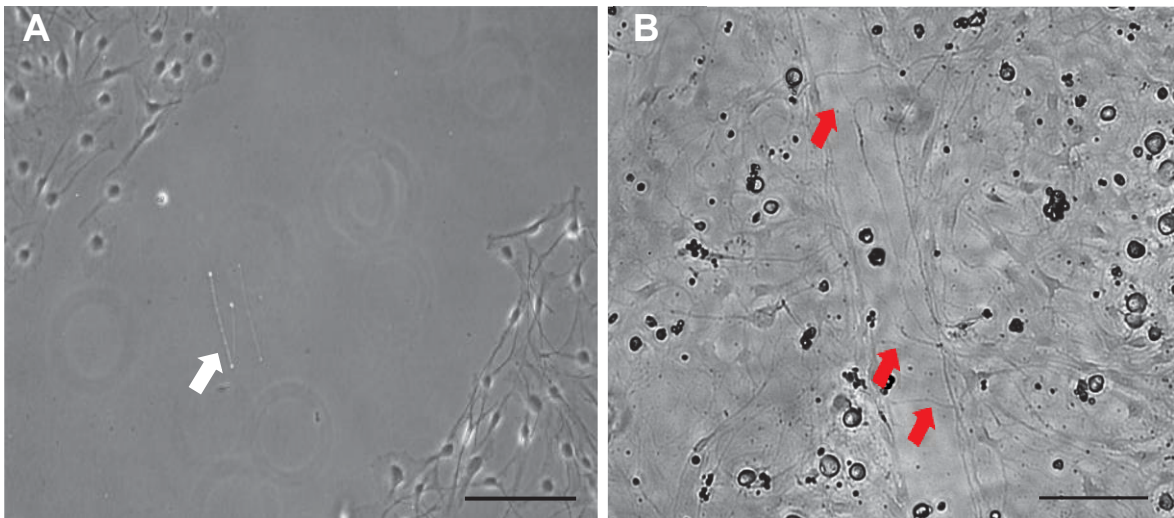


Abb. 7: Vergleich der Neurone auf Wachstumsuntergründen

Vergleich zwischen *Lumox* Platten (A, Tag 4 nach Aussaat) mit den Poly-D-Lysin und Laminin beschichteten Platten (B, Tag 2 nach Aussaat). Es zeigt sich, dass die feinen Nervenfasern in (B) vermehrt in das *Scratch* Areal eingewachsen sind (rote Pfeile). In (A) sind kaum Fasern zu erkennen, die in das *Scratch* Areal eingewachsen sind. Der weiße Pfeil in (A) zeigt einen Defekt in der Folienbeschichtung der *Lumox* Platte. Messbalken: (A) 100 μm (B) 200 μm .

Zusätzlich zu den Einzelzellkulturen sollten die Effekte der Substanzen auf nicht-dissoziierte DRG untersucht werden. Es wurden dazu halbierte Hinterwurzelganglien verwendet, die auf Poly-D-Lysin und Laminin beschichteten Zellkulturplatten platziert wurden. Nach 48 Stunden zeigte sich ein initiales Nervenfaserverwachstum und nach 48 Stunden war bereits ein dichter Faserteppich sichtbar (Abb. 8). Allerdings sind nicht alle ausgesäten DRG angewachsen und insgesamt war der Anteil von angewachsenen DRG im Vergleich zur Gesamtaussaat zu gering, um valide Daten generieren zu können.

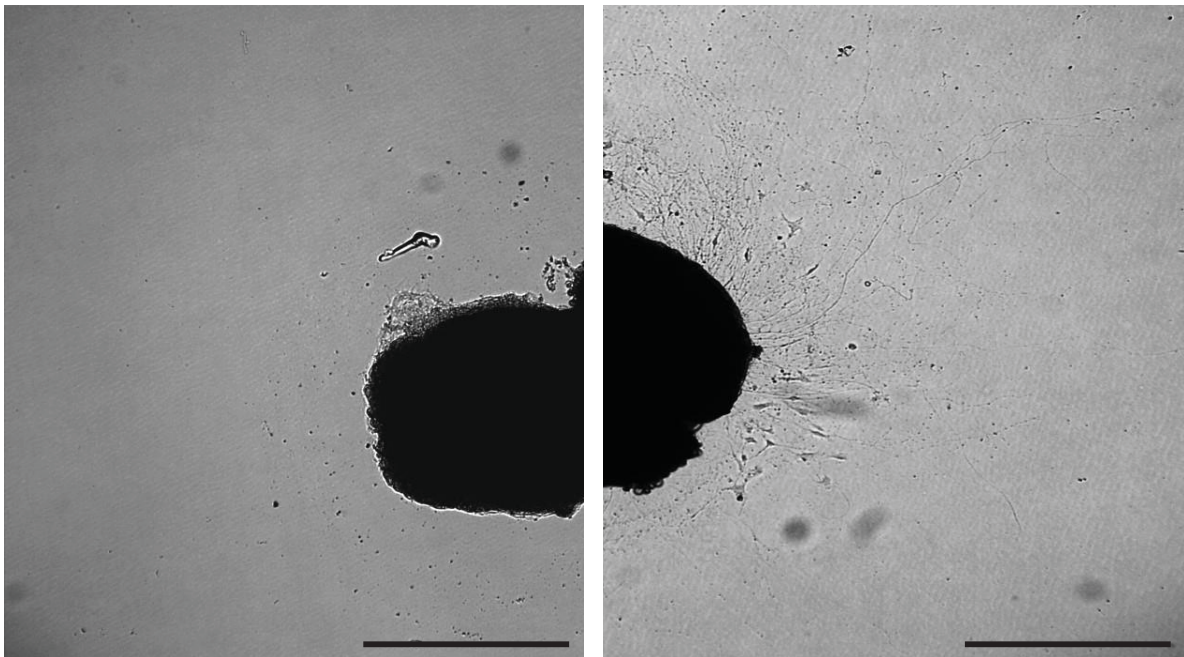


Abb. 8: Nervenfaserverwachstum eines nicht-dissoziierten DRG nach vier Tagen Wachstum
(A) zeigt den Ausschnitt eines nicht-dissoziierten DRG unmittelbar nach der Aussaat. (B) zeigt ein nicht-dissoziiertes DRG nach vier Tagen Wachstum. Zahlreiche Fasern, die in die Peripherie ausgewachsen sind nun sichtbar. Maßstab: 500 μm , Vergrößerung 40x.

Um zu zeigen, dass die Nervenfasern auf der Poly-D-Lysin und Laminin Beschichtung auswachsen, wurde zunächst die Gesamtnervenfaserverlänge (GNFL) von unbehandelten Neuronen sowohl 24 Stunden als auch 48 Stunden nach Scratch Assay mittels *NeuronJ* ausgewertet. Es konnte gezeigt werden, dass die GNFL pro cm^2 nach 48 Stunden signifikant größer war als nach 24 Stunden (Abb. 9). Daraus lässt sich ableiten, dass die Nervenfasern im Rahmen des verwendeten 2D Experiments ein adäquates Faserwachstum aufweisen und die Faserregeneration nach Verletzung (*Scratch*) zwischen den beiden Zeitpunkten signifikant ist.

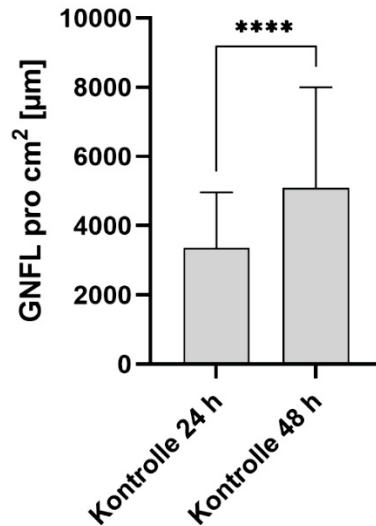


Abb. 9: GNFL unbehandelter Neurone nach 24 h und 48 h pro cm²

Vergleich der GNFL pro cm² der unbehandelten Kontrollneurone nach 24 Stunden und nach 48 Stunden im Scratch Assay auf Poly-D-Lysin und Laminin Beschichtung. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen der GNFL nach 24 Stunden im Vergleich zur GNFL nach 48 Stunden ($p < 0,0001$, MW 24 h: 3352,279 ± 1608,755 µm, MW 48 h: 5085,857 ± 2906,884 µm).

3.2 ZELLVIABILITÄT UND ZELLVITALITÄT

3.2.1 WST-1 Assay

Unter Verwendung des WST-1 Assays wurde zunächst versucht, die Zellviabilität der Neurone über 48 Stunden hinweg nachzuweisen und im Verlauf die Effekte der Substanzen bezogen auf die Viabilität der Neurone zu zeigen. Es wurden jeweils $n=10$ wells verwendet, um die Zellen zu drei Messzeitpunkten (0 h, 24 h, 48 h) photometrisch zu messen. Des Weiteren wurden Zellen im gleichen Schema untersucht, die mit ROCK Inhibitor in einer Konzentration von 100 µM und STAT3 Inhibitor in einer Konzentration von 25 nM behandelt wurden. Angegeben ist hier der Mittelwert der Optischen Dichte bei 570 nm sowie die Standardabweichung. Mithilfe des ungepaarten *student's t-Test* für unabhängige Stichproben konnte die statistische Fehlerwahrscheinlichkeit berechnet werden.

Rho Kinase Inhibitor (ROCK Inhibitor)

Die photometrisch ausgewerteten Daten des WST-1 Assays zeigen, dass sich die Messung der Zellviabilität zwischen den unbehandelten Kontrollneuronen im Vergleich zu den

Neuronen, die mit ROCK Inhibitor behandelt wurden, nicht signifikant unterscheidet. Bei den Kontrollneuronen wurde zum Zeitpunkt 0 h eine OD von $0,1838 \pm 0,0498$ gemessen und bei den mit ROCK Inhibitor behandelten Neuronen wurde eine OD von $0,1920 \pm 0,0604$. Dieser Unterschied war nicht signifikant ($p=0,5361$). Nach 48 Stunden zeigte sich ebenfalls, dass die gemessene OD sich zwischen Kontrollneuronen und Neuronen, die mit ROCK Inhibitor behandelt wurden, nicht signifikant unterscheidet ($p=0,6753$). Die OD der Kontrollneurone betrug $0,1842 \pm 0,1552$ und die gemessene OD der ROCK Inhibitor Gruppe betrug $0,1720 \pm 0,0757$. Es konnte ferner gezeigt werden, dass nach 48 Stunden ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen der Zellviabilität von unbehandelten Neuronen im Vergleich zu Neuronen, die mit ROCK Inhibitor behandelt wurden, bestand ($p= 0,1276$). Hier war die OD der unbehandelten Neurone $0,1847 \pm 0,2312$ und die OD der mit ROCK Inhibitor behandelten Neurone $0,1201 \pm 0,08962$. Ebenfalls ist zu erkennen, dass die OD innerhalb des Beobachtungszeitraums abnimmt (Abb. 10).

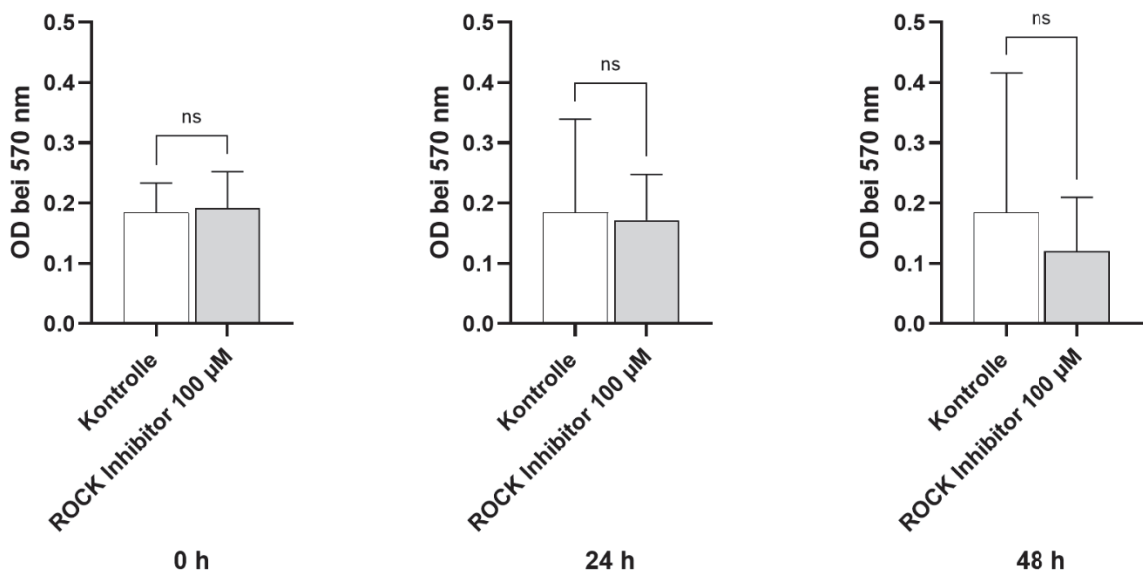


Abb. 10: Auswertung WST-1 Assay, ROCK Inhibitor, 100 µM

Bestimmung der Zellviabilität von Neuronen ohne (Kontrolle) und mit Zugabe von ROCK Inhibitor in einer Konzentration von 100 µM über einen Zeitraum von 48 Stunden. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD der gemessenen OD bei 570 nm. *student's t-Test*. N=3. Es zeigte sich über 48 Stunden hinweg kein signifikanter Unterschied zwischen Kontrolle und Neuronen, die mit ROCK Inhibitor in einer Konzentration von 100 µM behandelt wurden.

Signal transducer and activator of transcription 3-Inhibitor (STAT3 Inhibitor)

Die Auswertung des WST-1 Assays ergab, dass sich die Zellviabilität der Neurone, die mit STAT3 Inhibitor in einer Konzentration von 25 nM im Vergleich zu unbehandelten Neuronen

nicht signifikant unterscheidet (Abb. 11). Bei den Kontrollneuronen wurde zum Zeitpunkt 0 Stunden eine OD von $0,1338 \pm 0,0049$ und bei den Neuronen, die mit STAT3 Inhibitor behandelt wurden, eine OD von $0,1178 \pm 0,0150$ gemessen ($p=0,0900$). Nach 24 Stunden zeigte sich zwar eine starke Abnahme der Zellviabilität in beiden Gruppen aber der Unterschied der gemessenen OD von $0,0145 \pm 0,0261$ in der Kontrollgruppe und $0,0132 \pm 0,0236$ in der STAT3 Inhibitor Gruppe war nicht signifikant ($p=0,9457$). Auch nach 48 Stunden war zwischen der Kontrollgruppe mit einer gemessenen OD von $0,0300 \pm 0,0287$ und der STAT3 Inhibitor Gruppe mit einer gemessenen OD von $0,03475 \pm 0,0074$ kein signifikanter Unterschied festzustellen ($p=0,7601$).

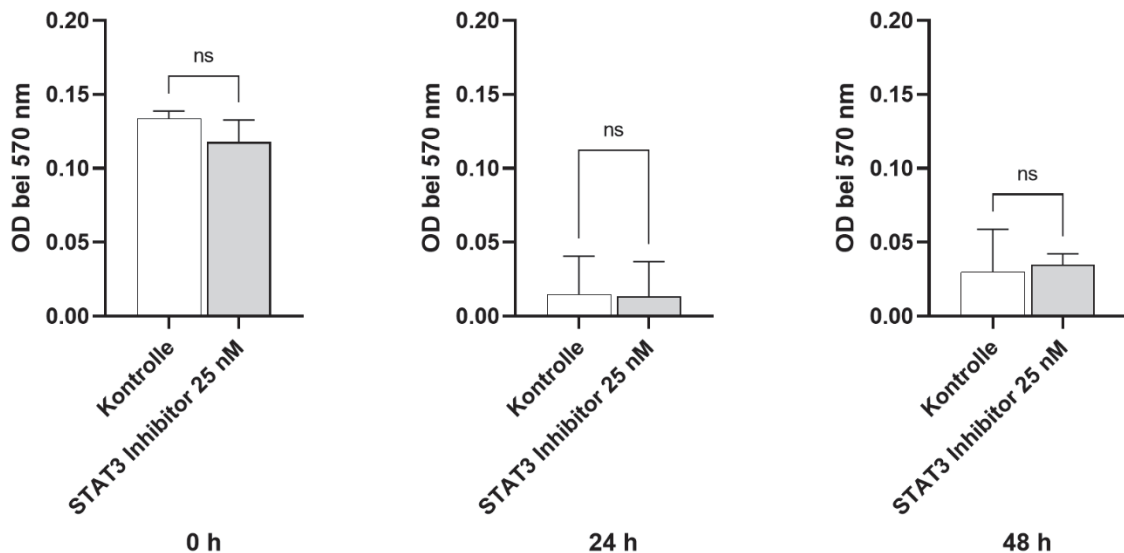


Abb. 11: Auswertung WST-1 Assay, STAT3 Inhibitor, 25 nM

Bestimmung der Zellviabilität von Neuronen ohne (Kontrolle) und mit Zugabe von STAT3 Inhibitor in einer Konzentration von 25 nM über einen Zeitraum von 48 Stunden. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD der gemessenen OD bei 570 nM. *student's t-Test*. N=1. Es zeigte sich eine Reduktion der gemessenen OD im Verlauf der 48 Stunden. Dabei war kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen festzustellen.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die photometrisch gemessene optische Dichte in beiden Experimenten im Laufe des Beobachtungszeitraums von 48 Stunden stark abnimmt. Weder die Zugabe des ROCK Inhibitors in einer Konzentration von 100 μ M noch die Zugabe des STAT3 Inhibitors in einer Konzentration von 25 nM, zeigten signifikant differente Unterschiede im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe. Allerdings war der

Farbumschlag und damit die gemessene Optische Dichte schon nach 24 Stunden sehr gering, sodass der WST-1 Assay letztlich nicht adäquat auswertbar war.

3.2.2 Trypanblaufärbung

Mit der Trypanblaufärbung konnte der Einfluss der zu untersuchenden Substanzen auf die Vitalität der Zellen analysiert werden. Direkt nach Adhärenz (0 h), 24 und 48 Stunden nach Zugabe der Substanzen wurden die toten und die vitalen Neurone gezählt (Abb. 12). Das Verhältnis von vitalen Neuronen zu den gezählten Neuronen insgesamt (tot + vital) pro *well* wurde mit den unbehandelten Neuronen (Kontrollgruppe) verglichen. Es wurden n=9 *wells* sowie pro *well* jeweils 10 *high-powerfields* ausgezählt. Das prozentuale Verhältnis von vitalen Zellen wird in den folgenden Abbildungen (Abb. 13-20) jeweils für den Zeitpunkt 24 h als auch für den Zeitpunkt 48 h für jede Substanz separat gezeigt.

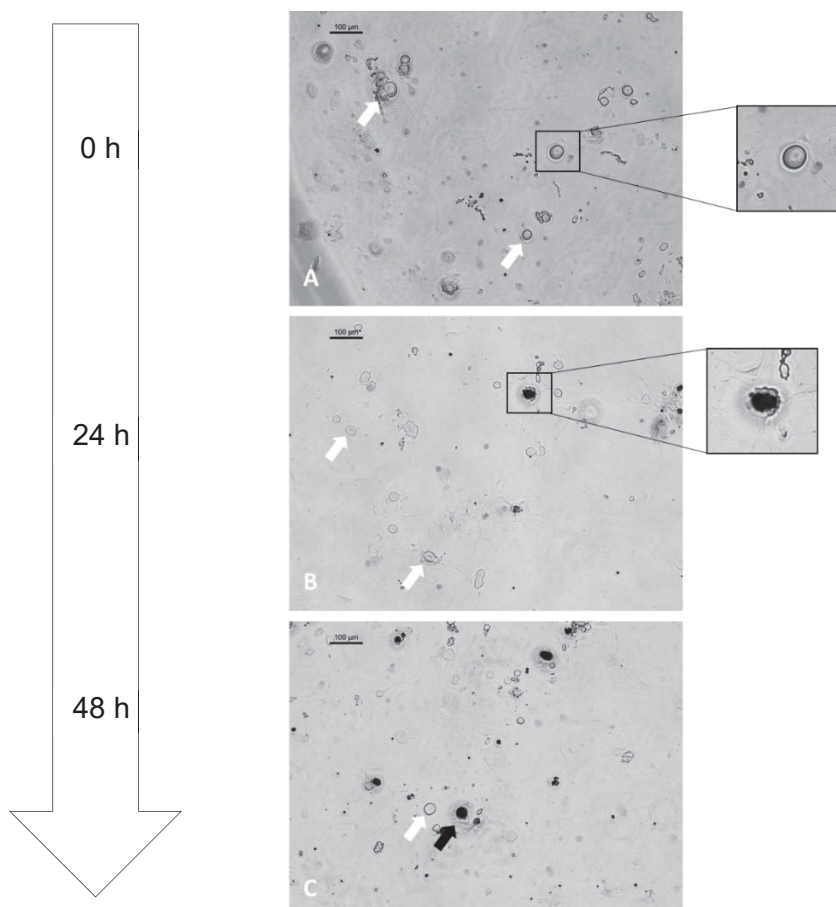


Abb. 12: Trypanblaufärbung, 0 h, 24 h, 48 h

Mittels Trypanblaufärbung wird die Vitalität der Zellen quantifiziert. Unterschieden werden können hiermit die vitalen Zellen (weiße Pfeile) von den toten Zellen (schwarze Pfeile, blau/schwarze gefärbtes Zytoplasma). (A) zeigt die Vitalität zu Beginn des Versuchs an (0 h Wert), (B) nach 24 h, (C) nach 48 h. Die Vitalitätsrate nimmt im Verlauf des Experiments minimal ab. Maßstab: 100 µm.

Nerve growth factor (NGF)

Der 0 h Wert zeigt die Quantität der vitalen Neurone ohne jegliche Behandlung als Ausgangswert. Es sind folglich $81,54 \pm 5,19$ % der Zellen direkt nach Explantation und Adhärenz vital. Die Behandlung mit NGF in der Konzentration 100 ng/ml führte nach 24 Stunden zu einer signifikanten Zunahme der Zellvitalität im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ($p=0,0047$, MW Kontrolle 24 h: $72,62 \pm 2,10$ %, MW NGF 24 h: $80,39 \pm 1,08$ %). Nach 48 Stunden war kein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe mehr festzustellen ($p=0,3124$, Abb. 13).

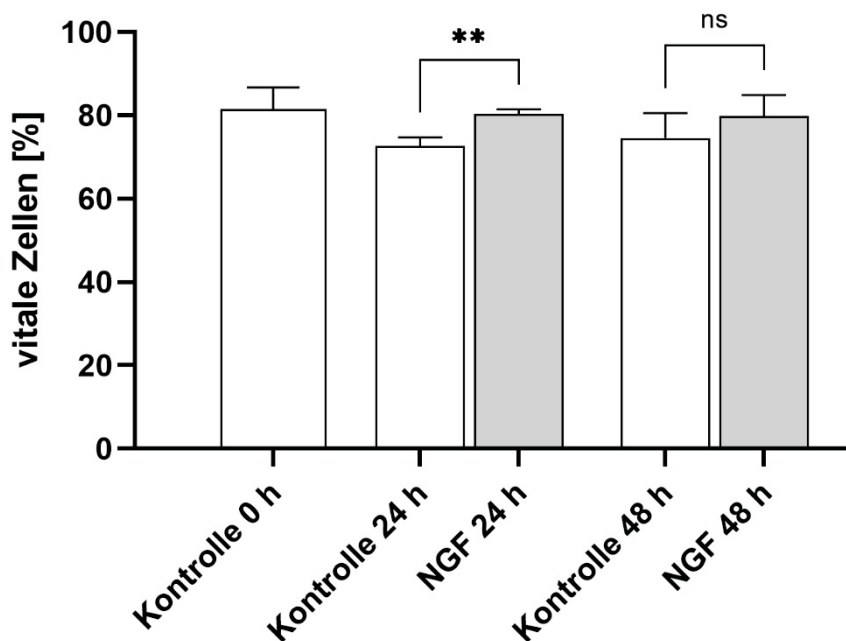


Abb. 13: Vitalität der Neurone nach 24 h und 48 h, NGF 100 ng/ml

Vergleich des prozentualen Anteils vitaler Zellen mit und ohne NGF Zugabe. Nach 24 Stunden zeigt sich eine Zunahme der Vitalitätsrate bei den mit NGF behandelten Neuronen (** $p=0,0047$). Nach 48 Stunden liegt kein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe vor. Angabe der Mittelwerte mit Standardabweichungen.

Rho Kinase Inhibitor (ROCK Inhibitor)

Direkt nach Explantation waren $77,29 \pm 16,08$ % der Zellen vital. Nach Zugabe des ROCK Inhibitors in der Konzentration von 100 μ M zeigten die Zellen eine Vitalität von $78,30 \pm 8,169$ %. In der Kontrollgruppe lag eine Vitalität von $78,43 \pm 7,855$ % vor. Dieser Unterschied war nicht signifikant ($p=0,9847$). Nach 48 Stunden zeigte sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen den ROCK Inhibitor behandelten Neuronen und den

unbehandelten Neuronen mit $72,25 \pm 8,197$ % in der ROCK Inhibitor Gruppe und $67,74 \pm 9,305$ % in der Kontrollgruppe ($p=0,5632$) (Abb. 14).

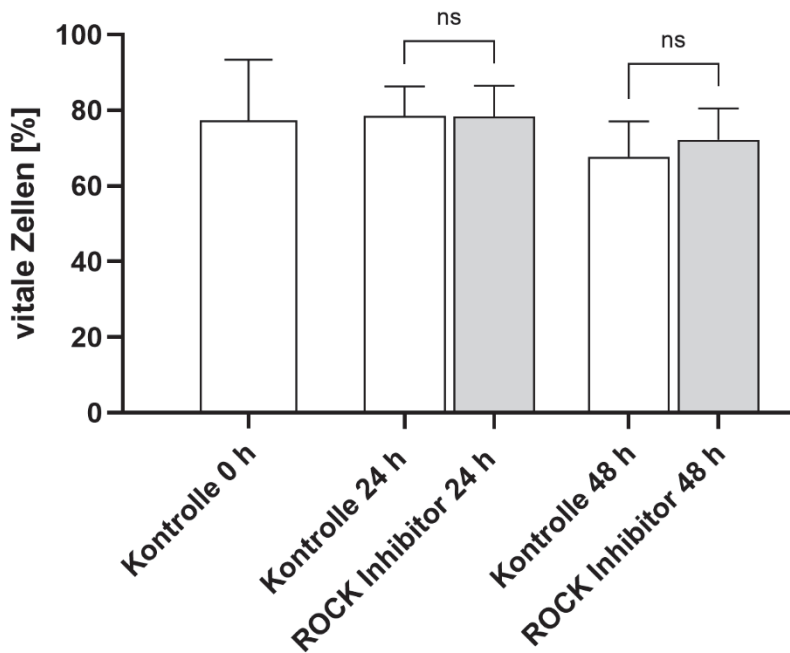


Abb. 14: Vitalität der Neurone nach 24 h und 48 h, ROCK Inhibitor, 100 μ M

Vitalitätsvergleich zwischen unbehandelten Neuronen und Neuronen, die mit ROCK Inhibitor in einer Konzentration von 100 μ M behandelt wurden. Sowohl nach 24 Stunden als auch nach 48 Stunden nach Exposition mit ROCK Inhibitor besteht kein signifikanter Unterschied bezüglich der Vitalität der Neuronen im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p>0,05$). Angabe der Mittelwerte mit Standardabweichungen.

Peroxiredoxin 2 (PRX2)

Zu Beginn des Versuchs waren $81,54 \pm 5,192$ % der Neurone vital. Im Verlauf waren nach Zugabe von PRX2 in einer Konzentration von 500 nM $77,53 \pm 5,848$ % der Zellen vital und in der Kontrollgruppe zu diesem Zeitpunkt $72,62 \pm 2,101$ %. Der Unterschied war nicht signifikant ($p=0,2428$). Auch nach 48 Stunden zeigte die Zugabe von PRX2 bezogen auf die Vitalität keinen signifikanten Einfluss im Vergleich zur Kontrolle. Die Vitalität der PRX2 behandelten Neurone lag bei $72,00 \pm 6,714$ % und die, der Kontrollneurone bei $71,33 \pm 5,531$ %, $p=0,9007$ (Abb. 15).

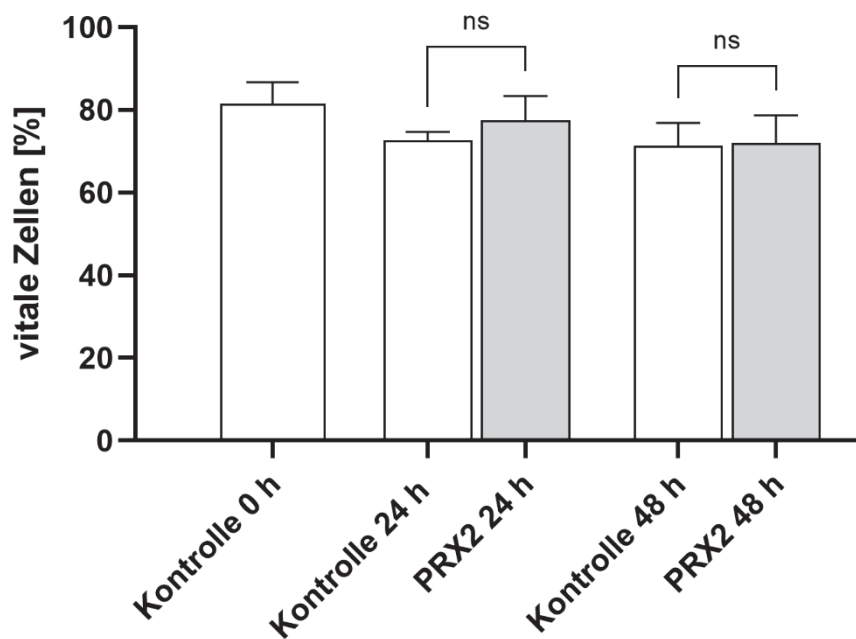


Abb. 15: Vitalität der Neurone nach 24 h und 48 h, PRX2, 500 nM

Die Zugabe von PRX2 in einer Konzentration von 500 nM führt sowohl nach 24 Stunden als auch nach 48 Stunden zu keinem signifikanten Unterschied bezogen auf den prozentualen Anteil der vitalen Neurone im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe ($p > 0,05$). Angabe der Mittelwerte mit Standardabweichungen.

Peroxiredoxin 2-Inhibitor (Conoidin A)

Der initiale Anteil von vitalen Neuronen lag bei $84,28 \pm 6,161$ %. Im Verlauf waren die Neurone, die mit Conoidin A in einer Konzentration von $5 \mu\text{M}$ behandelt wurden zu $76,62 \pm 6,935$ % vital und die unbehandelten Kontrollneurone zu $76,87 \pm 7,996$ %. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied ($p = 0,9693$). 48 Stunden nach Zugabe von Conoidin A lag der Anteil an vitalen Zellen bei $75,74 \pm 9,086$ % und in der Kontrollgruppe bei $74,61 \pm 6,095$ %. Auch hier war kein signifikanter Effekt zu sehen ($p = 0,8661$, Abb. 16).

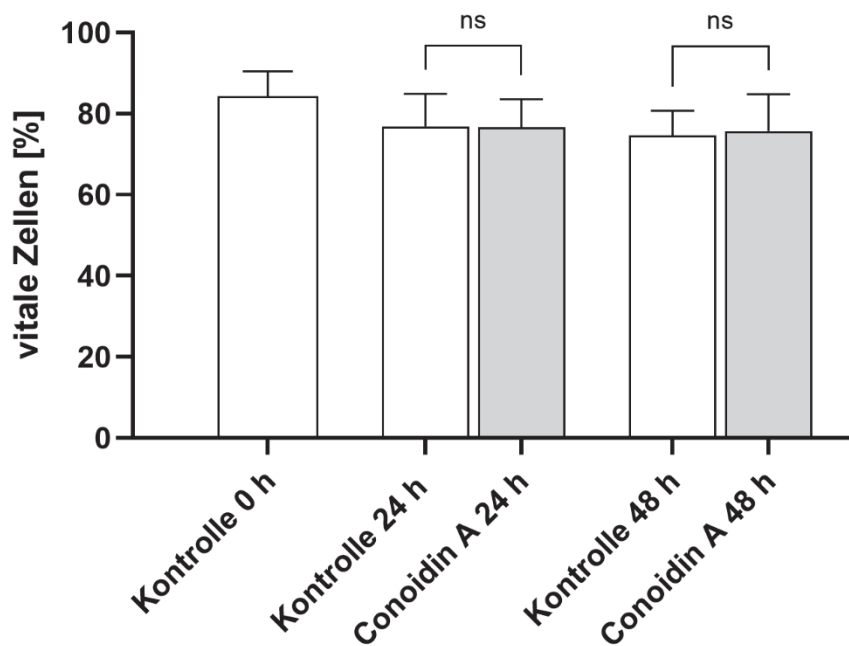


Abb. 16: Vitalität der Neurone nach 24 h und 48 h, Conoidin A, 5 μ M

Untersuchung der Effekte von Conoidin A in einer Konzentration von 5 μ M auf die Vitalität von Neuronen. Sowohl 24 Stunden als auch 48 Stunden nach Exposition mit Conoidin A besteht kein signifikanter Unterschied bezüglich der Vitalitätsrate der Neuronen im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p > 0,05$). Angabe der Mittelwerte mit Standardabweichungen.

SIRT1 Aktivator

Nach Explantation war ein Anteil von $77,29 \pm 16,09$ % der Zellen vital. 24 Stunden nachdem die Zellen mit SIRT1 Aktivator in einer Konzentration von 100 nM behandelt wurden, war ein Anteil von $72,95 \pm 6,996$ % vital. Im Vergleich zu den unbehandelten Zellen, welche zu $78,49 \pm 7,823$ % vital waren. Zwischen den beiden verglichenen Gruppen zeigte sich nach 24 Stunden kein signifikanter Effekt ($p = 0,4121$). 48 Stunden nach Zugabe von SIRT1 Aktivator war ein Anteil von $74,06 \pm 9,121$ % der Zellen vital. Die unbehandelten Neurone waren zu $67,75 \pm 9,308$ % vital. Auch hier zeigte sich kein signifikanter Einfluss von SIRT1 Aktivator auf die Vitalität der Zellen ($p = 0,4485$, Abb. 17).

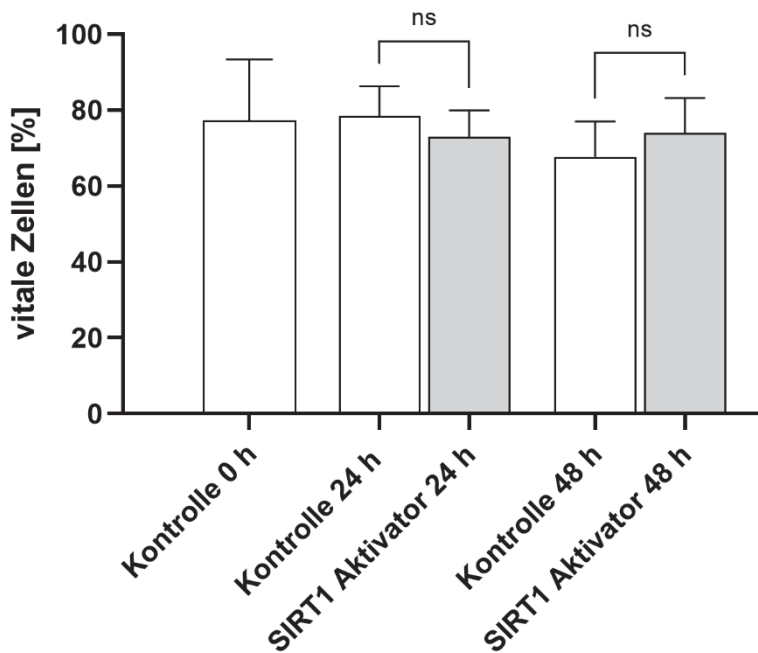


Abb. 17: Vitalität der Neurone nach 24 h und 48 h, SIRT1 Aktivator, 100 nM

Vergleich des prozentualen Anteils der vitalen unbehandelten Neuronen und vitalen Neuronen, die mit SIRT1 Aktivator behandelt wurden. Sowohl nach 24 Stunden als auch nach 48 Stunden nach Exposition mit SIRT1 Aktivator besteht kein signifikanter Unterschied bezüglich der Vitalitätsrate der Neuronen im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p > 0,05$). Angabe der Mittelwerte mit Standardabweichungen.

SIRT1 Inhibitor (Sirtinol)

Initial war ein Anteil von $77,29 \pm 16,09$ % der Zellen vital. 24 Stunden nachdem die Zellen mit SIRT1 Inhibitor in einer Konzentration von $5 \mu\text{M}$ behandelt wurden, waren $78,27 \pm 5,411$ % der Zellen vital. Die unbehandelten Kontrollneurone waren zu einem Anteil von $78,49 \pm 7,823$ % vitale. Die Zugabe von SIRT1 Inhibitor zeigte folglich nach 24 Stunden keine signifikanten Einflüsse auf die Vitalität der Neurone im Vergleich zur Kontrolle ($p = 0,9696$). 48 Stunden nach Exposition mit SIRT1 Inhibitor war der Anteil der vitalen Zellen mit $72,45 \pm 6,916$ % im Vergleich zur Kontrolle, $67,75 \pm 9,308$ %, leicht erhöht, allerdings nicht signifikant unterschiedlich ($p = 0,5206$, Abb. 18).

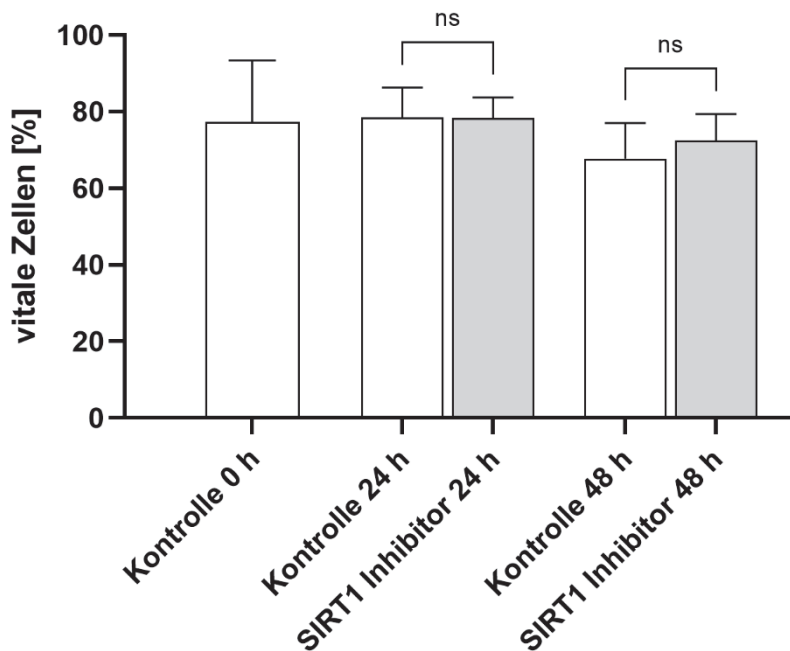


Abb. 18: Vitalität der Neurone nach 24 h und 48 h, SIRT1 Inhibitor, 5 μ M

Verglichen wurden unbehandelte Neurone mit Neuronen, die mit SIRT1 in einer Konzentration von 5 μ M behandelt wurden. Bezogen auf die Vitalität der Zellen besteht kein signifikanter Einfluss auf die Neurone im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p > 0,05$). Angabe der Mittelwerte mit Standardabweichungen.

Signal transducer and activator of transcription 3-Inhibitor (STAT3 Inhibitor)

Nach der Explantation lag der Anteil der vitalen Zellen bei $77,29 \pm 16,09$ %. Nach Zugabe von STAT3 in der Konzentration von 25 nM lag der Anteil 24 Stunden nach Inkubation bei $77,36 \pm 6,903$ % und der unbehandelten Kontrollneurone bei $78,49 \pm 7,823$ %. Es konnte also kein signifikanter Effekt von STAT3 in der Konzentration von 25 nM auf das Zellüberleben gezeigt werden ($p = 0,8603$). Auch nach 48 Stunden zeigte die Behandlung mit STAT3 keinen signifikanten Einfluss auf das Zellüberleben. Mit $69,25 \pm 11,60$ % im Vergleich zu $67,75 \pm 9,308$ % in der Kontrollgruppe war der Anteil der vitalen Zellen ähnlich ($p = 0,8692$, Abb. 19).

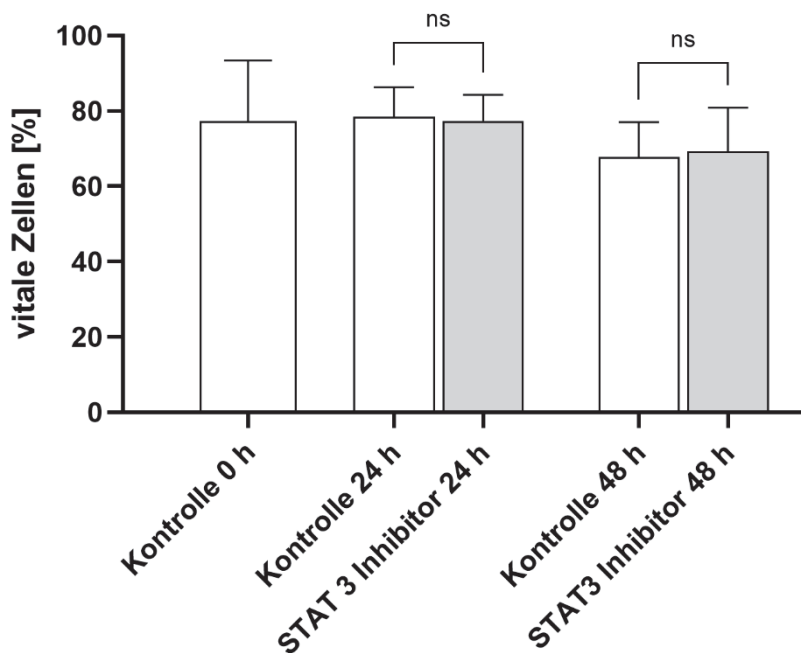


Abb. 19: Vitalität der Neurone nach 24 h und 48 h, STAT3 Inhibitor, 25 nM

Einfluss von STAT3 auf den prozentualen Anteil von vitalen Neuronen nach 24 und nach 48 Stunden. Sowohl 24 Stunden und 48 Stunden nach Exposition mit dem STAT3 Inhibitor in einer Konzentration von 25 nM besteht kein signifikanter Unterschied bezüglich der Vitalitätsrate der Neuronen im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p > 0,05$). Angabe der Mittelwerte mit Standardabweichungen

Vascular Endothelial Growth Factor A (VEGF-A)

Nach der Aussaat der Neurone lag der Anteil der vitalen Zellen bei $81,03 \pm 3,942$ %. In der Gruppe, der mit VEGF-A behandelten Neurone in einer Konzentration von 100 nM war nach 24 Stunden ein Anteil von $76,41 \pm 7,433$ % der Zellen vital. Die unbehandelten Neurone waren zu $80,14 \pm 6,177$ % vital. Dieser Unterschied zwischen den beiden Gruppen war nicht signifikant ($p = 0,5409$). Nach 48 Stunden war der Anteil der vitalen Zellen in der VEGF-A Gruppe mit $75,17 \pm 5,267$ % im Vergleich zur Kontrollgruppe mit $67,75 \pm 9,308$ % nicht different ($p = 0,8741$, Abb. 20).

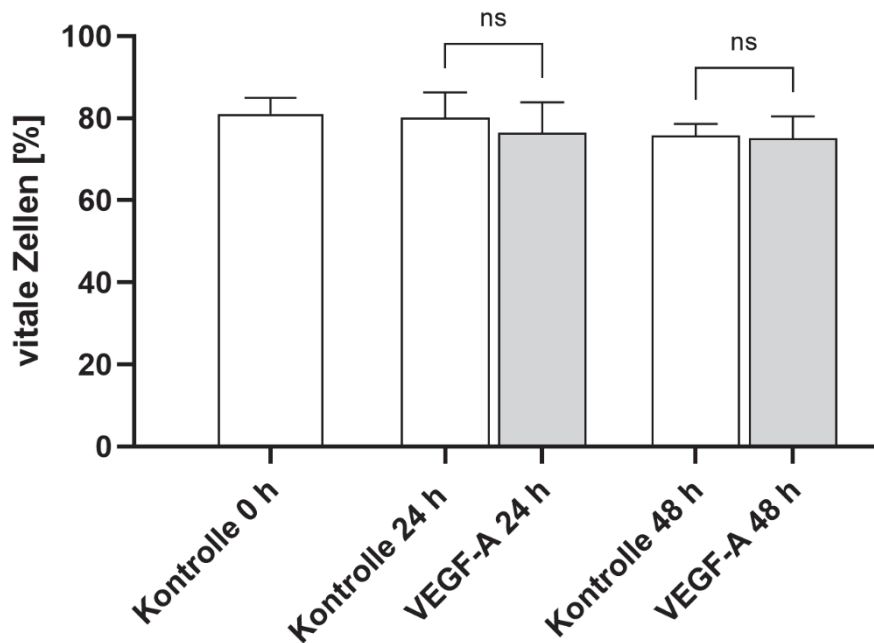


Abb. 20: Vitalität der Neurone nach 24 h und 48 h, VEGF-A, 100 nM

Vergleich des prozentualen Anteils der vitalen Zellen zwischen den unbehandelten Neuronen und den Neuronen, die mit VEGF-A in einer Konzentration von 100 nM behandelt wurden. Sowohl nach 24 Stunden als auch nach 48 Stunden nach Exposition mit dem VEGF-A besteht kein signifikanter Unterschied bezüglich der Vitalitätsrate der Neuronen im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p > 0,05$). Angabe der Mittelwerte mit Standardabweichungen.

Phosphoinositid 3 Kinase Inhibitor (PI3K Inhibitor)

Initial nach Kultivierung der Neurone war ein Anteil von $83,38 \pm 2,509$ % der Zellen vital. Die mit PI3K Inhibitor in einer Konzentration von $5 \mu\text{M}$ behandelten Neurone zeigten 24 Stunden nach Zugabe von PI3K Inhibitor $79,00 \pm 3,994$ % vitale Zellen. In der Kontrollgruppe lag die Vitalität bei $81,16 \pm 4,682$ %. Nach 48 Stunden lag die Vitalität bei den PI3K Inhibitor behandelten Zellen bei $76,59 \pm 3,637$ % und in der Kontrollgruppe bei $72,94 \pm 2,877$ %. Sowohl nach 24 Stunden als auch nach 48 Stunden war der Einfluss von PI3K Inhibitor auf die Vitalität der Zellen folglich nicht signifikant ($p = 0,5773$ und $p = 0,2446$, Abb. 21).

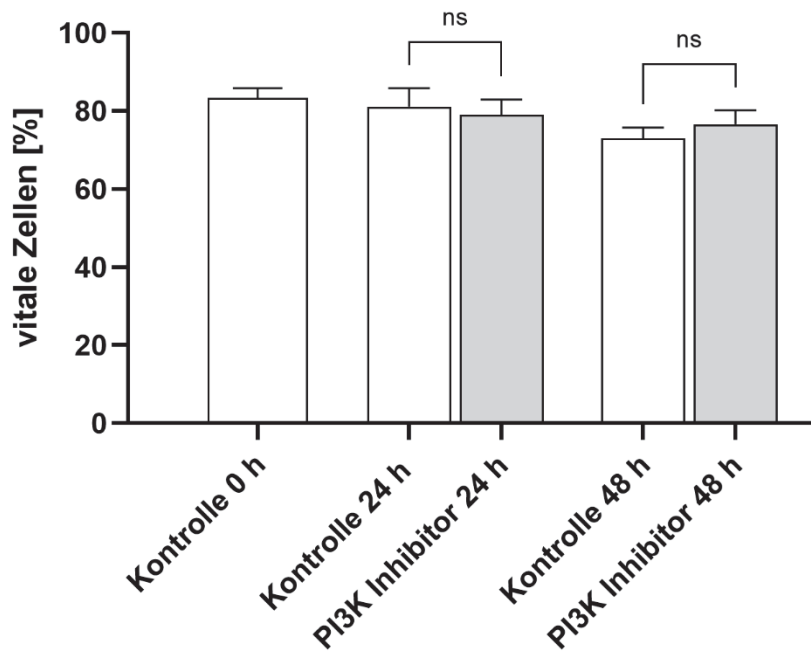


Abb. 21: Vitalität der Neurone nach 24 h und 48 h, PI3K Inhibitor, 5 μ M

Vergleich des prozentualen Anteils der vitalen Zellen mit und ohne PI3K Inhibitor in einer Konzentration von 5 μ M. Die Vitalität ändert sich nicht unter Zugabe von PI3K Inhibitor im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p > 0,05$). Angabe der Mittelwerte mit Standardabweichungen.

Mittels der Trypanblau Färbung konnte die Vitalität der Nervenzellen quantifiziert werden. Es konnte bewiesen werden, dass nach 48 Stunden ein Großteil der Neurone vital ist. Zudem konnte ein Vergleich bezogen auf die prozentuale Vitalität zwischen behandelten und unbehandelten Neuronen durchgeführt werden.

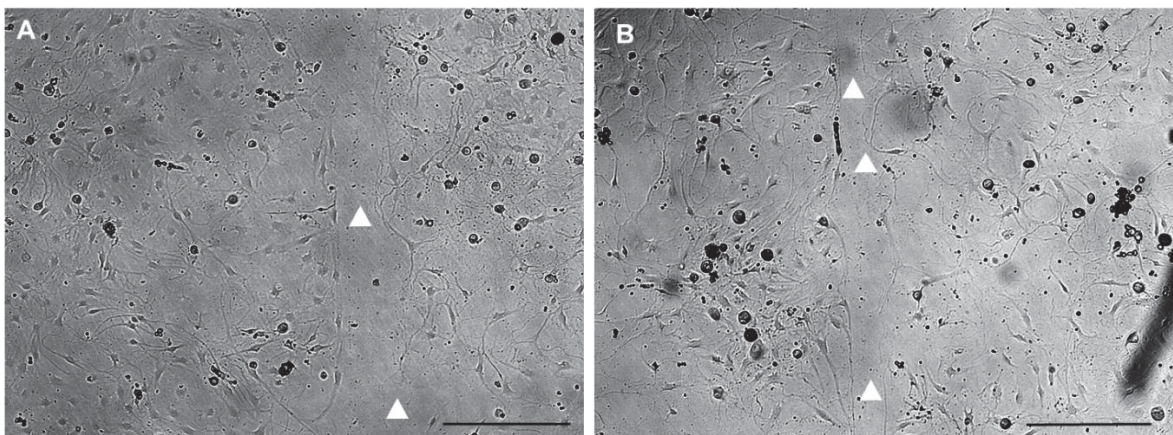
Zusammenfassend lässt sich sagen, dass keine der verwendeten Substanzen in der genutzten Konzentration einen negativen Einfluss auf das neuronale Zellüberleben hatte. Lediglich die Zugabe von NGF in der Konzentration von 100 ng/ml führte nach 24 Stunden signifikant zu einer vermehrten Anzahl von vitalen Zellen im Vergleich zur Kontrolle und damit zu einem verstärkten Überleben der Neuronen nach 24 Stunden.

3.3 ANALYSE DER NERVENREGENERATION IM SCRATCH ASSAY

Der *Scratch Assay* zeigt einen möglichen Einfluss der verschiedenen Substanzen auf das Wachstum der Nervenfasern nach Verletzung der Fasern. Jeweils 24 Stunden und 48 Stunden nach Zugabe der zu untersuchenden Substanzen und nach Durchführung des *Scratch Assays* wurde die Gesamtnervenfaserlänge (GNFL) der behandelten Neurone mittels *NeuronJ* vermessen und mit der GNFL der unbehandelten Neurone verglichen. Pro Substanz und Zeitpunkt wurden insgesamt $n=9$ *wells* untersucht und pro *well* $n=3$ Fotos ausgewertet. Für jede Substanz werden die Ergebnisse im Folgenden als Boxplots visualisiert (Abb. 22 – 31), jeweils unter Angabe des Medians, des oberen und unteren Quartils sowie mittels der *Whisker* die Minimal- und Maximalwerte der Messungen.

Nerve growth factor (NGF)

Die Behandlung der Nervenzellen mit *NGF* in der Konzentration von 100 ng/ml im *Scratch Assay* führte sowohl nach 24 Stunden als auch nach 48 Stunden (Abb. 22) zu keiner statistisch signifikanten Zunahme der GNFL im Vergleich zur Kontrolle. Die GNFL der *unbehandelten* Neurone wurde im Mittel mit $2913,17 \pm 880,01 \mu\text{m}$ gemessen, wohingegen die mit *NGF* behandelten Neurone eine GNFL von $4106,67 \pm 1487,13 \mu\text{m}$ aufwiesen. Die Behandlung mit *NGF* zeigt nach 24 Stunden einen statistischen Trend ($p=0,054$) in Richtung Zunahme der GNFL im Vergleich zur GNFL von unbehandelten Neuronen. Nach 48 Stunden wurde bei den unbehandelten Neuronen im Mittel eine GNFL von $4293,89 \pm 734,54 \mu\text{m}$ gemessen und im Vergleich dazu bei den mit *NGF* behandelten Neuronen wurde im Mittel eine GNFL von $5990,11 \pm 2466,58 \mu\text{m}$ gemessen. Auch nach 48 Stunden bestätigt sich der statistische Trend, dass *NGF* zu einer Zunahme der GNFL im *Scratch Assay* führt ($p=0,065$).



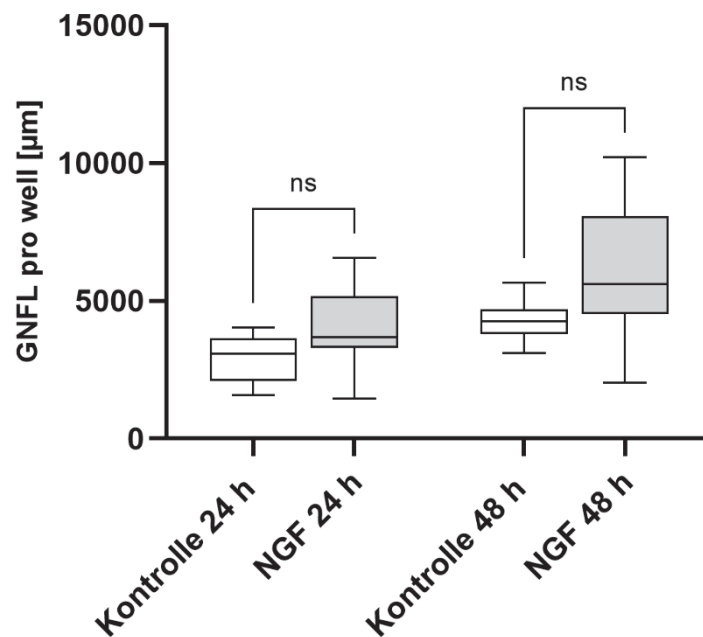


Abb. 22: GNFL im Scratch Assay 24 h und 48 h nach NGF Zugabe, 100 ng/ml

Oben: (A) unbehandelte Neurone 48 h, (B) Neurone 48 h nach *NGF* Zugabe. Maßstab: 200 µm
Darstellung der GNFL-Messung (in µm) (A) 24 Stunden und (B) 48 Stunden nach Durchführung des Scratch Assays im Vergleich zwischen unbehandelten Neuronen und Neuronen, die mit *NGF* [100 ng/ml] behandelt wurden. Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied ($p=0,054$, $p=0,065$) zwischen den Gruppen; lediglich ein statistischer Trend im Sinne einer Zunahme der GNFL durch Behandlung mit *NGF* wird sichtbar. Median Kontrolle 24 h: 3066 µm, NGF 24 h: 3679 µm, Kontrolle 48 h 4271 µm, NGF 48 h 5601 µm.

Rho Kinase Inhibitor (ROCK Inhibitor)

Die Immunfluoreszenzfärbung zeigt Neurone, die nach Durchführung des *Scratch Assays* 48 Stunden sowohl ohne als auch mit ROCK Inhibitor in einer Konzentration von 100 µM behandelt wurden (Abb. 23, oben). Anhand der Färbung ist zu sehen, dass vermehrt Nervenfasern der Neurone, die mit ROCK Inhibitor behandelt wurden, in das Scratch Areal eingewachsen sind. Bei der Auswertung der GNFL mittels *NeuronJ* zeigte sich, dass die Zugabe von ROCK Inhibitor in der Konzentration von 100 µM im *Scratch Assay* weder nach 24 Stunden noch nach 48 Stunden (Abb. 23, unten) zu einer statistisch signifikanten Zunahme der GNFL im Vergleich zu den unbehandelten Neuronen führte. Nach 24 Stunden betrug die GNFL der unbehandelten Neurone im Mittel $3689,95 \pm 2355,10$ µm und die GNFL, der mit ROCK Inhibitor behandelten Neurone im Mittel $5298,46 \pm 3487,81$ µm ($p=0,2684$). Nach 48 Stunden war die GNFL der unbehandelten Neurone $5410,06 \pm 4012,32$ µm und die GNFL der mit ROCK Inhibitor behandelten Neurone $7921,75 \pm 5215,27$

μm ($p= 0,2690$). Die Zugabe von ROCK Inhibitor in der Konzentration von $100 \mu\text{M}$ hat in diesem Experiment keinen signifikanten Einfluss auf die GNFL ergeben.

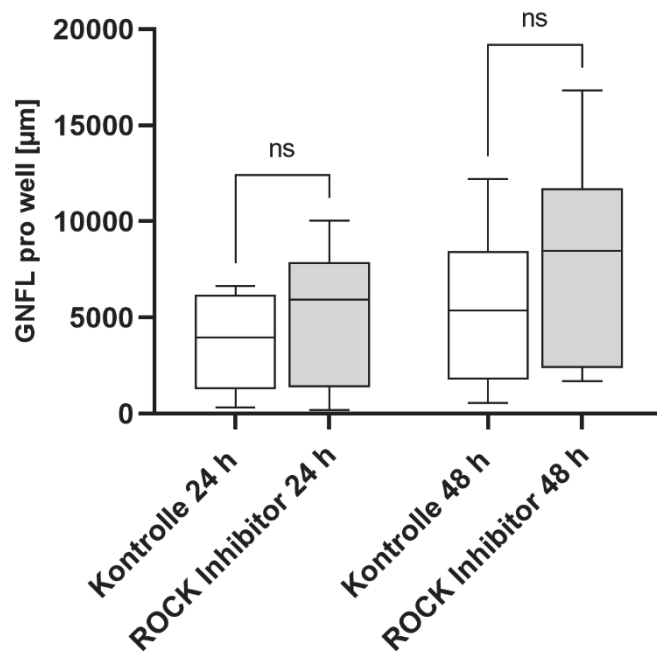
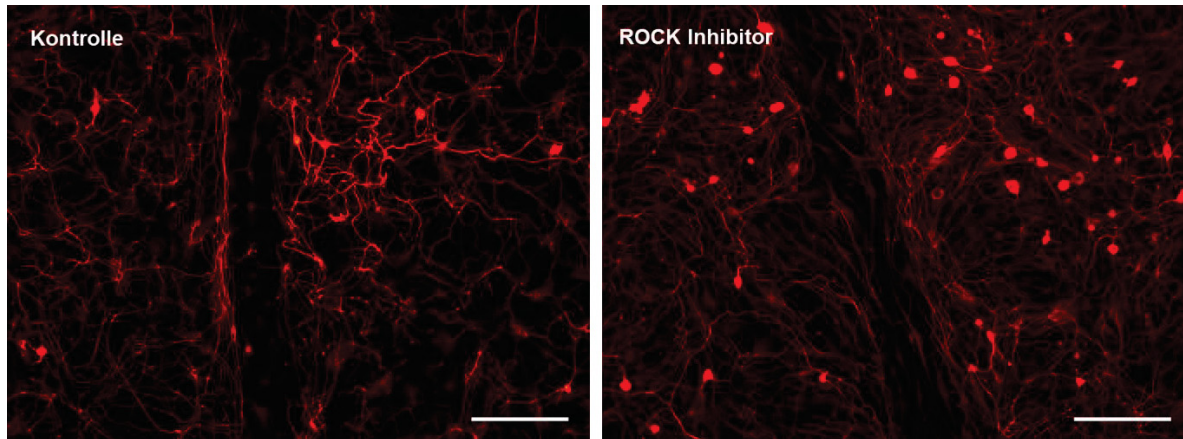


Abb. 23: β -III Tubulin Färbung, Scratch Assay, ROCK Inhibitor, $100 \mu\text{M}$ und GNFL im Scratch Assay 24 h und 48 h nach ROCK Inhibitor Zugabe

Oben: Immunfluoreszenzfärbung mit β -III Tubulin 48 Stunden nach Zugabe von ROCK Inhibitor und ohne Zugabe. Bei den Neuronen, die 48 Stunden vorher mit ROCK Inhibitor behandelt wurden, sind vermehrt Nervenfasern in das *Scratch* Areal eingewachsen. Maßstab: $200 \mu\text{m}$

Unten: Messung der GNFL 24 und 48 Stunden bei unbehandelten und mit ROCK Inhibitor behandelten Neuronen in der Konzentration von $100 \mu\text{M}$. Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen. Median Kontrolle 24 h: $3951 \mu\text{m}$, ROCK Inhibitor 24 h: $5937 \mu\text{m}$, $p=0,2684$, Median Kontrolle 48 h: $5362 \mu\text{m}$, ROCK Inhibitor 48 h: $8466 \mu\text{m}$, $p= 0,2690$

Peroxiredoxin 2 (PRX2)

Die Zugabe von PRX2 führte sowohl nach 24 Stunden als auch nach 48 Stunden (Abb. 24) im *Scratch Assay* zu keiner signifikanten Änderung der GNFL mit $3036,67 \pm 755,685 \mu\text{m}$ bei den unbehandelten Neuronen und $2588,67 \pm 702,174 \mu\text{m}$ bei den Neuronen, die mit PRX2 behandelt wurde ($p=0,2111$). 48 Stunden nach PRX2 Zugabe wurde eine GNFL von $4198,89 \pm 746,536 \mu\text{m}$ in der Kontrollgruppe und $4236,28 \pm 1050,08 \mu\text{m}$ in der PRX2 Gruppe gemessen. Auch dieser Unterschied ist nicht signifikant ($p=0,9317$).

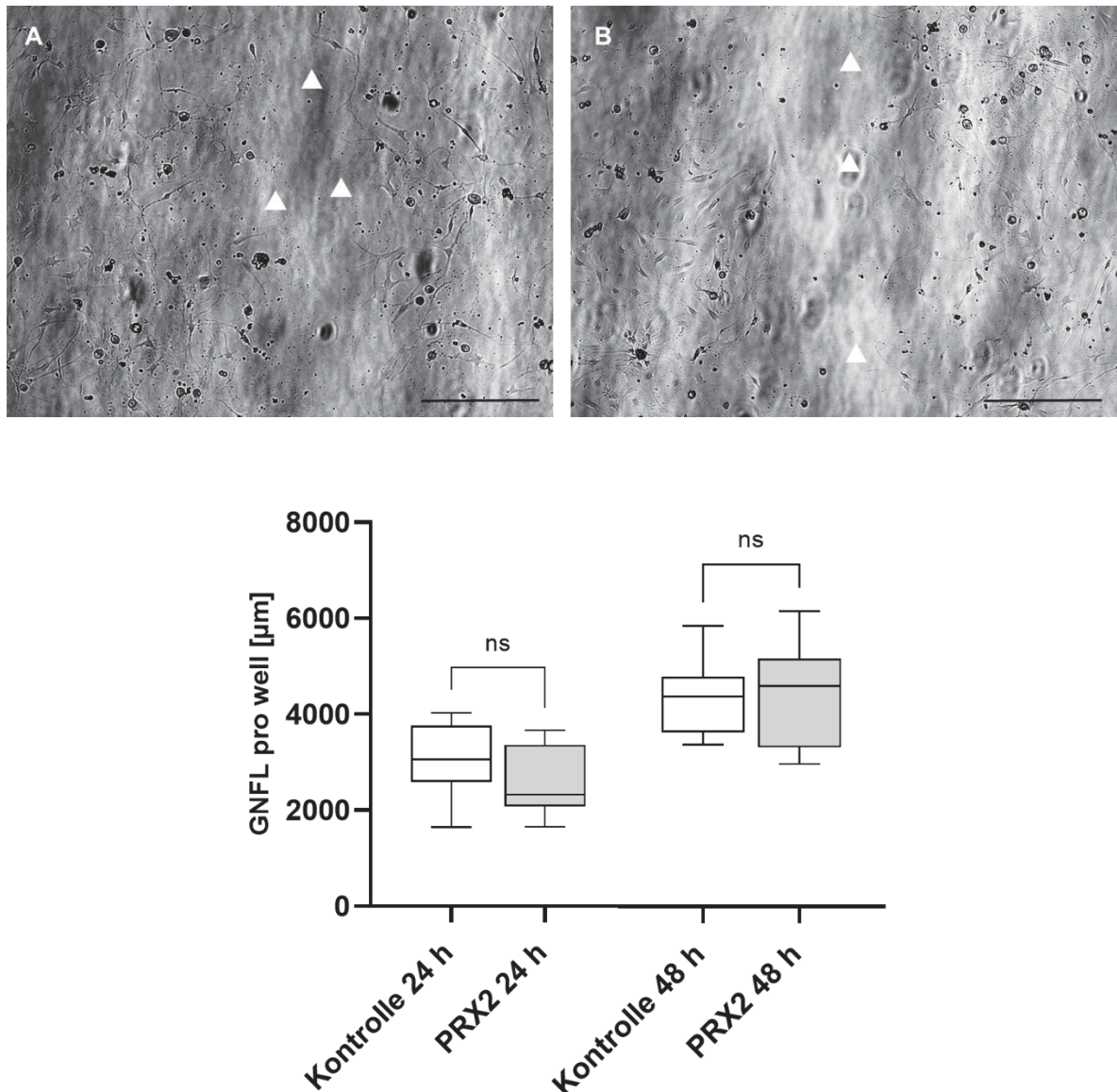


Abb. 24: GNFL im Scratch Assay 24 h und 48 h nach PRX2 Zugabe, 500 nM

Oben: (A) Kontrollneurone nach 48 h, (B) Neurone 48 h nach NGF Zugabe. Maßstab: 200 μm
Unten: Darstellung GNFL Messung (in μm) (A) 24 Stunden und (B) 48 Stunden nach Durchführung des Scratch Assays im Vergleich zwischen unbehandelten Neuronen und Neuronen, die mit PRX2 in der Konzentration von 500 nM behandelt wurden. Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden verglichenen Gruppen ($p=0,2111$, $p=0,9317$). Median Kontrolle 24 h: 3066 μm , PRX2 24 h 2321 μm , Median Kontrolle 48 h: 4244 μm , PRX 48 h: 4462 μm

Peroxiredoxin 2 Inhibitor (Conoidin A)

Sowohl nach 24 Stunden als auch nach 48 Stunden führte die Zugabe von Conoidin A in einer Konzentration von 5 μM zu einer signifikanten Abnahme der GNFL im Vergleich zu den unbehandelten Neuronen mit $1285,89 \pm 382,098 \mu\text{m}$ und bei der Kontrolle mit $2652,11 \pm 823,283 \mu\text{m}$ pro well ($p=0,0004$). Auch nach 48 Stunden war die GNFL der Neurone, die mit Conoidin A behandelt wurden mit $2065,70 \pm 584,206 \mu\text{m}$ signifikant geringer als bei die GNFL der unbehandelten Neurone mit $3675,78 \pm 1042,74$ ($p=0,0009$) (Abb. 25).

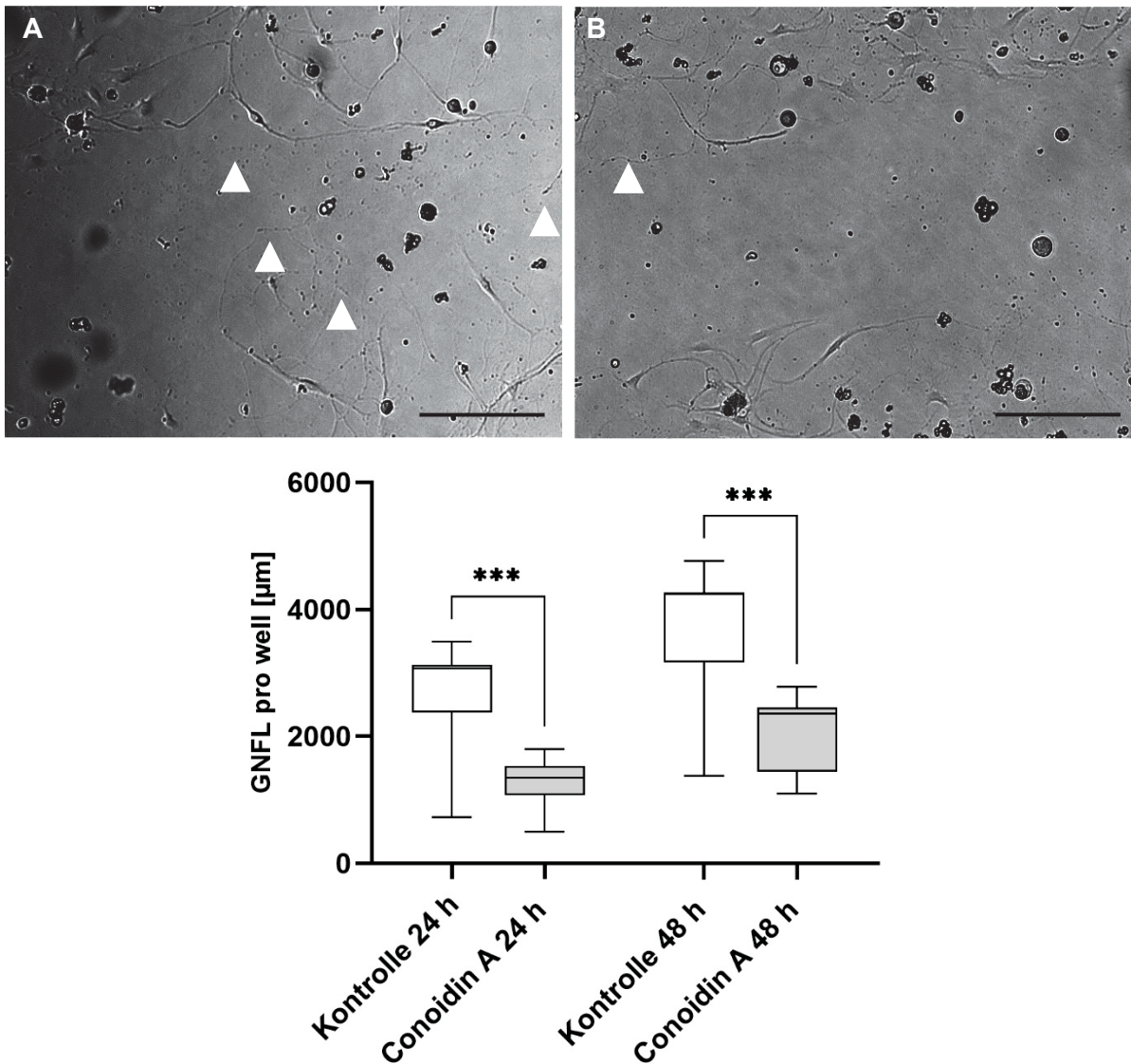


Abb. 25: GNFL im Scratch Assay 24 h und 48 h nach Conoidin A Zugabe, 5 μM

Oben: A unbehandelte Neurone 48 h, B Neurone 48 h nach Conoidin A Zugabe. Maßstab: 100 μm
Unten: Messung der GNFL ohne und mit Zugabe von Conoidin A in einer Konzentration von 5 μM . Sowohl nach 24 Stunden als auch nach 48 Stunden zeigt sich eine signifikante Abnahme der GNFL bei den Neuronen, die mit Conoidin A behandelt wurden ($p=0,0004$, $p=0,0009$). Median Kontrolle 24 h: 3066 μm , Conoidin A 24 h 1354 μm , Median Kontrolle 48 h: 4244 μm , Conoidin A 48 h: 2360 μm .

SIRT1 Aktivator

Die Zugabe von SIRT1 Aktivator in einer Konzentration von 100 nM hat nicht zu einer Änderung der GNFL geführt. Nach 24 Stunden lag im Mittel eine GNFL pro *well* von $4594,43 \pm 1488,14 \mu\text{m}$ bei den Neuronen, die mit SIRT1 Aktivator behandelt wurden vor. Die unbehandelten Neurone zeigten eine GNFL pro *well* von $3758,16 \pm 1336,42 \mu\text{m}$. Ein statistischer Unterschied lag nicht vor ($p=0,2277$). Auch 48 Stunden nachdem SIRT1 Aktivator zu den Neuronen gegeben wurde, war die Messung von $8276,39 \pm 1999,37 \mu\text{m}$ im Vergleich zur Kontrolle mit einer GNFL von $6444,41 \pm 2999,44 \mu\text{m}$ statistisch gesehen nicht different ($p=0,1469$, Abb. 26).

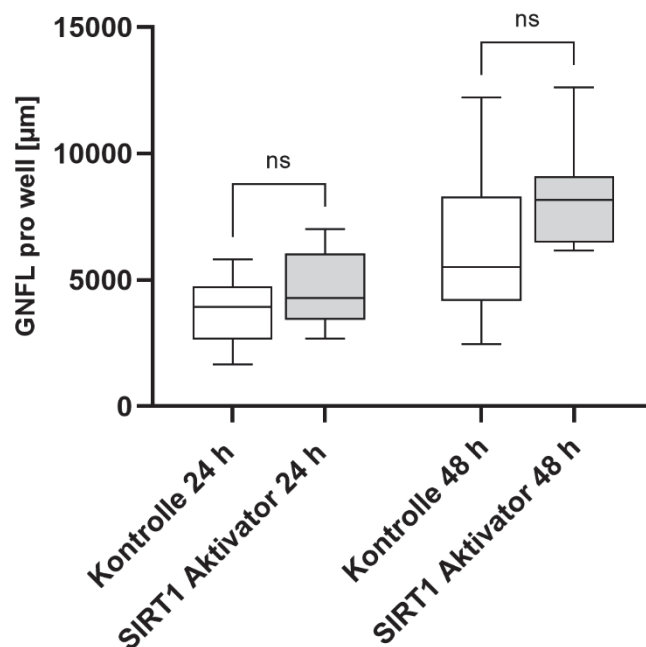
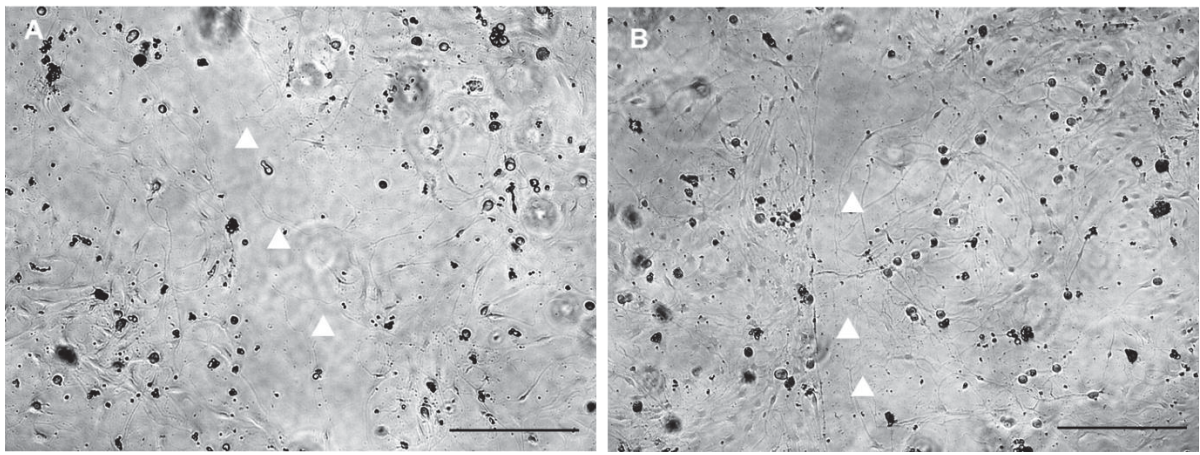


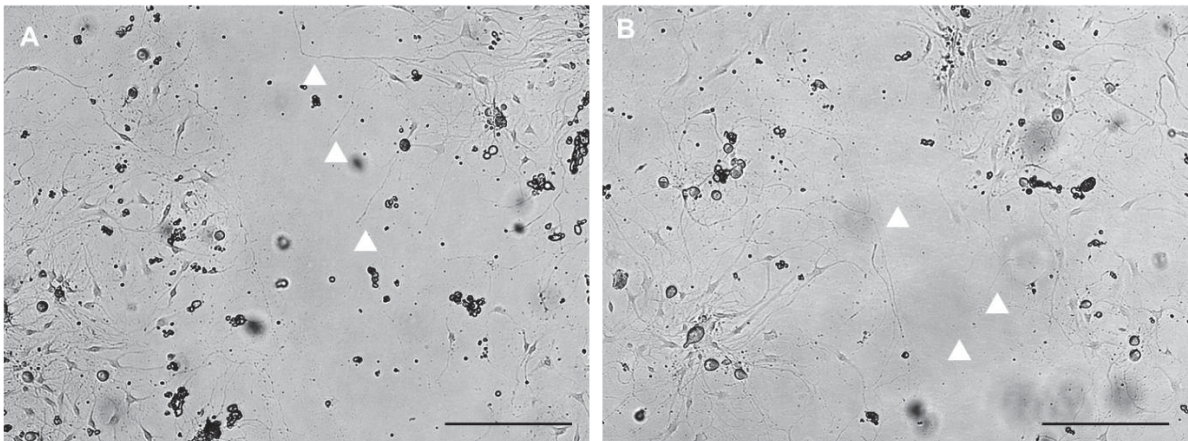
Abb. 26: GNFL im Scratch Assay 24 h und 48 h nach SIRT Aktivator Zugabe, 100 nM

Oben: (A) unbehandelte Kontrollneurone, (B) Neurone, die 48 h zuvor mit SIRT1 Aktivator behandelt wurden. Maßstab: 200 μm . Unten: Quantifizierung der GNFL (in μm) 24 Stunden und 48 Stunden

nach Durchführung des Scratch Assays und Zugabe von SIRT1 Aktivator in einer Konzentration von 100 nM im Vergleich zu unbehandelten Neuronen. Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen ($p=0,2277$, $p=0,1469$). Median Kontrolle 24 h: 3926 μm , Median SIRT1 Aktivator 24 h 4280 μm , Median Kontrolle 48 h: 5517 μm , SIRT1 Aktivator 48 h: 8163 μm .

SIRT1 Inhibitor (Sirtinol)

Die Zugabe von SIRT1 Inhibitor führte in der Konzentration von 5 μM weder nach 24 Stunden noch nach 48 Stunde zu einer signifikanten Änderung der GNFL im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 27). 24 Stunden nach Zugabe von SIRT1 Inhibitor wurde eine GNFL pro *well* von $2782,08 \pm 1698,62 \mu\text{m}$ gemessen und bei den unbehandelten Kontrollneuronen eine GNFL von $3354,87 \pm 1534,86 \mu\text{m}$. Dieser Unterschied ist nicht signifikant ($p= 0,2224$). Auch nach 48 Stunden zeigte sich zwischen den SIRT1 behandelten Neuronen mit einer GNFL von $5557,33 \pm 3976,27$ im Vergleich zur Kontrolle mit einer GNFL von $5123,26 \pm 3159,83 \mu\text{m}$ kein signifikanter Unterschied ($p= 0,7962$).



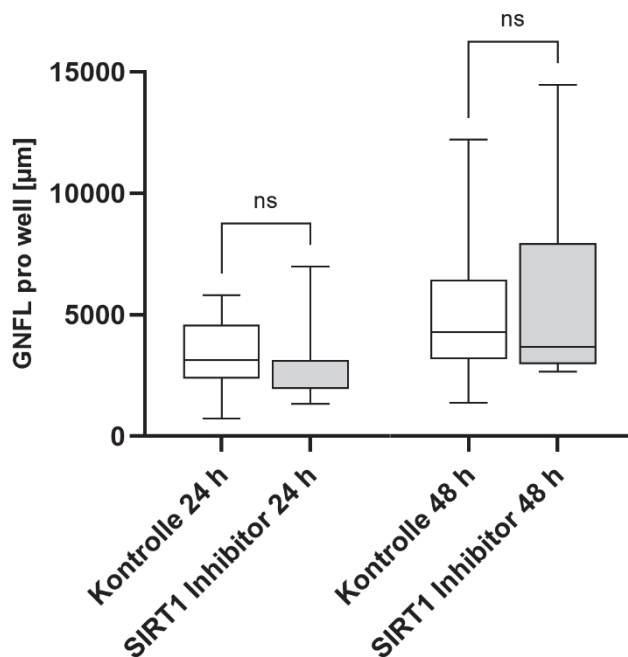


Abb. 27: GNFL im Scratch Assay 24 h und 48 h nach SIRT Inhibitor Zugabe, 5 µM

Oben: Scratch Assay, (A) unbehandelte Neurone, (B) mit SIRT1 Inhibitor behandelte Neurone nach 48 h. Maßstab:200 µm. Unten: Darstellung der Quantifizierung der GNFL (in µm) 24 Stunden und 48 Stunden nach Durchführung des Scratch Assays und Zugabe von SIRT1 Inhibitor in einer Konzentration von 5 µM im Vergleich zu unbehandelten Neuronen. Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden verglichenen Gruppen ($p=0,2224$, $p=0,7962$). Median Kontrolle 24 h: 3127 µm, Median SIRT1 Inhibitor 24 h 1980 µm, Median Kontrolle 48 h: 4271 µm, SIRT1 Inhibitor 48 h: 3677 µm

Signal transducer and activator of transcription 3-Inhibitor (STAT3 Inhibitor)

Die Inhibition von STAT3 durch Zuführung des STAT3 Inhibitors in einer Konzentration von 25 nM führte im *Scratch Assay* zu einer signifikanten Abnahme der GNFL im Vergleich zu den unbehandelten Neuronen (Abb. 28). Nach 24 Stunden war die GNFL bei den mit STAT3 Inhibitor behandelten Neuronen $2298,87 \pm 2062,01$ µm und bei der unbehandelten Kontrolle $6355,06 \pm 2203,45$ µm. Die Abnahme der GNFL ist signifikant ($p=0,0038$). Auch 48 Stunden nach STAT3 Inhibitor Zugabe war die GNFL pro well mit $2270,41 \pm 1476,40$ µm signifikant niedriger als bei der Kontrolle mit einer GNFL pro well von $10132,01 \pm 4470,64$ µm ($p=0,0001$).

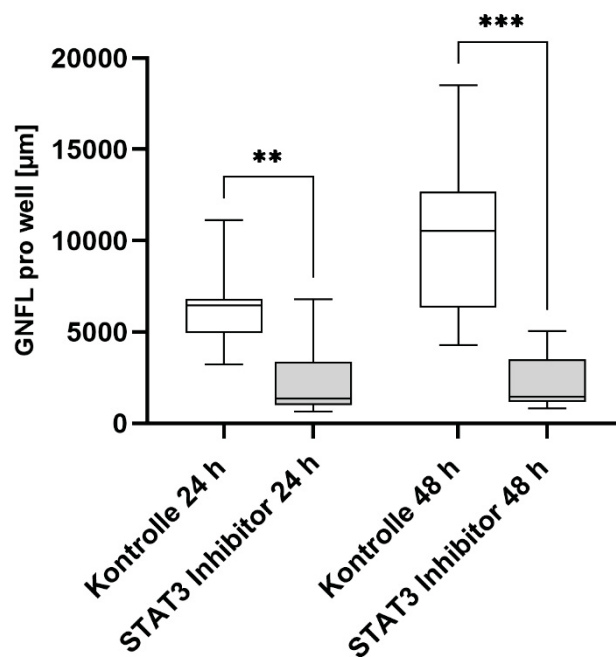
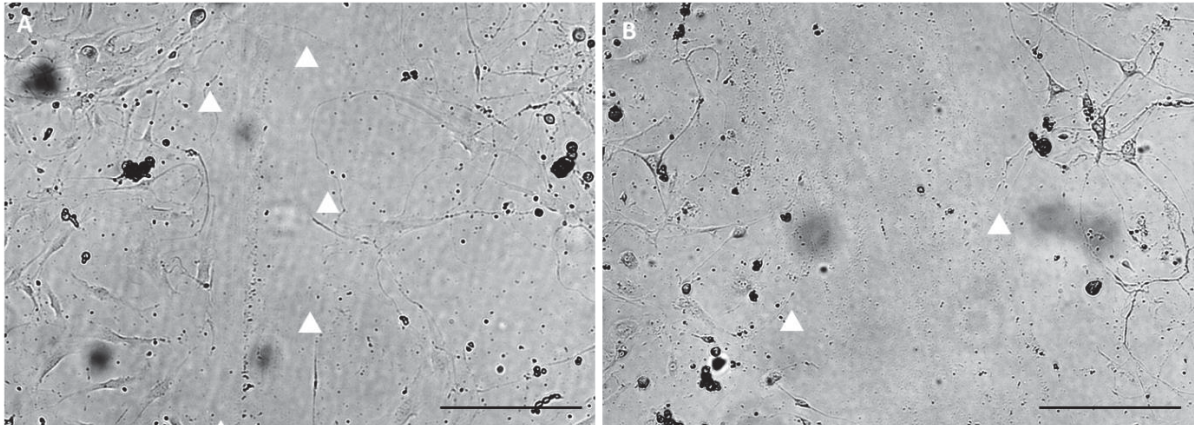


Abb. 28: GNFL im Scratch Assay 24 h und 48 h nach STAT3 Inhibitor Zugabe, 25 nM

Oben: Scratch Assay, A unbehandelte Neurone, B Neurone 48 h nach STAT3 Inhibitor Zugabe, Maßstab 200 µm.

Unten: Messung der GNFL 24 und 48 Stunden nach Durchführung des Scratch Assays im Vergleich zwischen unbehandelten Neuronen und Neuronen, die mit STAT3 Inhibitor in einer Konzentration von 25 nM behandelt wurden. Es zeigt sich zu beiden Zeitpunkten eine signifikante Abnahme der GNFL bei den Neuronen, die mit STAT3 Inhibitor behandelt wurden, sowohl nach 24 h $p < 0,003$, als auch nach 48h $p = 0.0001$. Zur Darstellung kommen hier die Mediane (Kontrolle 24 h 6470 µm, STAT3 Inhibitor 24 h 1340 µm, Kontrolle 48 h 10521 µm, STAT3 Inhibitor 48 h 1453 µm) der Messungen pro well.

Vascular Endothelial Growth Factor A (VEGF-A)

Die Behandlung der Neurone mit VEGF-A in einer Konzentration von 100 nM führte im *Scratch Assay* sowohl nach 24 Stunden als auch nach 48 Stunden nicht zu einer signifikanten Änderung der GNFL im Vergleich zu den unbehandelten Neuronen (Abb. 29).

Nach 24 Stunden lag bei den VEGF-A behandelten Neuronen eine GNFL pro well 2539,78 \pm 448,768 μ m vor und bei der Kontrolle eine GNFL von 3036,67 \pm 755,685 μ m vor. Dieser Unterschied war nicht signifikant ($p=0,1092$). Nach 48 Stunden zeigte die GNFL bei den mit VEGF-A behandelten Neuronen mit einer GNFL von 3510,22 \pm 626,479 μ m im Vergleich zur Kontrolle mit 4198,89 \pm 746,536 μ m einen statistischen Trend in Reduktion der GNFL unter Zugabe von VEGF-A an ($p=0,05$).

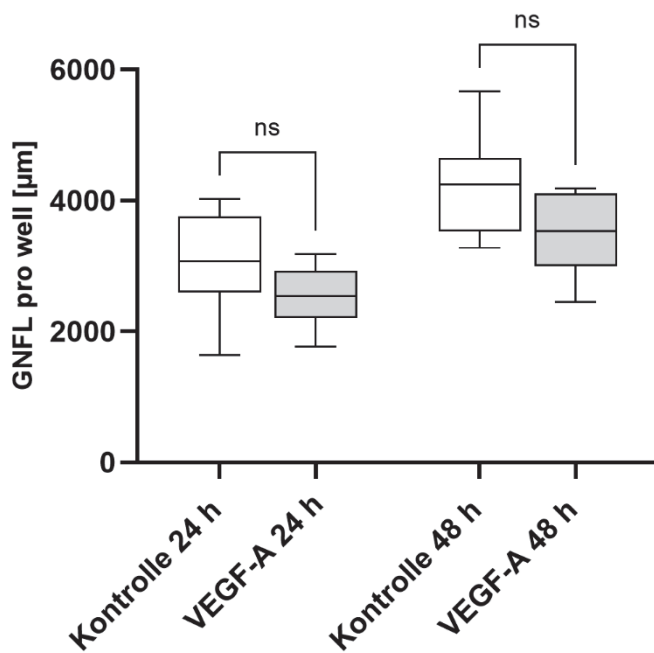
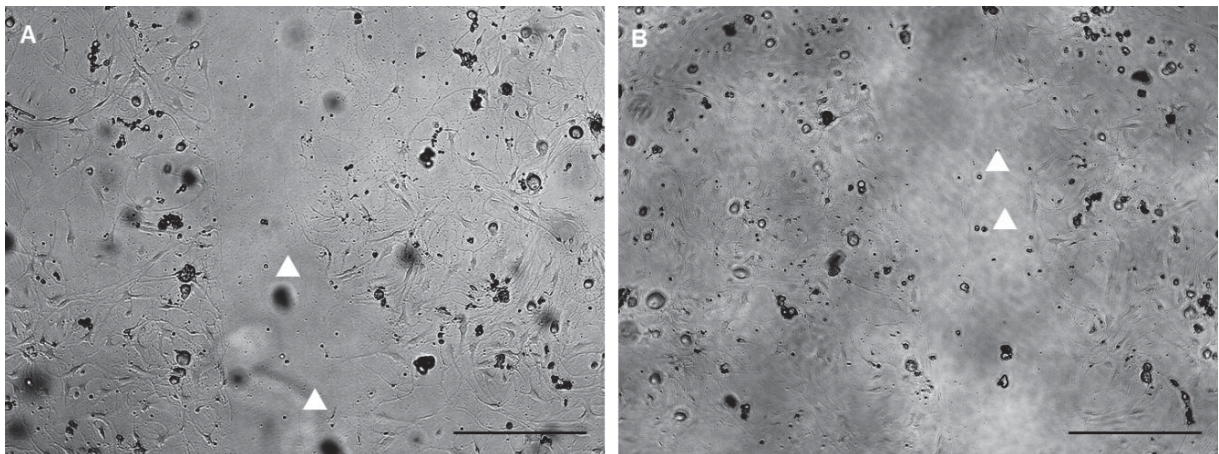


Abb. 29: GNFL im Scratch Assay 24 h und 48 h nach VEGF-A Zugabe, 100 nM

Oben: (A) Kontrollneurone unbehandelt, (B) Neurone 48 h nach VEGF-A Behandlung, Maßstab: 200 μ m. Unten: Die Messung der GNFL pro well ergab nach 24 Stunden keinen signifikanten Unterschied zwischen VEGF-A behandelten Neuronen und der Kontrolle ($p=0,1092$). Nach 48 Stunden zeigte sich ein statistischer Trend, der in Richtung Reduktion der GNFL bei VEGF-A Behandlung hindeutet ($p=0,05$). Die Mediane der GNFL Messungen (Kontrolle 24h 3036 μ m, VEGF-A 24 h 2543 μ m, Kontrolle 48 h 4244 μ m, VEGF-A 48 h 3536 μ m) werden dargestellt.

Phosphoinositid 3 Kinase Inhibitor (PI3K Inhibitor)

Die Zugabe von PI3K Inhibitor in der Konzentration von 5 μM führte nach 24 Stunden nicht zu einer signifikanten Änderung der GNFL im Vergleich zur Kontrolle. Bei der Kontrolle ergab die Messung der GNFL $4390,91 \pm 1628,63 \mu\text{m}$ und bei Zugabe von PI3K Inhibitor $6049,12 \pm 3075,93 \mu\text{m}$ ($p= 0,2581$). Nach 48 Stunden war die GNFL bei den Neuronen, die mit PI3K Inhibitor behandelt wurden mit $10371,5 \pm 3690,99 \mu\text{m}$ signifikant höher als die GNFL der Kontrollgruppe mit $6872,77 \pm 2812,06 \mu\text{m}$ ($p= 0,038$ (Abb. 30).

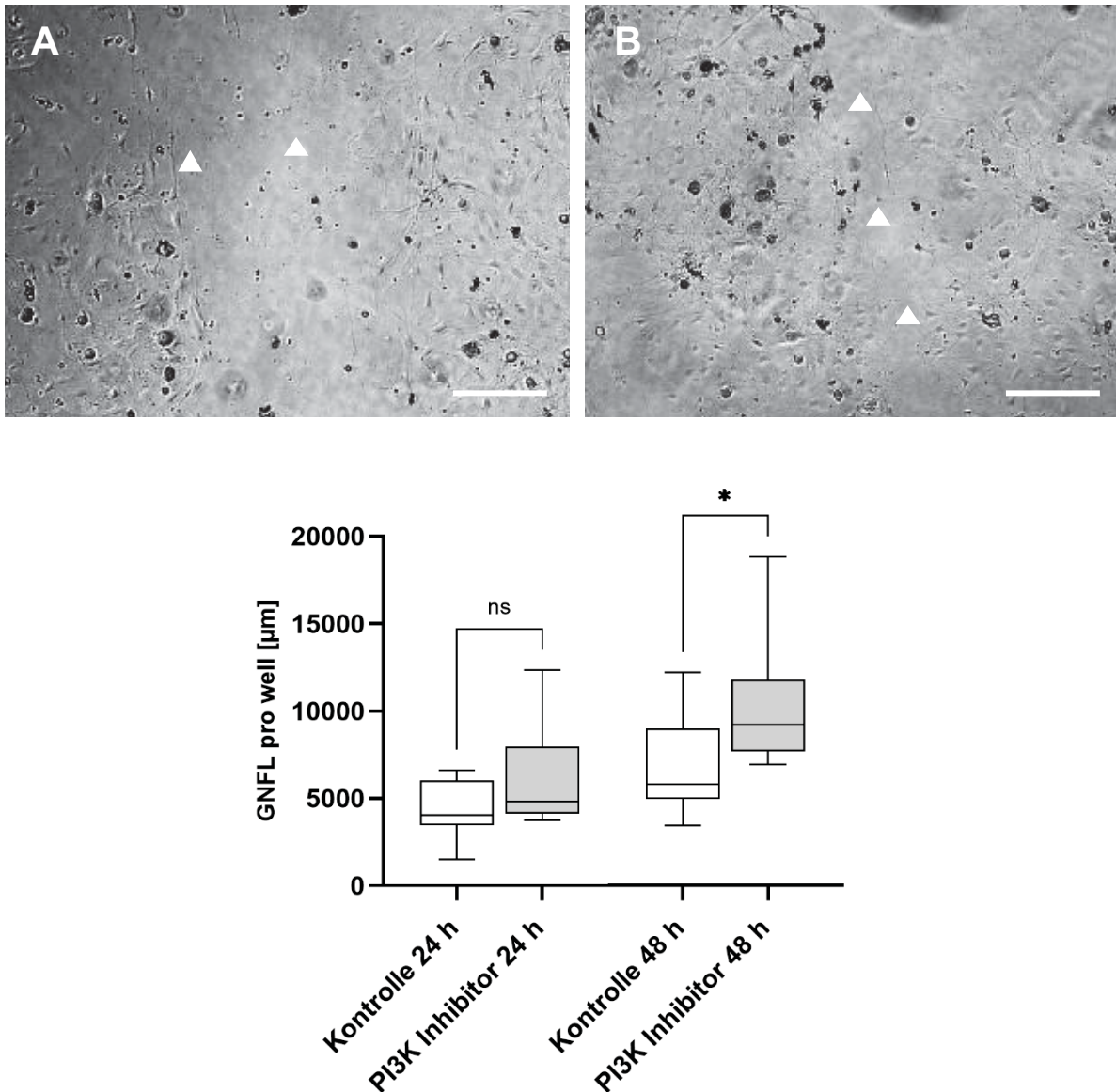


Abb. 30: Scratch Assay 24 h und 48 h nach PI3K Inhibitor Zugabe, 5 μM

Oben: Scratch Assay, A unbehandelte Neurone, B Neurone 48 h nach PI3K Inhibitor Zugabe, Maßstab: 200 μm , unten Messung der GNFL bei Neuronen mit und ohne PI3K Inhibitor Zugabe in der Konzentration von 5 μM 24 Stunden und 48 Stunden nach Zugabe. Nach 24 Stunde zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen ($p=0,2581$). Nach 48 Stunden zeigt sich bei den Neuronen, die mit PI3K Inhibitor behandelt wurden, eine signifikante Zunahme der GNFL pro

well ($p=0,0380$). Zur Darstellung kommen hier die Mediane der Nervenfasermessungen pro *well* (Kontrolle 24 h: 4047 μm , PI3K Inhibitor 24 h: 4820 μm , Kontrolle 48 h: 5806 μm und PI3K Inhibitor 48 h: 9218 μm).

Zusammenfassend wurden mithilfe des *Scratch Assays* der Einfluss der Substanzen auf das Nervenfaserverwachsen im Zellverband nach mechanischer Verletzung untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Zugabe von Conoidin A in der Konzentration von 5 μM und STAT3 Inhibitor in der Konzentration von 25 nM sowohl 24 Stunden als auch 48 Stunden nach Zugabe zu einer signifikanten Abnahme der GNFL im Vergleich zur Kontrolle führte. Die Zugabe von VEGF-A in der Konzentration von 100 nM führte nach 48 Stunden zu einer Abnahme der GNFL. Allerdings konnte hier nur ein statistischer Trend aufgezeigt werden. Die Zugabe von NGF in der Konzentration von 100 ng/ml führte sowohl nach 24 Stunden als auch nach 48 Stunden zu einer Steigerung der GNFL im Vergleich zur Kontrolle. Es konnte auch hier nur ein statistischer Trend gezeigt werden. PI3K in der Konzentration von 5 μM führte nach 48 Stunden zu einer Zunahme der GNFL im Vergleich zur Kontrolle.

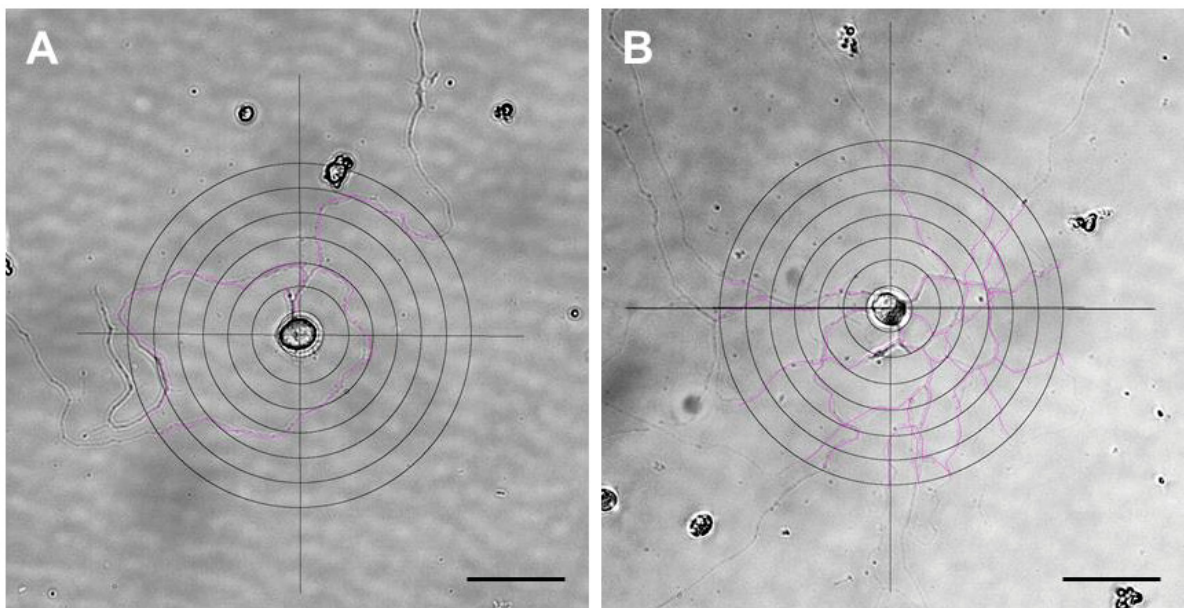
Die Zugabe von ROCK Inhibitor in der Konzentration von 100 μM , PRX2 in der Konzentration von 500 nM, SIRT1 Aktivator in der Konzentration 100 nM sowie SIRT1 Inhibitor in der Konzentration von 5 μM hatte keinen signifikanten Einfluss auf die GNFL im *Scratch Assay*.

3.4 ANALYSE DER NERVENFASERVERZWEIGUNG IM SINGLE NEURON ASSAY

Der *Single Neuron Assay* untersucht das Auswachsen der Nervenfasern eines einzelnen Neurons nach Behandlung mit den Substanzen im Vergleich zu unbehandelten Neuronen. Hier wurde die Verzweigung der Nervenfasern mithilfe einer Sholl Analyse quantifiziert. Dazu wurden sieben konzentrische Kreise um das Zellsoma in einem Gesamtabstand 120 μm gelegt und pro Kreis die Schnittpunkte der Nervenfasern (*intersections pro well*) 48 Stunden nach der Zugabe der Substanzen ausgezählt und mit den Schnittpunkten der unbehandelten Neuronen verglichen. Dafür wurden jeweils $n=3$ unabhängige Experimente mit jeweils drei *wells* je Experiment und pro *well* jeweils Nervenfasern von drei Neuronen ausgezählt. Die Darstellung der *Single Neuron Assays* erfolgt für jede Substanz einzeln (Abb. 31-39).

Nerve growth factor (NGF)

Die Zugabe von *NGF* in einer Konzentration von 100 ng/ml führte nach 48 Stunden insgesamt zu signifikant mehr *intersections* im Vergleich zur Kontrollgruppe. Nach 48 Stunden waren $112,33 \pm 33$ *intersections pro well* bei den mit *NGF* behandelten Neuronen zu sehen und bei der Kontrolle im Mittel $68,889 \pm 13,336$ *intersections pro well*. Das Ergebnis spricht für eine signifikante Zunahme des Verzweigungsgrads der Nervenfasern bei Zugabe von *NGF* ($p=0,0022$, Abb. 31).



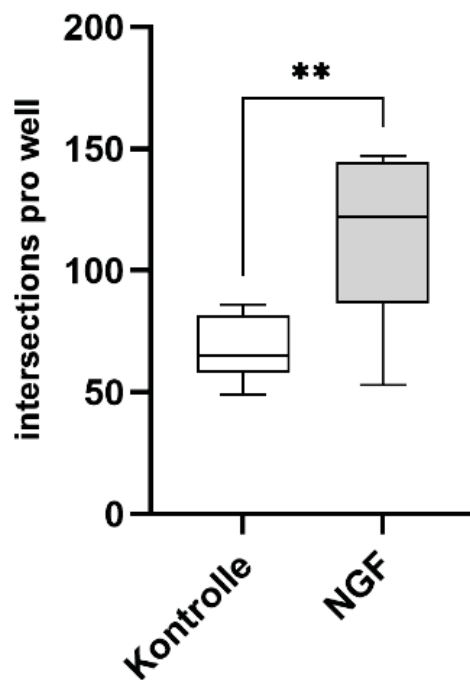


Abb. 31: Nervenfaserverzweigung im Single Neuron Assay, 48 h, NGF, 100 ng/ml

Oben: A unbehandeltes Neuron, B mit NGF behandeltes Neuron 48 Stunden nach Zugabe, Vergrößerung 200x, Maßstab 50 µm.

Unten: Darstellung der Gesamtschnittpunkte (*intersections*) pro *well* mit den konzentrischen Kreisen 48 h nach NGF Behandlung konzentriert im Verhältnis 100 ng/ml im Vergleich zu den unbehandelten Neuronen. Nach 48 h zeigen sich signifikant mehr *intersections* in der NGF-Gruppe als in der Kontrollgruppe ($p=0,0022$, Median 65, MW Kontrolle: $68,889 \pm 13,336$ *intersections*, Median 122, MW NGF: $112,33 \pm 33,166$ *intersections*).

Rho Kinase Inhibitor (ROCK Inhibitor)

Die ROCK Inhibition führte nicht zu einer signifikanten Zunahme der *intersections pro well* im Vergleich zur Kontrollgruppe nach 48 Stunden. So konnten bei den Neuronen, die mit ROCK Inhibitor in einer Konzentration von 100 µM behandelt wurden im Mittel $83,667 \pm 23,601$ Schnittpunkte pro *well* gezählt werden und bei den unbehandelten Neuronen im Mittel $69 \pm 19,583$. Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen war nicht signifikant ($p=0,1706$, Abb. 32).

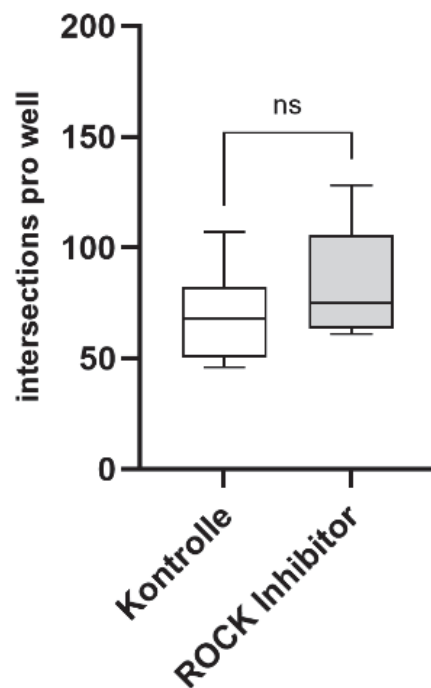
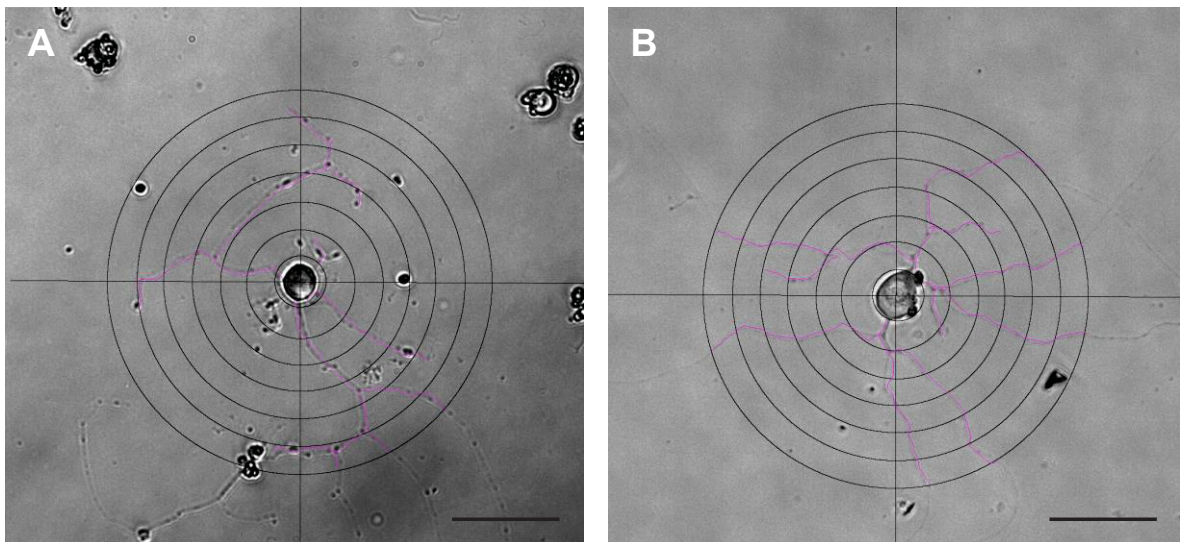


Abb. 32: Nervenfaserverzweigung im Single Neuron Assay, 48 h, ROCK Inhibitor, 100 μ M
 Oben: A unbehandeltes Neuron, B mit ROCK Inhibitor behandeltes Neuron 48 Stunden nach Zugabe, Vergrößerung 200x, Maßstab 50 μ m, Unten: Messung der *intersections pro well* 48 Stunden nach Behandlung mit 100 μ M des ROCK Inhibitors und ohne Zugabe. Zwischen den beiden Gruppen besteht kein signifikanter Unterschied ($p=0,1706$). (Kontrolle: Median: 68, MW: $69 \pm 19,583$ *intersections*, ROCK Inhibitor: Median 75, MW: $83,667 \pm 23,601$ *intersections*).

Peroxiredoxin 2 (PRX2)

48 Stunden nach Zugabe von PRX2 in der Konzentration von 500 nM wurden $71 \pm 25,58$ *intersections pro well* gezählt und bei der Kontrolle im Mittel $83,11 \pm 15,29$. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen ($p=0,2405$, Abb. 33).

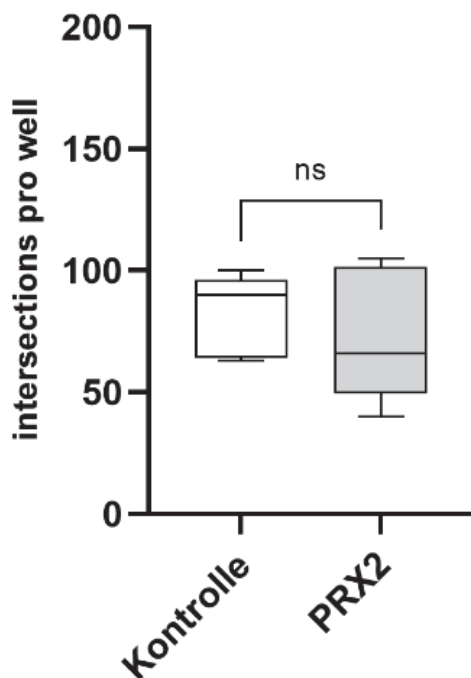
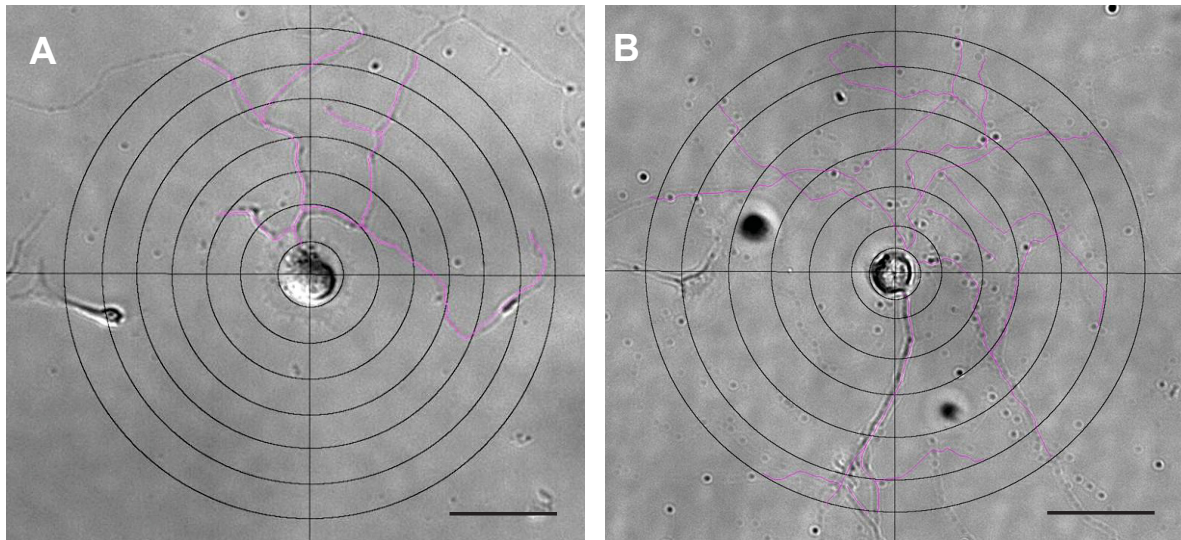


Abb. 33: Nervenfaserverzweigung im Single Neuron Assay, 48 h, PRX2, 500 nM

Oben: A unbehandeltes Neuron, B mit PRX2 behandeltes Neuron 48 Stunden nach Zugabe, Vergrößerung 200x, Maßstab 50 μ m, Unten: Quantifizierung der Schnittpunkte (*intersections*) der innerhalb von 48 Stunden nach PRX2 Zugabe ausgewachsenen Nervenfasern mit den konzentrischen im Vergleich mit unbehandelten Nervenzellen. Zwischen den beiden Gruppen besteht kein signifikanter Unterschied ($p= 0,2405$, Kontrolle: Median: 90, MW: $83,11 \pm 15,29$ *intersections*, PRX2: Median 66 MW: $71,00 \pm 25,58$ *intersections*).

Peroxisredoxin 2-Inhibitor (Conoidin A)

Die Zugabe von Conoidin A in der Konzentration von 5 μ M führte nach 48 Stunden zu einem signifikant geringeren Verzweigungsgrad von Nervenfasern in der Einzelzellkultur ($p=0,0044$). Die *intersections* pro well waren bei den Conoidin A behandelten Neuronen im

Mittel $40,00 \pm 31,01$ und bei den unbehandelten Neuronen $80,00 \pm 18,67$ *intersections pro well* (Abb. 34).

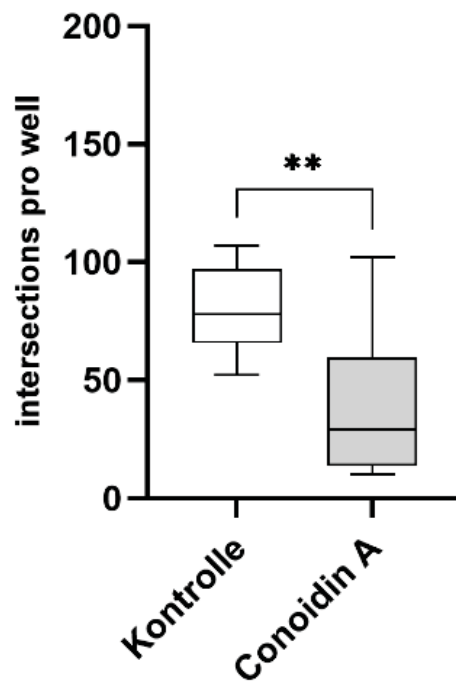
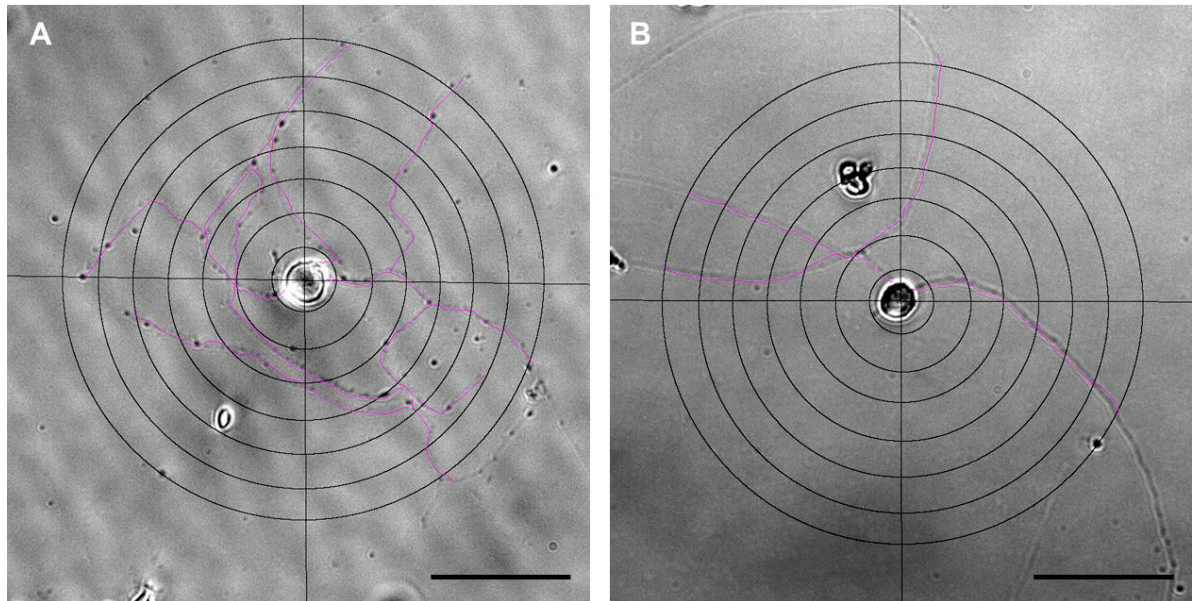


Abb. 34: Nervenfaserverzweigung im Single Neuron Assay, 48 h, Conoidin A, 5 μ M
 Oben: A Kontrolle, B mit Conoidin A behandeltes Neuron, 48 h nach Zugabe, Vergrößerung: 200x, Maßstab: 50 μ m. Unten: Quantitative Auswertung der Faserverzweigung im Vergleich zwischen Conoidin A behandelten und unbehandelten Neuronen. Die Behandlung mit Conoidin A in der Konzentration von 5 μ M führte im Single Neuron Assay zu einer signifikanten Abnahme der *intersections pro well* ($p=0,0044$, Kontrolle: Median: 78, MW: $80,00 \pm 18,67$, Conoidin A: Median 29 MW: $40,00 \pm 31,01$)

SIRT1 Aktivator

Die Zugabe von SIRT1 Aktivator in einer Konzentration von 100 nM führte im *Single Neuron Assay* nach 48 Stunden nicht zu einer signifikanten Änderung der *intersections pro well* (Abb. 35). Es lagen nach 48 Stunden im Mittel $64,33 \pm 19,51$ *intersections pro well* bei den mit SIRT1 Aktivator behandelten Neuronen vor. In der Kontrollgruppe wurden $81,00 \pm 27,12$ *intersections* gezählt. Der Unterschied war nicht signifikant ($p= 0,1539$).

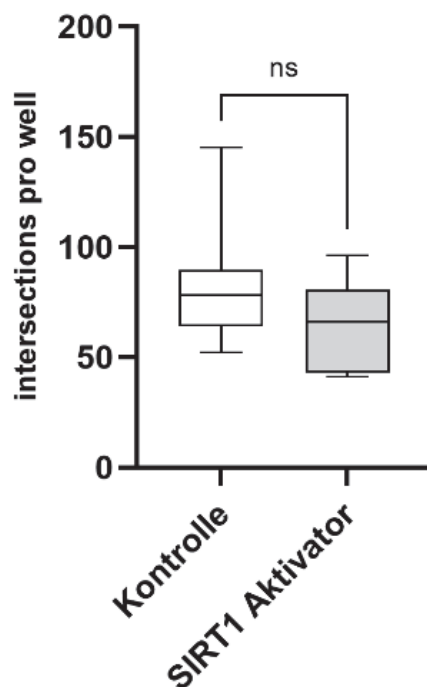
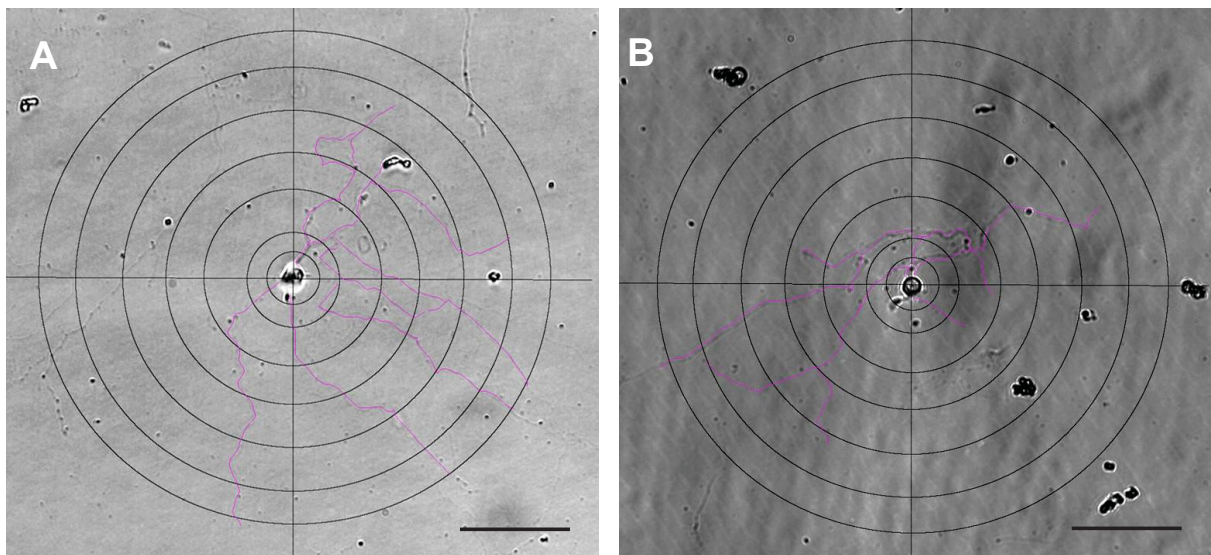
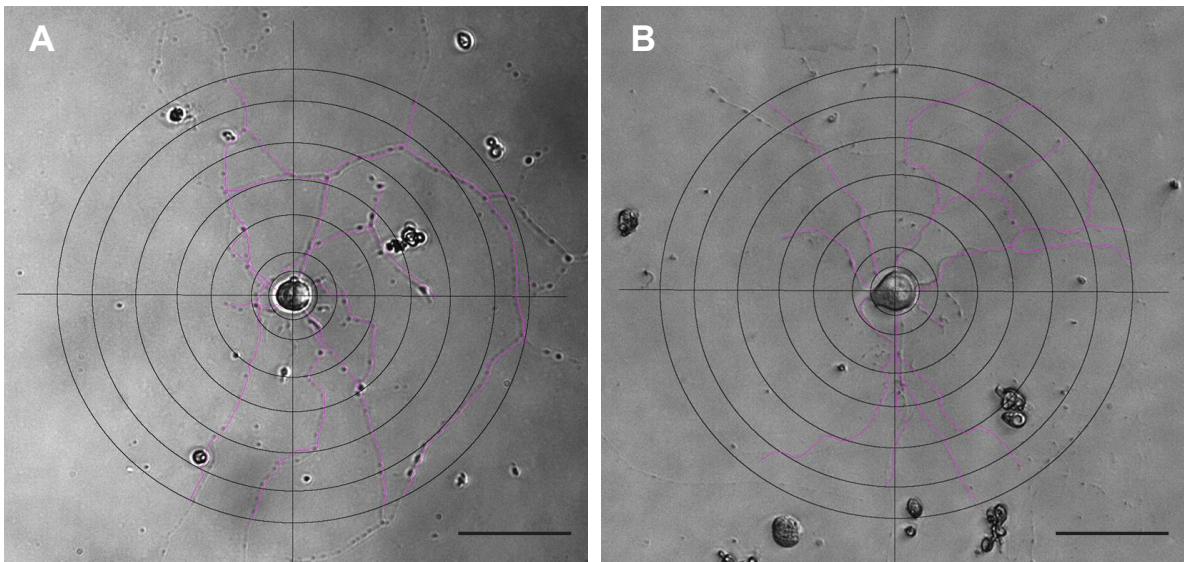


Abb. 35: Nervenfaserverzweigung im Single Neuron Assay, 48 h, SIRT1 Aktivator, 100 nM
Oben: A unbehandeltes Neuron, B mit SIRT1 Aktivator behandeltes Neuron 48 Stunden nach Zugabe, Vergrößerung 200x, Maßstab 50 μ m, Unten: *Intersections* der Nervenfasern mit den konzentrischen Kreisen im Vergleich von SIRT1 Aktivator behandelten zu den unbehandelten

Neuronen. Zwischen beiden Gruppen zeigte sich kein signifikanter Unterschied bezogen auf die *intersections* ($p= 0,1539$, Kontrolle: Median: 78, MW: $81,00 \pm 27,12$ *intersections*, SIRT Aktivator: Median 66 MW: $64,33 \pm 19,51$ *intersections*).

SIRT1 Inhibitor (Sirtinol)

Im Single Neuron Assay zeigte sich durch die Zugabe von SIRT1 Inhibitor in der Konzentration von $5 \mu\text{M}$ keine signifikante Änderung der *intersections* pro well nach 48 Stunden im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p=0,7974$, Abb. 36). Nach 48 Stunden wurden $77,56 \pm 15,27$ *intersections* bei den mit SIRT1 Inhibitor behandelten Neuronen gezählt. Die Kontrolle zeigte eine Anzahl von $75,56 \pm 17,18$ *intersections* pro well.



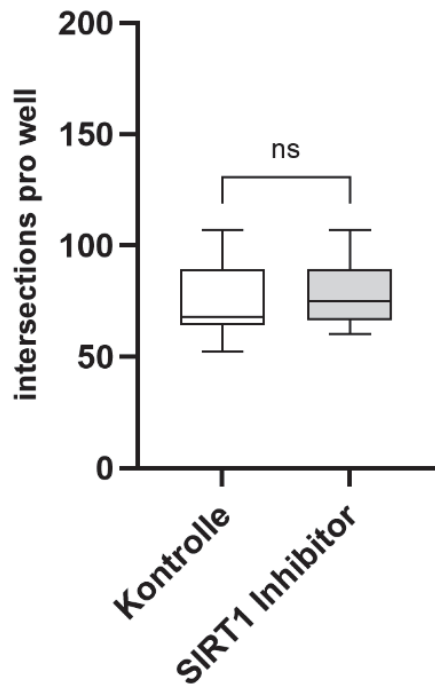


Abb. 36: Nervenfaserverzweigung im Single Neuron Assay, 48 h, SIRT1 Inhibitor, 5 μ M

Oben: A unbehandeltes Neuron, B mit SIRT1 Inhibitor behandeltes Neuron 48 Stunden nach Zugabe, Vergrößerung 200x, Maßstab 50 μ m, Unten: Quantitative Auswertung des Single Neuron Assays. Dargestellt sind hier die Gesamtschnittpunkte pro well 48 Stunden nach Zugabe von SIRT1 Inhibitor in einer Konzentration von 5 μ M im Vergleich zu unbehandelten Neuronen. Zwischen den beiden Gruppen zeigte sich kein signifikanter Unterschied bezogen auf die *intersections pro well* ($p=0,7974$, Kontrolle: Median: 68, MW: $75,56 \pm 17,18$ *intersections*, SIRT Inhibitor: Median 75 MW: $77,56 \pm 15,27$ *intersections*).

Signal transducer and activator of transcription 3-Inhibitor (STAT3 Inhibitor)

Die Zugabe von STAT3 Inhibitor in der Konzentration von 25 nM führte im *Single Neuron Assay* zu einer signifikanten Abnahme der *intersections pro well* ($p=0,0026$) (Abb. 37). So wurden bei der Kontrolle $78,44 \pm 31,74$ *intersections pro well* ausgezählt und nur $39,11 \pm 9,32$ *intersections pro well* nach Zugabe von STAT3 Inhibitor.

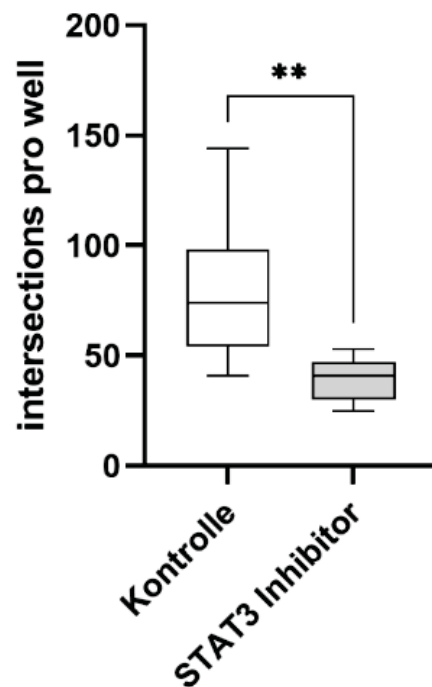
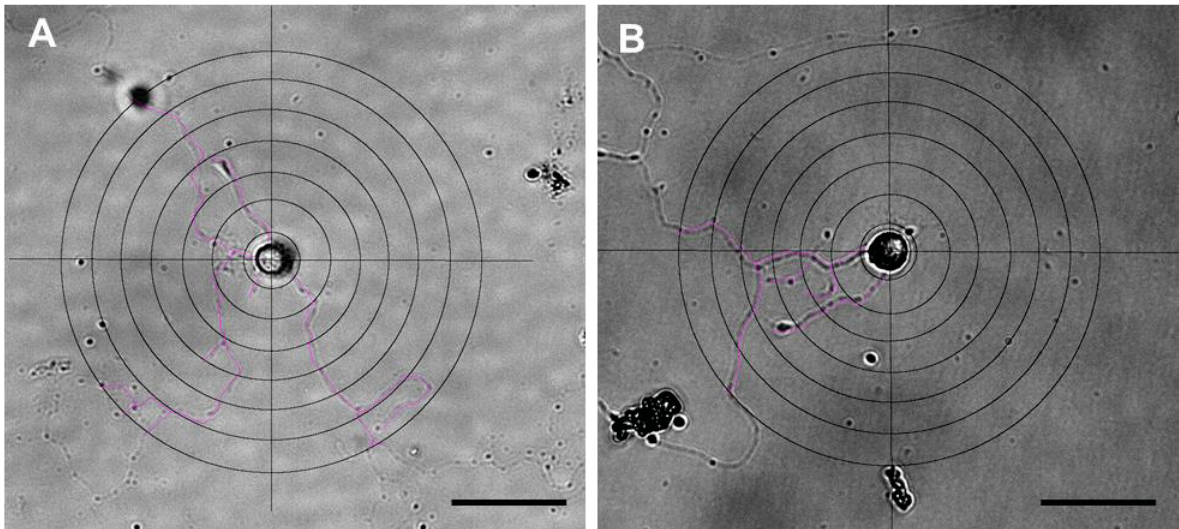


Abb. 37: Nervenfaserverzweigung im Single Neuron Assay, 48 h, STAT3 Inhibitor, 25 nM

Oben: A Kontrollneuron, B mit STAT3 Inhibitor behandeltes Neuron, 48 h nach Zugabe, Vergrößerung 200x, Maßstab: 50 μ m.

Unten: Darstellung der quantitativen Auswertung der Schnittpunkte der Nervenfasern pro *well* mit den konzentrischen Kreisen. Die Zugabe von STAT3 Inhibitor in einer Konzentration von 25 nM führte zu einer signifikanten Reduktion von *intersections* im Vergleich zu unbehandelten Neuronen ($p= 0,0026$, Kontrolle: Median: 74, MW: $78,44 \pm 31,74$ *intersections*, STAT3 Inhibitor: Median 41 MW: $39,11 \pm 9,32$ *intersections*).

Vascular Endothelial Growth Factor A (VEGF-A)

Die Zugabe von VEGF-A in einer Konzentration von 100 nM führte im *Single Neuron Assay* zu keiner signifikanten Änderung der Anzahl von *intersections* pro *well* im Vergleich zu unbehandelten Neuronen ($p=0,0872$). Es wurden bei der Kontrolle insgesamt $94,33 \pm 19,41$ *intersections* pro *well* gezählt. Bei den Neuronen, die mit VEGF-A behandelt wurden, lagen insgesamt $77,78 \pm 19,14$ *intersections* vor (Abb. 38).

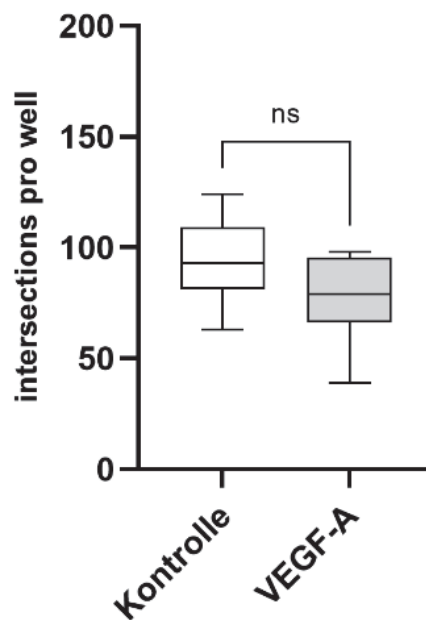
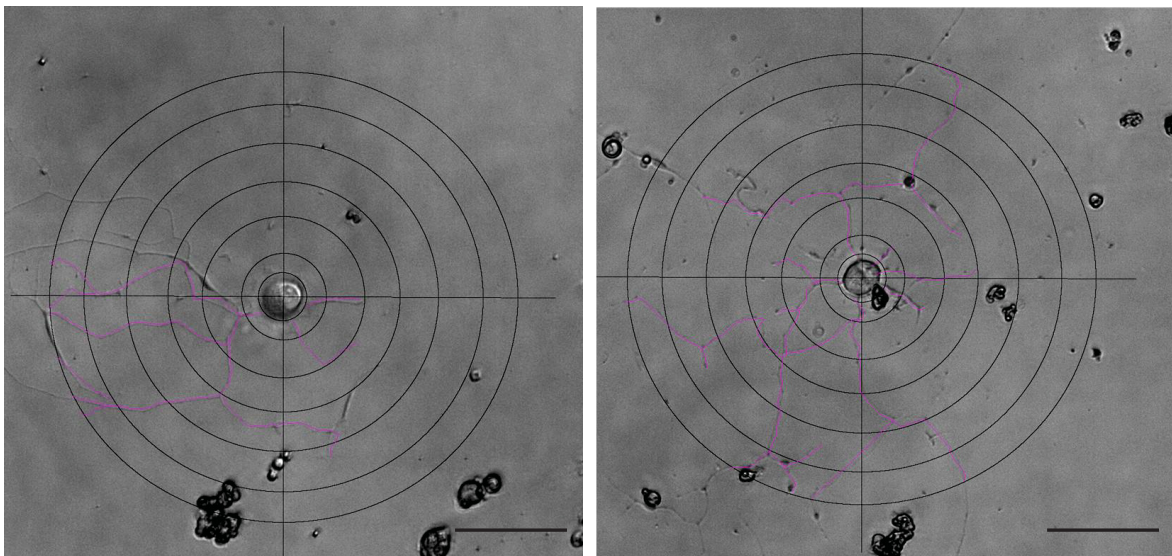


Abb. 38: Nervenfaserverzweigung im Single Neuron Assay, 48 h, VEGF-A, 100 nM

Oben: A unbehandeltes Neuron, B mit VEGF-A behandeltes Neuron 48 Stunden nach Zugabe, Vergrößerung 200x, Maßstab 50 μm , Unten: Darstellung der *intersections* der Nervenfasern mit den konzentrischen Kreisen im Vergleich von VEGF-A behandelten zu unbehandelten Neuronen. Es zeigte sich kein Unterschied bezogen auf die *intersections* ($p=0,0872$, Kontrolle: Median: 93, MW: $94,33 \pm 19,41$ *intersections*, VEGF-A: Median 79 MW: $77,78 \pm 19,14$ *intersections*).

Phosphoinositid 3 Kinase Inhibitor (PI3K Inhibitor)

Die Inhibition von PI3K führte in der gewählten Konzentration von 5 μM nicht zu einer signifikanten Änderung der Gesamtschnittpunkte pro *well* ($p=0,2704$). Bei den Neuronen, die mit PI3K Inhibitor behandelt wurden, konnten insgesamt $83,11 \pm 14,33$ *intersections* pro *well* ausgezählt werden und im Vergleich bei der Kontrolle $73,56 \pm 20,62$ *intersections* pro *well*. PI3K Inhibitor hat in der genutzten Konzentration keinen Einfluss auf den Verzweigungsgrad der Nervenfasern im *Single Neuron Assay* (Abb. 39).

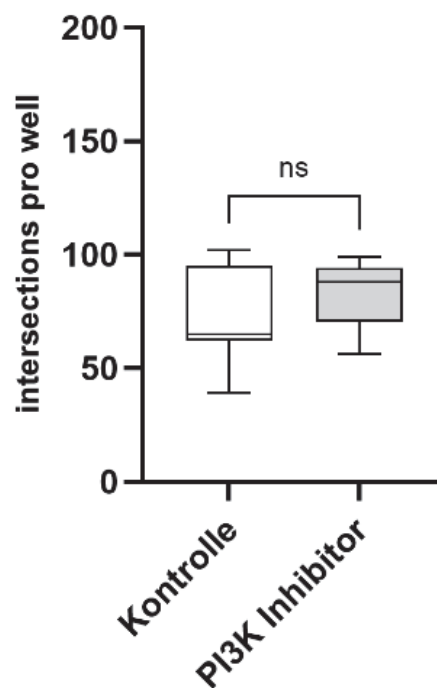
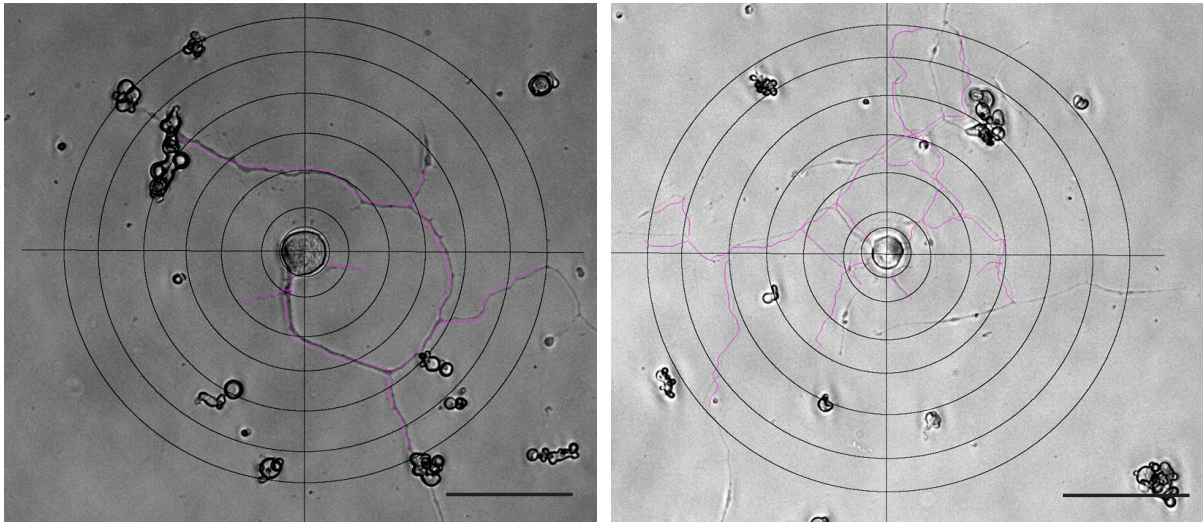


Abb. 39: Nervenfaserverzweigung im Single Neuron Assay, 48 h, PI3K Inhibitor, 5 μM

Oben: A unbehandeltes Neuron, B mit PI3K Inhibitor behandeltes Neuron 48 Stunden nach Zugabe, Vergrößerung 200x, Maßstab 50 μm , Unten: Dargestellt sind hier die Gesamtschnittpunkte pro *well*

im Vergleich von PI3K Inhibitor behandelten Neuronen (Konzentration 5 μ M) zu unbehandelten Neuronen. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied bezogen auf die *intersections* pro *well* ($p=0,2704$, Kontrolle: Median: 65, MW: $73,56 \pm 20,62$ *intersections*, PI3K Inhibitor: Median 88 MW: $83,11 \pm 14,33$ *intersections*).

Abschließend lässt sich dokumentieren, dass mithilfe der Sholl Analyse die Einflüsse der Substanzen auf die Faserverzweigung eines einzelnen Neurons untersucht werden konnte.

Die Zugabe von STAT3 Inhibitor in einer Konzentration von 25 nM sowie die Zugabe von Conoidin A in einer Konzentration von 5 μ M führte im Single Neuron Assay zu einer signifikanten Abnahme der Faserverzweigung der Nerven

Die Zugabe von *NGF* in einer Konzentration von 100 ng/ml führte zu einer signifikanten Zunahme des Verzweigungsgrades der Nervenfasern.

Hingegen führte die Zugabe von ROCK Inhibitor in einer Konzentration von 100 μ M, PRX2 in einer Konzentration von 500 nM, SIRT1 Aktivator in einer Konzentration von 100 nM, SIRT1 Inhibitor in einer Konzentration von 5 μ M, VEGF-A in einer Konzentration von 100 nM sowie PI3K Inhibitor in einer Konzentration von 5 μ M nicht zu einer signifikanten Änderung des Verzweigungsgrades der Nervenfasern.

3.5 QUANTITATIVE REAL-TIME PCR

Es wurde eine quantitative real-time PCR durchgeführt, um zu verifizieren, dass die Zugabe von ROCK Inhibitor Y27632 die Expression des Gens ROCK 2 auf mRNA Ebene in einer sich regenerierenden neuronalen Zellkultur herunterreguliert. Dafür wurde die mRNA von Neuronen aus dem Scratch Assay verwendet, welche 48 Stunden zuvor „*gescratched*“ und dann direkt mit ROCK Inhibitor Y27632 behandelt wurden. Das heißt, dass nicht nur die reine mRNA Expression von ROCK 2 in einer neuronalen Zellkultur untersucht wurde, sondern auch speziell die Effekte von ROCK Inhibitor auf die ROCK 2 mRNA Expression in sich regenerierenden Neuronen untersucht wurden. Die Expression des Zielgens, in diesem Fall, ROCK 2 wurde dann auf ein nicht reguliertes sogenanntes *Housekeeping* Gen GAPDH, als endogene Kontrolle, bezogen. Dann wurde die relative mRNA Expression auf eine unbehandelte Kontrollgruppe, die auch „*gescratched*“ wurden aber nicht mit dem ROCK Inhibitor behandelt wurden, bezogen. Die Stichprobengröße ist n=1.

Neben dem Zielgen ROCK 2 wurden ebenfalls die Zielgene ROCK 1, G43, LIMK, Tubulin, NGF, SRT, PRX2, GSK3 β , NT3, CDC42, BDNF und CNTF untersucht. Diese kommen an dieser Stelle nicht zur Darstellung. Die Negativkontrollen (engl. *non-template-control*) wurden bei der Durchführung dieser Experimente, am ehesten aufgrund einer Verunreinigung positiv gemessen und waren somit nicht auswertbar.

Im Folgenden kommt es zur Darstellung der relativen mRNA Expression, die vorher durch die $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Formel berechnet wurde. Hier wird die relative mRNA Expression von ROCK 2 von Neuronen aus dem Scratch Assay, die mit ROCK und ohne ROCK (Kontrolle, auf 100 % normiert) behandelt wurden dargestellt.

In der quantitativen real-time PCR konnte gezeigt werden, dass die relative mRNA Expression von ROCK 2 im Vergleich zur Kontrolle herunterreguliert ist, nachdem die Neurone „*gescratched*“ und mit dem ROCK Inhibitor behandelt wurden. Die Expression von ROCK 2 wurde in den Neuronen, die mit ROCK Inhibitor behandelt wurden, normiert auf die Kontrolle mit durchschnittlich $54,00 \pm 2,828$ % gemessen (Abb. 40). Der Unterschied war signifikant ($p= 0,0277$). N=1.

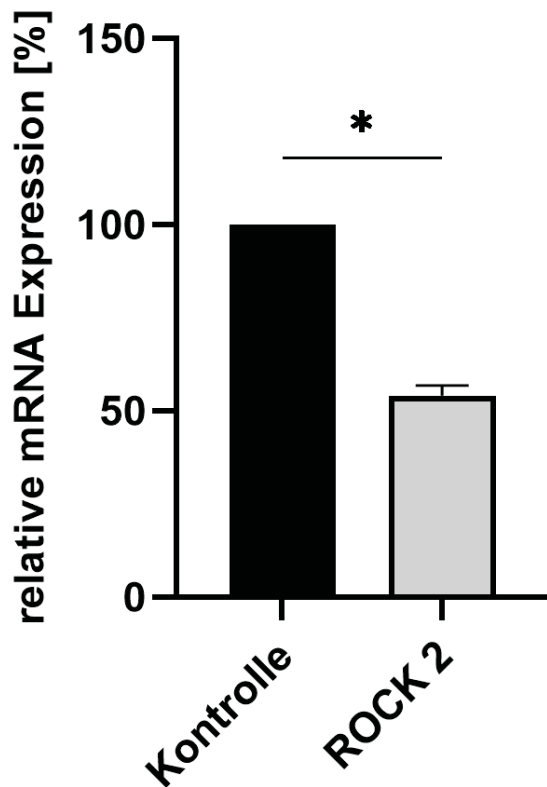


Abb. 40: qrt-PCR, ROCK 2 mRNA-Expression nach Scratch Assay und ROCK Inhibition
 Darstellung der relativen ROCK 2 mRNA-Expression im Vergleich zwischen unbehandelten Kontrollneuronen (Kontrolle) und Neuronen, die 48 Stunden zuvor mit ROCK Inhibitor in einer Konzentration von 100 μ M behandelt und „*gescratched*“ wurden. Die ROCK 2-mRNA-Expression wurde in der Kontrollgruppe auf 100 % normiert. n=1 Experiment. Der Ct-Cut off Wert der *non-template Control* wurde auf 37,0 festgelegt. Anwendung des Mann-Whitney-U-Tests.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass es durch die Zugabe von Rho Kinase Inhibitor im *Scratch Assay* zu einer signifikanten Reduktion der mRNA Expression von ROCK 2 kam.

4 DISKUSSION

4.1 RELEVANZ DER KORNEALEN NERVEN BEI DER ENTSTEHUNG DER NK

Neurosensorische Schädigungen stellen den zentralen Aspekt bei der Entstehung der Neurotrophen Keratopathie dar.

Dies wurde 2017 beim *International Dry Eye Workshop* (Abk.: *DEWS*) thematisiert [116]. Die zunehmende Erkenntnis, dass die kornealen Nerven eine Schlüsselrolle bei der Entstehung von Augenoberflächenerkrankungen wie der NK [38, 117, 118], dem Neuropathischen Schmerz [27] und *DES* [119] einnehmen, rückt die korneale Nervenregeneration in den Fokus der Forschung. Labetoulle et al. haben 2019 die entscheidende Bedeutung von kornealen Nerven auf die Entstehung von Augenoberflächenstörungen aufgezeigt, indem sie noch einmal auf die neuronalen Schaltkreise innerhalb der Kornea eingegangen sind und die Folgen aufgezeigt haben, wenn die physiologischen Vorgänge nicht korrekt funktionieren [120].

Auch außerhalb der Augenheilkunde ist die korneale Innervation von großem Interesse. Hier wird zum Beispiel der Zusammenhang von Schädigungen der kornealen Nerven mit anderen neurologischen Störungen untersucht. So kann zum Beispiel der Fortschritt peripherer Polyneuropathien heute auch anhand von Bildern der kornealen Innervation beurteilt werden [121]. Beispielsweise kann anhand von Störungen der kornealen Innervation auf eine gestörte Glukosetoleranz geschlossen werden [121–123]. Ebenfalls können Schädigungen der kornealen Nerven bei Patienten mit chronisch inflammatorisch demyelinisierenden Polyneuropathien [124] vorkommen. Ein weiteres Beispiel ist die Chemotherapie-induzierte periphere Polyneuropathie, bei welcher es ebenfalls zu einer Abnahme der kornealen Nervenfasernlänge kommt [125].

Diese Beispiele zeigen, dass die korneale Innervation eine große Bedeutung sowohl in der Ophthalmologie als auch in anderen Bereichen der Medizin hat und, dass die Erforschung der kornealen Nerven hilfreich sein kann, um andere Erkrankungen des peripheren Nervensystems zu besser verstehen.

4.2 EVALUATION DER FAKTOREN IM MURINEN 2D *IN VITRO* MODELL

Um neue regenerationsassoziierte Faktoren für die korneale Nervenregeneration zu evaluieren, wurden für diese Studie primäre, murine sensorische Nervenzellen aus den Hinterwurzelganglien von Mäusen verwendet.

Für die vorliegende Arbeit war die Verwendung der *DRG* auch deshalb sinnvoll, da sie bereits erfolgreich zur Erforschung des peripheren Nervensystems etabliert sind [126]. So werden diese zum Beispiel zur Erforschung von peripheren Polyneuropathien verwendet [127, 128]. Da die Neurotrophe Keratopathie durch eine Schädigung der peripheren Nerven bedingt ist, kann man dieses Modellsystem also nutzen, um regenerationsassoziierte Effekte für die korneale Innervation zu zeigen. Heutzutage werden immer komplexere Modelle etabliert, um die Nervenregeneration mittels Hinterwurzelganglienzellen zu untersuchen. So haben beispielsweise Wang et al. 2015 Hinterwurzelganglienzellen mit humanen kornealen Stromazellen kultiviert und mit verschiedenen Nervenwachstumsfaktoren behandelt um mögliche Effekte auf die Regeneration aufzuzeigen [129].

Eine andere Möglichkeit die Nervenregeneration *in vitro* zu evaluieren, wäre die Nutzung von trigeminalen Ganglien gewesen, welche ein nahezu identisches Wachstumsverhalten zeigen. Allerdings wurde dieser Zelltyp nicht verwendet, da man lediglich zwei trigeminale Ganglien, aber circa 40 *DRG* pro Versuchstier gewinnen kann. Die Nutzung von trigeminalen Ganglien für alle vorliegenden Versuche wäre daher ethisch und tierschutzrechtlich nicht sinnvoll gewesen. Eine größere Zellausbeute ist ebenfalls vorteilhaft, da man mehrere Substanzen parallel vergleichen kann.

Um die regenerationsassoziierten Effekte auf die Nervenzellen zu untersuchen, wurden die Zellen zunächst aus den Tieren präpariert und dann kultiviert. Für die Kultivierung musste initial der optimale Wachstumsuntergrund identifiziert werden, auf dem die Nervenfasern adäquat auswachsen und die geplanten Versuche durchführbar sind.

Dafür wurden die dissoziierten Nervenzellen zunächst auf verschiedenen Wachstumsuntergründen ausgesät. Dazu zählten Poly-D-Lysin und Laminin beschichtete Zellkulturplatten sowie die sogenannten *Lumox* Zellkulturplatten. Auf beiden Wachstumsuntergründen bildeten die Neurone Fasern aus. Allerdings zeigte sich, dass der Folienboden der *Lumox* Platten durch den mechanischen *Scratch* (für den *Scratch Assay*) beschädigt wurde. Des Weiteren wuchsen die Nervenfasern auf den *Lumox* Platten nur langsam aus und es zeigte sich gleichzeitig ein vermehrtes Wachstum der Satellitenzellen wie zum Beispiel Gliazellen. Deshalb war dieser Untergrund für die Kultivierung der

Neurone ungeeignet. Vergleichende lichtmikroskopische Aufnahmen der beiden Wachstumsuntergründen zeigen, dass die Poly-D-Lysin und Laminin Beschichtung für das Auswachsen der Neurone besser geeignet war (Abb. 7), da die Nervenfasern nach 24 Stunden adäquat ausgewachsen sind und die Beschichtung durch den mechanischen *Scratch* kaum bis garnicht beschädigt wurde. Generell ist diese Beschichtung auch in anderen Studien Standard für die Kultivierung von primären Nervenzellen [130]. Unter Nutzung der Poly-D-Lysin und Laminin Beschichtung konnten die Nervenfasern optimal kultiviert und ein signifikantes Nervenfasernwachstum sowohl nach 24 als auch nach 48 Stunden nachgewiesen werden (Abb. 9).

Die Verwendung von *DRG* erlaubt aber nicht nur die Kultivierung dissoziierter Nervenzellen, wie oben beschrieben, sondern auch die Aussaat von nicht-dissoziierten *DRG*; der sogenannten *DRG* Explant Kultur. Bei dieser Explant Kultur wird ein komplettes oder halbiertes nicht-dissoziiertes *DRG* auf einer beschichtete Zellkulturplatte platziert und im Nährmedium inkubiert. Es kommt im Verlauf zur Adhärenz und zum Auswachsen der Nervenfasern aus dem Ganglion in die Peripherie. Wie Fornaro et al. 2018 beschrieben ist die Nutzung dieses *in vitro* Modellsystems sinnvoll, um biologische Prozesse des peripheren Nervensystems zu untersuchen, da es sich hierbei nicht nur um Nervenzellen handelt, sondern um eine Co-Kultur aus Nervenzellen sowie peripheren Gliazellen [131].

In dieser Arbeit wurden die *DRG* nach der Aussaat und erneut nach 96 Stunden Wachstum dokumentiert. Auffällig war allerdings, dass nur circa jedes vierte *DRG* adhärent war und Nervenfasern gebildet hatte. Außerdem konnte man zwar die Nervenfasern mikroskopisch detektieren, allerdings war keine genaue Quantifizierung der Nervenfasernlänge möglich, da die Fasern sich zum Teil kreuzten oder sehr nah beieinander wuchsen. Gleichzeitig kam es vermehrt zur Migration von Gliazellen und anderen Zelltypen, was die genaue Quantifizierung der Nervenfasern auch laut Ali-Ali H. et al. (2017), erschwerte [132]. Auch in anderen Studien wurde gezeigt, dass die Verwendung von *DRG* Explants im 2D *in vitro* Modell suboptimal ist. Klimovich P et al. haben erst kürzlich nachgewiesen, dass in ihrem 2D Experiment mit einem *DRG* Explant kaum Nervenfasern sichtbar waren, wohingegen in ihrem 3D Experiment unter Nutzung eines sogenannten „Matrigels“ sehr wohl Nervenfasern zur Darstellung kamen [133]. Weiterhin lässt sich bei der Nutzung von nicht dissoziierten *DRG* der Einfluss der Substanzen auf die Gliazellen und damit möglich Zell-Zell-Interaktionen nicht ausschließen. Wenn also die gezielte Untersuchung von exogen zugeführten Substanzen auf die Nervenfasern im Zentrum der Untersuchung steht, ist die Verwendung von *DRG* Explants eher ungeeignet.

Abschließend kann festgehalten werden, dass die Verwendung des 2D *in vitro* Modells der dissoziierten DRG adäquat für die Evaluation von regenerationsassoziierten Substanzen ist. Die Kultivierung wurde durch eine Poly-D-Lysin und Laminin Beschichtung optimiert und ein Nervenfasernwachstum war nachweisbar. Die Nutzung einer DRG Explant Kultur war für dieses Projekt aufgrund der hohen Ausfallquote nicht zielführend und wurde daher nicht für weitere Analysen genutzt.

4.3 IDENTIFIKATION VON NEUEN REGENERATIONSASSOZIIERTEN FAKTOREN

Bekannt ist bereits, dass bestimmte bereits identifizierte Faktoren mit der Regeneration von Nerven assoziiert sind. Daher ist der Ansatz, neue bisher unbekanntere regenerationsassoziierte Faktoren zu identifizieren, sehr vielversprechend.

Das Zusammenspiel der kornealen Nerven und des Epithels ist von zentraler Bedeutung für den funktionellen Erhalt der Nerven, als auch für den Erhalt des Epithels. Dieses Zusammenspiel wird unter anderem von neurotrophen und anderen Faktoren beeinflusst [19].

Verschiedene Studien zeigten bereits, dass Schädigungen des kornealen Epithels langsamer abheilen, wenn gleichzeitig Schädigungen der kornealen Nerven vorhanden sind [134]. Im experimentellen Rattenmodell kam es beispielsweise nach operativer Entfernung des trigeminalen Ganglions zu einer verzögerten epithelialen Wundheilung und verminderten Bildung von Desmosomen, was zu persistierenden Defekten der Kornea führte [135]. Weitere Studien belegten einen engen Zusammenhang zwischen Epithelzellen und Nervenzellen in der Kornea [136, 137]. Ebenfalls am experimentellen Rattenmodell wurde gezeigt, dass im Rahmen der kornealen Wundheilung neurotrophe Faktoren ausgeschüttet werden, die wiederum zur Nervenregeneration beitragen [138].

Einige dieser neurotrophen Faktoren, die die zelluläre Kommunikation zwischen Neuronen und Epithelzellen ermöglichen, sind neben NGF, auch der glial derived neurotrophic factor (GDNF), der „brain derived neurotrophic factor“ (BDNF) und der „epidermal growth factor“ (EGF) [19, 139]. Diese Faktoren sind teilweise bereits sehr eingehend erforscht worden.

Obwohl es zahlreiche, potenziell regenerationsassoziierte Substanzen gibt, haben wir uns für neun vielversprechende Kandidaten entschieden. Die Entscheidung für genau diese Faktoren wurde basierend auf einer Proteom-Analyse getroffen, bei welcher regenerierende und nicht regenerierende Ganglienzellen von Weißbüschelaffen verglichen wurden [66]. Hier zeigten die vorliegenden Kandidaten eine signifikant differente

Expression in den regenerierenden Neuronen im Vergleich zu den nicht regenerierenden Neuronen. Die Expression dieser Kandidaten wurde anschließend in einem weiteren Vorversuch unserer Arbeitsgruppe sowohl in der Kornea als auch in den murinen *DRG* untersucht und verifiziert. Dies war eine wichtige Voraussetzung für die Auswahl der Faktoren. Im zweiten Schritt wurden Hinweise in der Literatur gefunden, dass die ausgewählten Kandidaten mit der Regeneration von sensorischen Nerven assoziiert sind. Bei all diesen Substanzen wurde in früheren Studien gezeigt, dass sie auch speziell am Auge oder am Auge vorkommenden Zelltypen wie Epithel- oder Endothelzellen eine Rolle spielen. Bei einem Großteil der Substanzen war bis jetzt allerdings nicht bekannt, welche Einflüsse sie auf das Nervenfaserverwachstum und die Nervenfaserverzweigung von murinen sensorischen Nervenzellen im 2D *in vitro* Modell haben. Zu den von uns ausgewählten, vielversprechenden Kandidaten zählen NGF, ROCK Inhibitor, Peroxiredoxin 2, Conoidin A, SIRT1 Aktivator, SIRT1 Inhibitor, STAT3 Inhibitor, VEGF-A und PI3K Inhibitor.

Generell ist festzuhalten, dass ähnlich zu den Aussagen von Gordon und Boyd, ein Gleichgewicht zwischen positiven und negativen Faktoren für die Wachstums Umgebung von verletzten, sensiblen Nervenzellen von Bedeutung ist [140]. Dies muss insofern berücksichtigt werden, da es sich bei dieser Studie um eine 2D *in vitro* Studie handelt, die die Substanzen isoliert in einer grundlagenexperimentellen Umgebung zu evaluieren versucht.

Insgesamt haben wir uns aber speziell für diese Faktoren entschieden, da sie potenziell Einflüsse auf die Nervenregeneration haben, diese allerdings noch nicht eingehend erforscht sind.

4.4 VIELVERSPRECHENDE NEUE REGENERATIONSASSOZIIERTE FAKTOREN

Der Einfluss der zu untersuchenden Faktoren auf die murinen sensorischen Nervenzellen wurde erstmalig im Rahmen dieses Projekts unter Nutzung eines murinen 2D *in vitro* *DRG* Modells untersucht. Zum Ausschluss der Toxizität der Faktoren auf die Neurone wurde eine Vitalitätsfärbung durchgeführt. Im Verlauf wurden die Effekte der Substanzen auf das Wachstum der Nervenfasern im Scratch Assay und die Faserverzweigung im Single Neuron Assay untersucht. Im letzten Schritt erfolgte die Expressionsanalyse der Substanzen mithilfe der quantitativen *real-time* PCR. Im Folgenden werden die Ergebnisse jedes einzelnen Faktors diskutiert.

4.4.1 NGF

Der seit vielen Jahren bekannte und aktuell vielversprechendste Faktor für die kausale Therapie von Augenoberflächenstörungen, die auf Schädigungen der kornealen Innervation zurückzuführen sind, ist *NGF*. *NGF* kann seit 2017 zur topischen Anwendung bei Betroffenen mit NK eingesetzt werden [59] und stellt die einzig derzeit verfügbare kausale, konservative Therapieform der NK dar. Es sind bereits zahlreiche Studien veröffentlicht worden, die den positiven regenerationsassoziierten Effekt von *NGF* auf die kornealen Nervenzellen sowie die Wundheilung des kornealen Epithels zeigen [31, 32, 67–69]. Es gab sogar Hinweise auf die Wirksamkeit von *NGF* Augentropfen bei fortschreitenden Gesichtsfelddefekten beim Primären Offenwinkelglaukom im Menschen [141]. Doch nicht nur aus ophthalmologischer Sicht scheint *NGF* von großem Interesse zu sein. So wurde bereits 1984 die Expression von *NGF* im Kortex in Ratten gezeigt [142]. *NGF* wirkt speziell im zentralen Nervensystem auf die Entwicklung von cholinergen und noradrenergen Neuronen in bestimmten Bereichen des Gehirns [143]. Es wird ferner diskutiert, ob eine Defizienz von *NGF* Alzheimer Demenz begünstigen kann, da die cholinergen Neurone, die im Rahmen der Erkrankung gestört sind, im basalen Vorderhirn streng von *NGF* abhängig sind [144]. Auch bei traumatischen Gehirnverletzungen wird *NGF* vermehrt exprimiert. So konnte gezeigt werden, dass eine Korrelation zwischen *NGF* Expression und Gehirnverletzung besteht, und dass das Vorhandensein von *NGF* zu einem besseren Outcome bei Kindern mit schweren traumatischen Gehirnverletzungen geführt hat [145].

Aufgrund der Vielzahl an Studien aus unterschiedlichen Organsystemen und Organismen, die eindeutig regenerationsassoziierte Effekte auf periphere und zentrale Nervenzellen von *NGF* zeigen, wurde *NGF* in dieser Arbeit als Positivkontrolle verwendet. Wir konnten im Rahmen dieser Studie zeigen, dass 100 ng/ml *NGF* keine negativen Effekte auf das Nervenzellüberleben hat. Nach 24 Stunden zeigte sich eine Zunahme der Zellvitalität unter *NGF* (Abb. 13). Bezogen auf die Gesamtnervenfaserlänge konnte mittels Scratch Assays gezeigt werden, dass die Zugabe von *NGF* zu einer Zunahme der Gesamtnervenfaserlänge führt. Statistisch signifikant war dieses Ergebnis nicht, aber ein statistischer Trend zeichnete sich ab (Abb. 22). Dieses Ergebnis ist nicht gänzlich mit der initialen Hypothese in Einklang zu bringen, zeigt aber, dass eine größere Stichprobe von Vorteil gewesen wäre, um einen möglichen signifikant positiven Effekt von *NGF* auf das Nervenfasernwachstum in dieser Studie zu zeigen.

Im *Single Neuron Assay* konnte gezeigt werden, dass die Zugabe von *NGF* zu signifikant mehr Verzweigungen der Nervenfasern im Vergleich zur Kontrolle führt (Abb. 31). Die dadurch gewonnenen Ergebnisse, dass *NGF* zu einem vermehrten Zellüberleben und auch

zu einer Steigerung der Nervenfasernlänge und Verzweigung führt, deckt sich größtenteils mit den bereits vorliegenden Erkenntnissen. Neben der von uns untersuchten Nervenfasernlänge ist auch die Nervenfaserverzweigung klinisch relevant und kann ein wichtiger Marker bei der CCM, um den Zustand von kornealen Nerven zu beurteilen [122]. Insgesamt konnten wir im Rahmen dieser Studie bestätigen, dass NGF regenerationsassoziierte Effekte auf murine sensorische Nervenfasern hat.

4.4.2 ROCK Inhibitor

Bislang ist noch wenig zum Einfluss von ROCK Inhibitor auf murine sensorische Nervenzellen bekannt. In einigen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass die Inhibition der Rho Kinase diverse Effekte auf die Zellarchitektur sowie positive Auswirkungen auf die korneale endotheliale Wundheilung und den Abfluss des Kammerwassers im Trabekelmaschenwerk hat [72–79]. Song et al. haben in einer kürzlich veröffentlichten *in vitro* und *in vivo* Studie aufgezeigt, dass der ROCK Inhibitor Y-27632 im Kaninchenmodell (100 µmol/L) positive Effekte auf die Proliferation von porzinen kornealen Endothelzellen hat [146]. Die Autoren implizieren ein großes Potenzial der ROCK Inhibition zur Behandlung von Endotheldystrophien. Zu einem ähnlichen Ergebnis kommen Schlötzer-Schrehardt et al. 2021, die unter Nutzung eines *ex vivo* Modells ebenfalls regenerationsassoziierte Effekte von ROCK Inhibitor (Ripasudil) auf Endothelzellen zeigen konnten [147]. Die Studie von Messmer et al. kommt zu dem Schluss, dass der ROCK Inhibitor Y27632 zur Behandlung einer Limbusstammzellinsuffizienz beitragen und die korneale Wundheilung begünstigen könnte, da der ROCK Inhibitor unter anderem die Proliferation von limbalen epithelialen Stammzellen verbessert [148, 149].

Um die Toxizität der Substanzen auf die Neurone auszuschließen, wurde eine Trypanblaufärbung durchgeführt. Wir konnten mithilfe der Vitalitätsfärbung zeigen, dass die Zugabe von ROCK Inhibitor Y27632 in einer Konzentration von 100 µM die Nervenzellvitalität nicht negativ beeinflusst (Abb. 14). Im Verlauf konnte nun das Faserwachstum der Nerven im *Scratch* sowie im *Single Neuron Assay* untersucht werden. Allerdings konnten wir weder im *Scratch Assay* noch im *Single Neuron Assay* einen signifikanten Effekt durch die Zugabe des ROCK Inhibitors aufzeigen (Abb. 23 und 32). Ein potenzieller Erklärungsansatz wäre, dass zu wenig Bildmaterial ausgewertet wurde. Des Weiteren könnte der Einfluss von ROCK Inhibitor auf die Nervenzellen nicht ausgeprägt genug sein, um diesen im Rahmen dieser Studie signifikant belegen zu können. Generell ist festzuhalten, dass die Messergebnisse der Versuche mit ROCK Inhibitor eine große Varianz zeigen. Das heißt, dass die Messungen stark voneinander differieren, sodass die

positiven Effekte von ROCK Inhibitor auf die GNFL nicht in allen Experimenten reproduzierbar war. Insgesamt zeigten sich die hier präsentierten Daten und die aktuell verfügbaren Daten zu den Einflüssen von ROCK Inhibitor auf die Nervenregeneration nicht gänzlich deckungsgleich, was vermutlich durch die zu kleine Stichprobe zu erklären ist. Eine erst kürzlich veröffentlichte Studie unserer Arbeitsgruppe von Mertsch et al. aus dem Jahr 2021 konnte aufzeigen, dass eine größere Stichprobe sehr wohl zu signifikanten Ergebnissen bezüglich der regenerationsfördernden Wirkung von ROCK Inhibitor auf sensorische Nervenzellen kommt [1]. Hier wurden neben dem in der vorliegenden Arbeit präsentierten 2D *in vitro* Modell (*Scratch Assay* und *Single Neuron Assay*) ebenfalls 3D Modellversuche und *in vivo* Versuche durchgeführt. Im Single Neuron Assay und Scratch Assay konnte hier eine signifikante Steigerung der Nervenfaserverzweigung und Steigerung der Nervenfasern insgesamt nach ROCK Inhibitor Behandlung gezeigt werden. Diese umfangreiche Studie bestätigt also den Trend, der die vorliegende Arbeit aufzeigt.

4.4.3 Peroxiredoxine 2 und Conoidin A

Noch weitgehend unbekannt sind die Effekte von Peroxiredoxin 2 und dessen Inhibitor Conoidin A auf murine periphere Nervenzellen. Bekannt aus bisher noch unveröffentlichten Vorarbeiten der Arbeitsgruppe ist derzeit, dass Peroxiredoxine in der Kornea und in murinen *DRG* exprimiert werden. Außerdem ist bereits gezeigt worden, dass Peroxiredoxine in der Hornhaut von Ratten auch speziell nach Verletzung nachgewiesen werden können [150]. Wahlig et al. zeigten 2018, dass Peroxiredoxin 6 in der humanen Kornea, Linse und Retina gefunden wurde und postuliert, dass es eine funktionelle Rolle in diesen Strukturen haben könnte, beispielsweise zum Schutz vor oxidativem Stress [151]. Die Studie von Valek et al. 2015 zeigt, dass auch in *DRG* Peroxiredoxine exprimiert werden. In dieser Tierstudie wurde nach Verletzung des N. ischiadicus die Expression von verschiedenen Peroxiredoxinen in *DRG* unter anderem mittels qrt-PCRs gemessen. Die Expression insbesondere von Peroxiredoxin 4 und 5 wird nach Nervenverletzung hochreguliert, wohingegen Peroxiredoxin 2 nicht vermehrt exprimiert wurde. Außerdem wurde Peroxiredoxin 2 eher nicht in Neuronen, sondern vermehrt in vaskulären Zellen exprimiert [92]. Unsere Ergebnisse ergänzen in diesem Zusammenhang das Verständnis von PRX 2 in *DRG*. Im Rahmen unserer Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Zugabe von PRX 2 in einer Konzentration von 500 nM keinen toxischen Einfluss auf die Nervenzellen hat, denn es kam weder nach 24 noch nach 48 Stunden zu einer Abnahme der Vitalität, wenn die Nervenzellen mit PRX 2 behandelt wurden (Abb. 15). Im *Scratch Assay* und im *Single Neuron Assay* zeigen sich keine signifikanten Effekte bei Zugabe von PRX2 (Abb. 24 und 33). Ursächlich könnte sein, dass in *DRG* zwar generell Peroxiredoxine vorhanden sind und

auch nach Nervenverletzung exprimiert werden, aber speziell PRX 2 keinen regenerationsassoziierten Einfluss auf die murinen Nervenzellen hat. Wie Wahlig et al. und Valek et al. postulieren, sind Peroxiredoxine beispielsweise in den Schutz von Zellen vor oxidativem Stress involviert. So erklärt sich auch, dass die unspezifische Inhibition von Peroxiredoxinen durch 5 μ M Conoidin A zwar nicht zu einer signifikanten Abnahme der Vitalität der Nervenzellen führt (Abb. 16), allerdings sowohl im *Scratch Assay* als auch im *Single Neuron Assay* zu einer signifikanten Abnahme der Nervenfasernlänge und Verzweigung führt (Abb. 25 und 34). Die Analogie der Ergebnisse mit der aktuellen Studienlage lässt darauf schließen, dass Peroxiredoxine generell regenerationsassoziierte Effekte auf Nervenzellen haben und möglicherweise der Subtyp dieser heterogenen Familie eine wichtige Rolle spielt.

4.4.4 SIRT 1 Aktivator und Inhibitor

Im Zusammenhang mit den Sirtuinen (SIRT 1 Aktivator und SIRT1 Inhibitor) gibt es bereits Hinweise auf Assoziationen zu allgemeinen Regulationsmechanismen in der Zelle und speziell am Auge wurden Sirtuine im Zusammenhang mit retinalen Erkrankungen gefunden [94–96]. Einige Grundlagenstudien beschäftigen sich mit der Rolle von Sirtuinen im Rahmen von diabetischen Neuropathien [152, 153]. Zur Untersuchung dieser Fragestellung, werden für diese Studien nicht wie in unserem Projekt die rekombinanten Faktoren und primäre Nervenzellen, sondern transgene Mäuse genutzt, in denen der Signalweg genetisch verändert wurde. Unsere Daten haben gezeigt, dass die Zugabe von SIRT1 Aktivator in einer Konzentration von 100 nM und SIRT1 Inhibitor in einer Konzentration von 5 μ M nicht zu einer Abnahme der Vitalität der murinen Nervenzellen führte (Abb. 17-18). Darüber hinaus war erkennbar, dass die Zugabe von SIRT1 Aktivator und SIRT1 Inhibitor in den genutzten Konzentrationen nicht zu einer signifikanten Änderung der Gesamtnervenfasernlänge im *Scratch Assay* (Abb. 26-27), noch der Faserverzweigung im *Single Neuron Assay* (Abb. 35-36) führte. Im Gegensatz dazu konnten Guo et al. 2011 zeigen, dass eine Überexpression von SIRT1 in primären Neuronen zu einer Wachstumszunahme von Neuriten um bis zu 30% im Vergleich zu Neuronen der Wildtypen führte. Die Verzweigungsrate der Neuriten stieg sogar bis zu circa 50% an [98]. Bei unterschiedlichem Studien-Design handelte es sich bei Guo et al. um genetisch veränderte Mäuse, die vermehrt SIRT1 in den Neuronen exprimieren. In unserer Studie wurden primäre Neurone von Wildtyp Mäusen verwendet, die exogen mit den Sirtuinen behandelt wurden. Es bleibt in weiteren Studien zu klären, ob die Sirtuine in der von uns applizierten Form ähnlich wirken können und ob eine ausreichende Konzentration in der Zelle erreicht wird, sodass eine signifikante Wirkung sichtbar wird.

4.4.5 STAT3 Inhibitor

Über den STAT3 Signalweg wurden bereits zahlreiche Studien veröffentlicht, da dieser Signalweg ubiquitär im menschlichen Körper eine Rolle spielt. Neuerdings wächst auch das Interesse an STAT3 im Zusammenhang mit dem *DES*. So postulierten Qu M. et al. 2019, dass die Inhibition von STAT3 mit S3I-201 therapeutische Effekte auf das murine Trockene Auge haben kann [101]. In dieser kürzlich veröffentlichten *in vivo* Studie wurde gezeigt, dass die topische Applikation von STAT3 Inhibitor zur verbesserten epithelialen Barrierefunktion und gesteigerten Tränenproduktion führten und somit auf sehr wichtige Aspekte der Entstehung des *DES* abzielt. Unklar ist bisher, welchen Effekt STAT3 Inhibitor auf die murinen sensiblen Nervenzellen hat. Erste Ergebnisse zeigt diese Arbeit. Bezogen auf die Vitalität der Neurone konnte mittels Trypanblaufärbung eindeutig bewiesen werden, dass die Zugabe von STAT3 Inhibitor in der Konzentration von 25 nM keinen negativen Einfluss auf das neuronale Zellüberleben hatte (Abb. 19). Bezogen auf das Nervenfasernwachstum konnte im *Scratch Assay* eine signifikante Abnahme der Gesamtnervenfasernlänge detektiert werden (Abb. 28). Auch die Effekte auf ein einzelnes Neuron wurden im *Single Neuron Assay* gezeigt. Hier führte die Zugabe von STAT3 Inhibitor zu einer signifikanten Abnahme des Fasernwachstums und zu deutlich weniger Faserverzweigungen im Vergleich zu unbehandelten Neuronen (Abb. 37). Daraus lässt sich ableiten, dass die Inhibition von STAT3 eher negative Effekte auf die Fasernregeneration hat und das Wachstum und die Verzweigung der Nervenfasern inhibiert. Hier stehen die präsentierten Ergebnisse im Einklang mit den bereits publizierten Studien. Bareyre et al konnten 2011 ebenfalls zeigen, dass die selektive Deletion von STAT3 in murinen *DRG* die Regeneration von peripheren Nervenfasern nach einer Nervenverletzung beeinträchtigte [154]. Im Gegensatz dazu führte die Überexpression von STAT 3 (durch viralen Gentransfer) in dieser Studie zu einem vermehrten Auswachsen von Nervenfasern und Kollateralen bei *DRG* [154]. Aufgrund von mangelnder Verfügbarkeit stand das murine rekombinante Protein STAT3 für diese Arbeit nicht zur Verfügung. Allerdings wäre in Zukunft von größtem Interesse, ob die Hypothese, dass STAT3 regenerationsassoziierte Effekte auf die murinen *DRG* hat, zu verifizieren ist.

4.4.6 VEGF-A

Vascular Endothelial Growth Factor A (VEGF-A), ein angiogenes Protein, wird mit Neuroprotektion in Zusammenhang gebracht und scheint in die Nervenregeneration involviert zu sein [104–106]. Zum Beispiel für kortikale Nervenzellen in Ratten wirkt es stimulierend und neuroprotektiv [104]. Rosenstein et al haben bereits zeigen können, dass die Zugabe von VEGF-A in Explantkulturen aus dem Rückenmark von Mäusen zu einem

vermehrten Auswachsen von Neuriten führte [155]. Sondell et al konnten zeigen, dass VEGF positiv auf das Neuritenwachstum und das Zellüberleben in murinen DRG wirkt [156]. Dass VEGFA das Zellüberleben nicht negativ beeinflusst, konnte auch in der Studie mithilfe des Vitalitätsassays gezeigt werden. So führte die Zugabe von 100 nM VEGF-A nicht zu einer Abnahme der Vitalität der Neurone im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 20). Des Weiteren konnten Yu CQ et al. zeigen, dass die Zugabe von VEGF in einer Konzentration von 50 ng/ml nach sechs Tagen in einer murinen trigeminalen Explantkultur zu einer Zunahme der Nervenfaserdichte führte [107]. Die Autoren untersuchten ebenfalls die Effekte von Bevacizumab, einem VEGF-A Inhibitor, diesmal aber mit dissoziierten trigeminalen Neuronen. So konnten sie nachweisen, dass die Nervenfaserdichte unter Behandlung mit Bevacizumab um bis 16.9 % abnahm im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Auch im *in vivo* Mausmodell war dieser Effekt reproduzierbar. In anderen Studien im Rattenmodell wurde ebenfalls postuliert, dass Bevacizumab durch topische Gabe die epitheliale korneale Wundheilung verzögert [157, 158]. Darüber sind sich die Forscher allerdings nicht einig. Denn Bock et al. postulierten 2009 in ihrer *in vivo* Mausstudie, dass Bevacizumab sehr wohl sicher auf der Augenoberfläche angewendet werden kann, da sie keine signifikanten negativen Einflüsse auf die normale korneale Wundheilung oder die Nervenfaserdichte haben [159]. Allerdings sollte der Befund unter Therapie laut Autorenschaft weiter kontrolliert werden. Interessanterweise bestehe auch ein Unterschied zwischen der Wirkungsweise von VEGF-A und VEGF-B bezogen auf das Nervenfaserverwachstum und die Faserverzweigung. Guaiquil VH et al. zeigten in einer 2014 veröffentlichten Studie, dass die Zugabe von VEGF-B in einer Konzentration von 50 ng/ml nach drei Tagen zu einer Zunahme des Faserwachstums von kultivierten Nervenzellen aus dem Ganglion trigeminale im Vergleich zu VEGF-A behandelten Neuronen führte. Außerdem war der Nervenfaserverzweigungsgrad viermal höher. Laut den Autoren ist VEGF-B dem VEGF-A generell bei Augenoberflächenstörungen überlegen, da VEGF-B eine eher geringe angiogene Wirkung aufweist, was im Hinblick auf die Applikation auf die Kornea natürlich vorteilhafter ist, da die Kornea möglichst avaskulär bleiben soll [160]. Da in der vorliegenden Arbeit weder im *Single Neuron* noch im *Scratch Assay* signifikante Einflüsse von VEGF-A auf das Faserwachstum der murinen, sensorischen Nervenzellen nachweisbar waren (Abb. 29 und 38), wäre natürlich interessant, VEGF-B genauer zu untersuchen, da es eventuell potenter wirkt. Man könnte außerdem die verwendete Konzentration von 100 nM erhöhen. Insgesamt ist VEGF ein potenzieller Kandidat, um die Nervenregeneration zu verbessern; allerdings sollte die Umsetzbarkeit der topischen Anwendung im Hinblick auf die angiogene Wirkung evaluiert werden. Besonders bei vorgeschädigten Augen oder komplexen Hornhautbefunden, wie es bei der NK im fortgeschrittenen Stadium manchmal vorkommen kann, ist die Behandlung mit VEGF disputabel und sollte weiterführend untersucht werden.

4.4.7 PI3K Inhibitor

Der P3K Signalweg ist in einer Vielzahl von metabolischen Prozessen im menschlichen Körper involviert. Auch in Neuronen könnte PI3K und dessen Inhibitor eine wichtige Rolle spielen [108, 110, 161]. Der genaue Zusammenhang mit der Regeneration bei Nervenzellen ist bis heute noch nicht vollständig geklärt. In der vorliegenden Arbeit wurden die Einflüsse von PI3K Inhibitor in einer Konzentration von 5 μM auf die murinen sensiblen Nervenzellen untersucht. Zunächst erfolgte ein Toxizitätsausschluss. Wir konnten zeigen, dass die Inhibition von PI3K in den *DRG* nicht zu einer Abnahme der Vitalität der Neurone führte (Abb. 21). So konnten wir mittels der Trypanblaufärbung die Ergebnisse von Kimpinski K et al., bestätigen, die schon 2001 zeigten, dass die Zugabe des PI3K Inhibitors LY294002 sowohl in der Konzentration von 2 μM als auch 20 μM keinen signifikant negativen Effekt auf das Zellüberleben hat [162]. Interessanterweise haben die Autoren auch den Anteil von neuritentragenden *DRG* von Ratten unter Behandlung mit PI3K Inhibitor in Kombination mit NGF *in vitro* untersucht. Nach 12 Stunden war noch kein signifikanter Effekt auf das Neuritenwachstum zu sehen. Nach 36 Stunden führte die Zugabe von PI3K Inhibitor allerdings dosisabhängig zu einer Abschwächung des neurotrophen Effekts von NGF. Außerdem führte die Zugabe einer sehr hohen Dosis von PI3K Inhibitor von 200 μM zu einer starken Inhibition des Neuritenwachstums. Dieses Ergebnis konnten wir in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigen. Hier konnte gezeigt werden, dass nach 48 Stunden unter Zugabe von PI3K Inhibitor in einer Konzentration von 5 μM die GNFL signifikant zunahm (Abb. 30). Allerdings muss angemerkt werden, dass sich die Studien hier durch den Messzeitpunkt, die Kombination aus NGF und PI3K Inhibitor und die verwendete Konzentration von PI3K Inhibitor unterschieden und somit nicht gänzlich vergleichbar sind. Besonders das Zusammenspiel aus verschiedenen Signalwegen sollte in zukünftigen Studien untersucht werden. Dafür ist ein 2D *in vitro* Modell allerdings nicht ausreichend. Unter genauer Betrachtung der Auswirkungen von PI3K Inhibitor auf ein einzelnes Neuron sowie dessen Verzweigungsgrad, führten wir auch mit PI3K behandelten Zellen einen *Single Neuron Assay* durch. Dieser ergab keinen signifikanten Unterschied zur Kontrolle (Abb. 39). An dieser Stelle ist die Fragestellung interessant, warum die Zugabe von PI3K Inhibitor im *Single Neuron Assay* keinen Effekt hatte. Ein Erklärungsansatz könnte die große Variabilität der Single Neurons im Vergleich zum Zellverband oder die zu kleine Stichprobe sein. Für die vorliegende Arbeit wurde das aktive Protein verwendet. Interessant wäre, welche Effekte klinisch angewandte VEGF Inhibitoren zeigen. Es erscheint vielversprechend, diese Substanzen in unsere Experimente einzubeziehen.

4.5 EVALUATION VON VITALITÄT, FASERWACHSTUM UND FASERVERZWEIGUNG

Mittels verschiedener Assays wurden die funktionellen Effekte auf Vitalität, Faserwachstum und Faserverzweigung der Nerven analysiert. Darauf aufbauend wurde zur Analyse zugrundeliegender Signalwege eine quantitative real time PCR durchgeführt.

Im ersten Schritt sollte ausgeschlossen werden, dass die Substanzen toxisch auf die Nervenzellen wirken. Dafür erfolgte zunächst ein Viabilitätsassay, der WST-1 Assay. Mittels des WST-1 Assays ist es möglich, die mitochondriale Aktivität und damit den aktiven Zellmetabolismus zu messen [111]. Damit lässt sich eine Aussage darüber treffen, ob Substanzen in bestimmten Konzentrationen die Viabilität von Zellen beeinträchtigen. Bei der Durchführung des WST-1 Assays in dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass zwischen den unbehandelten Kontrollneuronen und den mit ROCK Inhibitor und STAT3 Inhibitor behandelten Neuronen kein signifikanter Unterschied bezogen auf die gemessene Optische Dichte bestand (Abb. 10-11). Dieses Ergebnis suggeriert, dass die genutzten Faktoren keinen negativen Einfluss auf die Zellvitalität haben. Allerdings ist hier limitierend anzumerken, dass die initial gemessene optische Dichte im Mittel sehr niedrig ausfiel und im Laufe der 48 Stunden noch weiter abfiel. Fraglich bleibt hier ob die Zellen während des Beobachtungszeitraum absterben oder ob die gewählte Methode zur validen Einschätzung der neuronalen Viabilität adäquat ist. So muss an dieser Stelle festgehalten werden, dass die fehlende Proliferationsfähigkeit von Nervenzellen dazu führt, dass die Zellen kaum metabolisch aktiv sind. Dies führt wiederum dazu, dass kein Farbstoff im WST-1 Assay umgesetzt werden kann. Dadurch wird photometrisch kein Signal also eine sehr geringe optische Dichte gemessen und es scheint so, als würde nur ein kleiner Teil der Zellkultur vital sein. Hier könnte also eine methodische Verzerrung der realen Zellviabilität vorliegen. Neben dem sehr geringen Metabolismus von kultivierten primären Nervenzellen muss in diesem Zusammenhang auch die niedrige Zellzahl von 1500 Zellen pro well für den WST-1 Assay kritisch betrachtet werden. Die Gesamtzellzahl könnte in diesem Experiment zu niedrig gewesen sein, als dass die Viabilität ausreichend hätte gemessen werden können. Im Vergleich zu unserer verwendeten Zellzahl von 1500 Zellen, verwenden zum Beispiel Burroughs et al. 25000 Zellen, um die Zellviabilität ihrer primären neuronalen Zellen mithilfe eines Viabilitätsassays untersuchen zu können [163]. Der Grund für die niedrige Zellzahl für den Viabilitätsassay, ist die limitierte Verfügbarkeit der DRG. Die Präparation der DRG, die nicht unerheblich anspruchsvoll und zeitintensiv war, ergab im Mittel pro Versuchstier 2×10^4 bis $3,5 \times 10^4$ Nervenzellen. Ziel war es möglichst wenig Versuchstiere verwenden zu müssen, was die Zellzahl, die für die Viabilitätsassay verwendet werden konnte, begrenzte.

Generell resultierte im Rahmen dieser Arbeit aus dem WST-1 keine valide Aussagekraft zur Vitalität von sensorischen Nervenzellen.

Um die verfügbare Zellzahl für zukünftige Arbeiten zu erhöhen, wäre die Nutzung von Zelllinien möglich. Melli et al. wiesen darauf hin, dass die Nutzung einer immortalisierten neuronalen *DRG* Zelllinie von Vorteil sei, um neue regenerationsassoziierte Substanzen in Reihenuntersuchungen zu untersuchen [127]. Mit deutlich erhöhten Zellzahlen könnte man zum Beispiel im Vorfeld valide Dosis-Wirkungsstudien durchführen, um die optimale Konzentration für die zu untersuchenden Substanzen zu evaluieren. Wir haben in Vorarbeiten lediglich orientierende Versuche zur Konzentrationsbestimmung durchgeführt, da große Screens aus den oben genannten Gründen nicht möglich waren.

In einem zweiten Schritt wurde eine andere Methode angewendet, um die Vitalität der Neuronen unter Zugabe der Substanzen analysieren zu können.

Es wurde dafür eine Vitalitätsfärbung durchgeführt. Die Vitalität gibt im Gegensatz zur Viabilität den Anteil von vitalen Zellen im Vergleich zur Gesamtzellzahl an. Um also den Einfluss der Substanzen auf die Vitalität der Neurone zu untersuchen, wurden die Neurone zu verschiedenen Zeitpunkten (0 h, 24 h, 48 h) mit Trypanblau gefärbt. Diese weit verbreitete und etablierte Färbetechnik erlaubte uns, eine Unterscheidung der Zellen in vitale (ungefärbte) und avitale (bläulich gefärbte) Zellen und damit die Bestimmung der prozentualen Vitalität vorzunehmen. Man muss an dieser Stelle anbringen, dass die Trypanblaufärbung einer gewissen Variabilität und einer zwar geringen, aber trotzdem vorhandenen Fehleranfälligkeit obliegt [164]. So gehen Piccinini et al 2017 davon aus, dass eine große Variabilität in der Zellzahlmessung vorliegt, wenn die Trypanblaufärbung genutzt wird. Das liege, so die Autoren, daran, dass das Trypanblau toxische Effekte auf Zellen haben kann, und dass deshalb der Zeitpunkt der Zellzählung sehr kurz nach der Färbung stattfinden muss, sowie dass einige Zellen den Farbstoff nicht binden würden. Die Autoren kommen zu dem Schluss, dass vor dem Hintergrund der Einschränkungen, die Zuverlässigkeit der Trypanblaufärbung herabgesetzt sein kann.

Trotzdem schien die Methodik für diese Arbeit adäquat und effektiv zur Evaluation der Zellvitalität der murinen Nervenzellen. Folglich konnten wir zeigen, dass sowohl nach 24 Stunden als auch nach 48 Stunden die Zugabe der Substanzen keinen negativen Einfluss auf die neuronale Vitalität hatte (Abb. 13-21).

Nachdem der Toxizitätsausschluss abgeschlossen war, erfolgte im Anschluss die Evaluation der Faktoren hinsichtlich des Faserwachstums der Nervenzellen.

In einem dritten Schritt erfolgte also die Evaluation der neun Faktoren hinsichtlich des Nervenfaserverwachstums im Wundheilungsassay (*Scratch Assay*, Abb. 22-30). Bei dem sogenannten *Scratch Assay* werden Zellen in einer definierten Zahl auf Zellkulturplatten ausgesät. Nach Adhärenz der Zellen wird ein *Scratch* (dt. Kratzer) durchgeführt, der die Zellen in diesem Bereich entfernt und bereits ausgewachsene Nervenfasern abtrennt. Die Fasern, die in einem gewissen Zeitintervall in das Scratch Areal eingewachsen sind, können dann im Verlauf leicht quantifiziert werden. Zunächst primär zur Untersuchung von Zellmigration und Proliferation genutzt, wird der Assay heute auch in Hinblick auf die Wundheilung von sensorischen Nervenfasern angewandt [132]. Nach der Aussaat wurden die Zellen inkubiert und dann ein Scratch Assay durchgeführt. Es wurde daraufhin sofort (0 Stunden), nach 24 Stunden und dann erneut 48 Stunden später dieselbe Stelle des Scratches fotografiert und die Nervenfasern, die in das Scratch Areal eingewachsen waren, vermessen. Dann erfolgte der Vergleich der behandelten Neurone mit den unbehandelten Neuronen. Die Ergebnisse der Scratch Assays zeigen allerdings, dass einige Experimente keine signifikanten Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Neuronen aufzeigen konnten (zum Beispiel Scratch Assay NGF, Abb. 22). Ursächlich hierfür könnte eine zu kleine Stichprobe gewesen sein, die dazu geführt haben könnte, dass es nicht zu statistisch stringenten Ergebnissen gekommen ist. Zukünftig sollten weitere Studien mit größeren Stichproben angeschlossen werden, um die Ergebnisse dieser Arbeit in Hinblick auf die Faktoren zu erweitern.

Um die Erkenntnisse über die Wirkung der Substanzen auf das Axonwachstum zu ergänzen, wurde im nächsten Schritt ein Einzelzellassay (*Single Neuron Assay*, Abb. 31-39) durchgeführt.

Hierfür erfolgte die Aussaat vereinzelter Neurone und die anschließende Untersuchung der Faserverzweigung 48 Stunden nach Substanzzugabe. Verglichen wurden hier wieder unbehandelte mit behandelten Neuronen. Für den Vergleich wurde die sogenannte Sholl Analyse verwendet [113]. Unter Nutzung des Single Neuron Assays und Sholl Analyse konnten wir simultan zwei verschiedene Aussagen darüber treffen, wie die Kandidaten auf ein einzelnes Neuron wirken. Erstens konnten wir dadurch auf die Faserlänge eines Neurons schließen und zweitens auf den Verzweigungsgrad. Das heißt, diese Methode erlaubte uns die Generierung einer Zusatzinformation über die GNFL hinaus. Auch in der Kornea resultiert daraus einen Unterschied, ob es eine singuläre lange Faser gibt oder aber mehrere Fasern, die stärker verzweigt sind und somit mehr Berührungspunkte miteinander haben, da in der Kornea ein sehr hoher Verzweigungsgrad der Nervenfasern vorliegt [10].

Mithilfe dieser Methodik konnten wir für drei Substanzen (NGF, Conoidin A, STAT3 Inhibitor) statistisch signifikante Ergebnisse erzielen. Die fehlende Signifikanz bei den anderen Faktoren könnte dadurch erklärbar sein, dass individuelle Zellen ein sehr heterogenes Wachstumsverhalten aufweisen. Hier zeigte sich erneut, dass die gewählte Größe der Stichprobe zu gering war. Berücksichtigt werden sollte in diesem Zusammenhang, wie auch Ali-Ali H, (2017) anmerkten, dass es selbst bei einer relativ homogenen Population von Nervenzellen eine gewisse statistische Variabilität in der Länge von neu ausgebildeten Nervenfasern bei Betrachtung einer individuellen Zelle gibt [132]. Da wir in diesem Assay aber gezielt die Effekte der Substanzen auf eine einzelne Zelle und deren Verzweigungsmuster untersuchen wollten, musste bei den Messungen mit einer größeren statistischen Variabilität gerechnet werden. Um diese Variabilität abzumildern, könnte die verwendete Analyse künftig etwas modifiziert werden. Denkbar wäre, mehr als $n=3$ Bilder auszuwerten oder aber mehr als sieben konzentrische Kreise mit einem größeren Gesamtdurchmesser zu verwenden, um die Datensätze zu vergrößern. Es sollte berücksichtigt werden, dass die Auswertung für diese Arbeit manuell durchgeführt wurde und ein erheblicher Zeitaufwand damit verbunden war. Deshalb wäre, wie auch Langhammer CG et al. 2010 schon dargelegt haben, eine semi-automatisierte Sholl Analyse sinnvoll [165]. Verwendet werden könnten hierfür beispielsweise immunhistochemisch gefärbte Nervenzellen, die dann automatisiert ausgewertet werden könnten.

Im letzten Schritt des Projekts folgte die Expressionsanalyse der verschiedenen Substanzen auf mRNA Ebene. Hier wurde der Rho Kinase Signalweg untersucht. Um die Frage zu beantworten, ob bestimmte Zielgene in den Zellen vermehrt oder vermindert exprimiert wurden, wenn diese „*gescratched*“ wurden und mit den Faktoren behandelt wurden, fand die qrt-PCR Verwendung. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die mRNA Expressionsmuster mehrerer Zielgene untersucht. Die von uns verwendeten Primer waren ROCK 1, ROCK 2, G43, LIMK, Tubulin, NGF, SRT, PRX2, GSK3 β , NT3, CDC42, BDNF und CNTF. Leider waren lediglich die Ergebnisse von ROCK 2 verwertbar, da es bei Verwendung der anderen Primer am ehesten zu Verunreinigungen der Leerproben kam. Trotz Wiederholung der Experimente konnten hierdurch keine validen Daten erzielt werden, da die $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Formel nicht berechnet werden konnte, für die nämlich eine reine Leerprobe unabdingbar ist. Schlussendlich lag nicht genügend Zellmaterial vor, um die qrt-PCR erfolgreich zu wiederholen. Daher kommen in dieser Arbeit lediglich die Ergebnisse zum ROCK Inhibitor Y27632 zur Darstellung.

Der von uns verwendete ROCK Inhibitor Y27632 inhibiert den Signalweg der Rho Kinasen ROCK 1 und ROCK 2 spezifisch [166]. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden,

dass die Zugabe von Y27632 nach 48 Stunden zu einer Reduktion der relativen mRNA Expression von ROCK 2 im Vergleich zu unbehandelten Kontrollneuronen führt (Abb. 40). Das bedeutet, dass die Expression von ROCK 2 von Y27632 herunterreguliert werden kann. Limitierend muss man an dieser Stelle anmerken, dass die Stichprobe mit n=1 sehr klein war. Ebenfalls muss angemerkt werden, dass Y27632 eine Halbwertszeit von circa 12 Stunden hat. Die Neurone wurden aber erst nach 48 Stunden Wachstum und Behandlung mit Y27632 für die PCR entnommen. Daher bleibt abschließend ungeklärt, ob die Reduktion der mRNA Expression wirklich von Y27632 abhängig war, oder ob es natürlicherweise zu einer Reduktion der mRNA Expression von ROCK 2 kommt, also unabhängig von der Zugabe des ROCK Inhibitors. In einer erst kürzlich veröffentlichten Studie der Arbeitsgruppe konnte allerdings sehr wohl gezeigt werden, dass Y27632 die mRNA Expression sowohl von ROCK 1 als auch ROCK 2 signifikant herunterreguliert [1].

Da in der vorliegenden Arbeit viele „non template controls“ nicht negativ (also leer) waren, konnten die Versuche mit den Primern ROCK 1, G43, LIMK, NGF, SRT, PRX2, GSK3 β , NT3, Tubulin, CDC42, BDNF und CNTF nicht ausgewertet werden. Hier sollten zukünftig noch weitere Experimente folgen, um die Datenmenge zu vergrößern. Außerdem sollten die gezeigten mRNA Expressionsergebnisse auch auf Protein Ebene unter Nutzung von Westernblots verifiziert werden. Dies wäre auch deshalb sinnvoll, da die Neurone in den gezeigten Experimenten sowohl mit Proteinen als auch mit chemischen Inhibitoren behandelt wurden und würde die hier gezeigten Ergebnisse sinnvoll ergänzen.

Hinsichtlich der Ergebnisse der PCR sollte insgesamt bedacht werden, dass für die Kultivierung der Nervenzellen eine Axotomie sowie eine Dissoziation durchgeführt werden muss (siehe Abschnitt 2.2.1. und 2.2.2). Malin et al. wies 2007 daraufhin, dass die Axotomie selbst zu einer Modulierung der Rezeptoren von Wachstumsfaktoren führen kann [126]. Um diesen Einfluss ebenfalls zu untersuchen, könnten in weiteren Studien direkt gewonnene DRG genutzt werden, welche nicht erst kultiviert werden. Es sollte reflektiert werden, dass dies dafür sorgen würde, dass die Neurone keine zusätzlichen Faktoren ausschütten können.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein adäquates Modellsystem zur Identifikation von neuen regenerationsassoziierten Faktoren für die korneale Nervenregeneration erfolgreich verwendet. Die Untersuchung des Wachstumsverhaltens der murinen sensorischen Nervenzellen konnte unter Nutzung von Poly-D-Lysin und Laminin beschichteten Zellkulturplatten optimiert werden. Durch eine Vitalitätsfärbung wurde ausgeschlossen, dass die Substanzen in den genutzten Konzentrationen toxische Effekte auf die Neurone haben. Im Verlauf konnte mithilfe eines Wundheilungsassays, die Nervenfasernlänge nach

Verletzung evaluiert werden. Diese Ergebnisse wurden durch die genauere Betrachtung des Verzweigungsmusters der Fasern im Single Neurone Assay bestätigt. Im letzten Schritt wurde die Expressionsanalyse der Substanzen mithilfe von qrt-PCRs durchgeführt.

Insgesamt ist kritisch zu betrachten, dass eine begrenzte Verfügbarkeit der primären Nervenzellen einen limitierenden Faktor bei dieser Untersuchung darstellte. Andere Forschungsgruppen empfehlen diesbezüglich die Verwendung von Zelllinien. So ist die Nutzung von neuronalen sensorischen Zelllinien zur Erforschung von Erkrankungen des peripheren Nervensystems laut Haberberger et al. perspektivisch sinnvoll [167]. Vorteile sind zum Beispiel die unbegrenzte und auch kurzfristige Verfügbarkeit. Nachteilig ist jedoch, dass es sich dabei nicht um primäre Nervenzellen handelt. Dennoch wird die experimentelle Verwendung von innovativen Versuchssubstraten in Zukunft wohl eine weitreichende Rolle spielen.

4.6 SCHLUSSFOLGERUNGEN

Die Neurotrophe Keratopathie ist gekennzeichnet durch die Schädigung von kornealen Nerven und kann konsekutiv zur Erblindung führen. Ziel der Arbeit war es daher, neue regenerationsassoziierte Faktoren für die korneale Nervenregeneration zu identifizieren, um daraus potenziell neue Behandlungsformen zu schaffen.

Die vorliegende Arbeit stellt die regenerationsassoziierten Effekte von neun Faktoren auf murine sensorische Nervenzellen in einem 2D *in vitro* Modell dar.

Im Rahmen dieses Projektes wurden zwei besonders relevante neue Kandidaten für die korneale Nervenregeneration herausgestellt. Zu nennen wäre hier STAT3, da die Inhibition von STAT3 sowohl im *Scratch Assay* als auch im *Single Neuron Assay* zu einer signifikanten Hemmung der Nervenregeneration geführt hat. Ebenfalls aus diesem Grund relevant einzuschätzen sind die Peroxiredoxine, da der unspezifische Inhibitor Conoidin A auch sowohl im *Single Neuron Assay* und *Scratch Assay* zu einer signifikanten Hemmung der Nervenregeneration geführt hat.

Signifikante regenerationsfördernde Effekte konnten durch die Zugabe von *NGF* gezeigt werden.

Im finalen Schritt erfolgte die Expressionsanalyse der Substanzen mittels qrt-PCR. Diese ergab, dass die Inhibition von ROCK nach 48 Stunden zu einer signifikanten Abnahme der mRNA Expression von ROCK 2 führte.

Einschränkend ist zu konstatieren, dass die Stichprobe schlussendlich nicht ausreichend war, um in allen Fällen signifikante Unterschiede aufzeigen zu können. Hier sind Studien mit größeren Stichproben nötig. Des Weiteren ist zukünftig die Nutzung von humanen neuronalen Zelllinien denkbar, um die in diesem Projekt eher begrenzte Zellzahl zu erhöhen. Automatisierte Auswertungsmethoden könnten zusätzlich eine effizientere Analyse des Bildmaterials ermöglichen.

4.7 AUSBLICK

Zukünftig sollten die Untersuchungen um weitere potenziell vielversprechende Substanzen ergänzt werden. Weiterhin könnten auch Kombinationen aus mehreren Faktoren interessant sein, um die regenerationsassoziierten Effekte zu potenzieren. Natürlich ist auch außerhalb eines 2D *in vitro* Modells die Testung der analysierten Faktoren sinnvoll. Beispielsweise in 3D Modellen der Kornea, die schon zur Analyse der kornealen Nervenregeneration zum Einsatz kommen [1]. Außerdem sind *in vivo* Versuche unerlässlich. Erst im Tiermodell wird eine natürliche Umgebung geschaffen, die vergleichbar mit dem menschlichen Auge ist. Für den ROCK Inhibitor liegen bereits Daten vor, die über das 2D *in vitro* Modell hinaus gehen und verifizieren, dass die ROCK Inhibition die Nervenregeneration sensibler Nervenfasern fördert. Nachfolgende Studien könnten daher zu den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Faktoren folgen, um ein vollständiges Bild über die Effekte der genutzten Faktoren zu erhalten.

Sollten sich die Substanzen *in vivo* bewährt haben und die Ergebnisse reproduzierbar sein, ist es denkbar, die Substanzen als lokal applizierbare Augentropfen zu verwenden und den Effekt zu untersuchen.

Die Möglichkeiten, die sich durch die Ergebnisse der vorliegenden Studie ergeben, sind vielfältig. Hier ist festzuhalten, dass die dadurch gewonnenen Erkenntnisse durchaus auch außerhalb der Ophthalmologie relevant sein können. Sie könnten zum Beispiel Anwendung in der Erforschung von anderen neurodegenerativen Erkrankungen finden.

Bezogen auf die Neurotrophe Keratopathie konnten aber durch diese grundlagenexperimentelle Arbeit neue Perspektiven geschaffen werden, die im Verlauf zu realen therapeutischen Optionen werden könnten.

Literatur

1. Mertsch S, Neumann I, Rose C, Schargus M, Geerling G, Schrader S (2021) The effect of Rho Kinase inhibition on corneal nerve regeneration in vitro and in vivo. *The Ocular Surface* 22:213–223. doi:10.1016/j.jtos.2021.08.011
2. Laibson PR (1972) Cornea and Sclera. *Arch Ophthalmol* 88(5):553–574. doi:10.1001/archopht.1972.01000030555018
3. Dua HS, Faraj LA, Said DG, Gray T, Lowe J (2013) Human Corneal Anatomy Redefined. A Novel Pre-Descemet's Layer (Dua's Layer). *Ophthalmology* 120(9):1778–1785. doi:10.1016/j.ophtha.2013.01.018
4. Gipson IK (1992) Adhesive mechanisms of the corneal epithelium. *Acta Ophthalmol Suppl* (202):13–17. doi:10.1111/j.1755-3768.1992.tb02162.x
5. Riley MV (1971) The role of the epithelium in control of corneal hydration. *Experimental Eye Research* 12(1):128–137. doi:10.1016/0014-4835(71)90137-0
6. Meek KM, Boote C (2004) The organization of collagen in the corneal stroma. *Experimental Eye Research* 78(3):503–512. doi:10.1016/j.exer.2003.07.003
7. Meek KM, Knupp C (2015) Corneal structure and transparency. *Prog Retin Eye Res* 49:1–16. doi:10.1016/j.preteyeres.2015.07.001
8. Bourne WM, Nelson LR, Hodge DO (1997) Central corneal endothelial cell changes over a ten-year period. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38(3):779–782
9. Sridhar MS (2018) Anatomy of cornea and ocular surface. *Indian J Ophthalmol* 66(2):190–194. doi:10.4103/ijop.IJO_646_17
10. Rózsa AJ, Beuerman RW (1982) Density and organization of free nerve endings in the corneal epithelium of the rabbit. *PAIN* 14(2):105–120. doi:10.1016/0304-3959(82)90092-6
11. Heigle TJ, Pflugfelder SC (1996) Aqueous tear production in patients with neurotrophic keratitis. *Cornea* 15(2):135–138. doi:10.1097/00003226-199603000-00005
12. SIGELMAN S, FRIEDENWALD JS (1954) MITOTIC AND WOUND-HEALING ACTIVITIES OF THE CORNEAL EPITHELIUM. Effect of Sensory Denervation. *AMA Arch Ophthalmol* 52(1):46–57. doi:10.1001/archopht.1954.00920050048005
13. Ruskell GL (1974) Ocular fibres of the maxillary nerve in monkeys. *J Anat* 118(Pt 2):195–203
14. Drenckhahn D, Asan E, Benninghoff A (Hrsg) (2004) Herz-Kreislauf-System, lymphatisches System, endokrines System, Nervensystem, Sinnesorgane, Haut, 16. Aufl. *Anatomie, makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie / Benninghoff; Drenckhahn ; Bd. 2. Elsevier Urban & Fischer, München*

15. Standring S, Gray H (2008) Gray's anatomy. The anatomical basis of clinical practice. Churchill Livingstone/Elsevier, [Edinburgh]
16. Schünke M, Schulte E, Schumacher U, Voll M, Wesker K (2015) Prometheus Lernatlas - Kopf, Hals und Neuroanatomie, 4. Aufl. Thieme eRef. Thieme, Stuttgart
17. Marfurt CF, Cox J, Deek S, Dvorscak L (2010) Anatomy of the human corneal innervation. *Experimental Eye Research* 90(4):478–492.
doi:10.1016/j.exer.2009.12.010
18. He J, Bazan HEP (2016) Neuroanatomy and Neurochemistry of Mouse Cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 57(2):664–674. doi:10.1167/iovs.15-18019
19. Müller LJ, Marfurt CF, Kruse F, Tervo TMT (2003) Corneal nerves. Structure, contents and function. *Experimental Eye Research* 76(5):521–542. doi:10.1016/S0014-4835(03)00050-2
20. Schimmelpfennig B (1982) Nerve structures in human central corneal epithelium. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 218(1):14–20. doi:10.1007/BF02134093
21. Müller LJ, Vrensen GF, Pels L, Cardozo BN, Willekens B (1997) Architecture of human corneal nerves. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38(5):985–994
22. Al-Aqaba M, Fares U, Suleman H, Lowe J, Dua H (2009) Architecture and distribution of human corneal nerves. *British Journal of Ophthalmology* 94:784–789
23. Dartt DA, Bex P, D'Amore P, Dana R, Mcloon L, Niederkorn J (2011) Ocular Periphery and Disorders. Marfurt CF. *Corneal Nerves: Anatomy*. Elsevier Science
24. Müller LJ, Pels L, Vrensen GF (1996) Ultrastructural organization of human corneal nerves. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37(4):476–488
25. Gray H, Lewis WH *Anatomy of the human body*. Philadelphia, Lea & Febiger, 1918; Bartleby.com, 2000. www.bartleby.com/107/
26. Stapleton F, Marfurt C, Golebiowski B, Rosenblatt M, Bereiter D, Begley C, Dartt D, Gallar J, Belmonte C, Hamrah P, Willcox M (2013) The TFOS International Workshop on Contact Lens Discomfort. Report of the subcommittee on neurobiology. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 54(11):TFOS71-97. doi:10.1167/iovs.13-13226
27. Belmonte C, Acosta MC, Gallar J (2004) Neural basis of sensation in intact and injured corneas. *Experimental Eye Research* 78(3):513–525.
doi:10.1016/j.exer.2003.09.023
28. Parra A, Madrid R, Echevarria D, del Olmo S, Morenilla-Palao C, Acosta MC, Gallar J, Dhaka A, Viana F, Belmonte C (2010) Ocular surface wetness is regulated by TRPM8-dependent cold thermoreceptors of the cornea. *Nat Med* 16(12):1396–1399.
doi:10.1038/nm.2264

29. Qi H, Chuang EY, Yoon K-C, Paiva CS de, Shine HD, Jones DB, Pflugfelder SC, Li D-Q (2007) Patterned expression of neurotrophic factors and receptors in human limbal and corneal regions. *Mol Vis* 13:1934–1941
30. Micera A, Lambiase A, Puxeddu I, Aloe L, Stampachiacchiere B, Levi-Schaffer F, Bonini S, Bonini S (2006) Nerve growth factor effect on human primary fibroblastic-keratocytes. Possible mechanism during corneal healing. *Experimental Eye Research* 83(4):747–757. doi:10.1016/j.exer.2006.03.010
31. Lambiase A, Manni L, Bonini S, Rama P, Micera A, Aloe L (2000) Nerve growth factor promotes corneal healing. Structural, biochemical, and molecular analyses of rat and human corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41(5):1063–1069
32. Di G, Qi X, Zhao X, Zhang S, Danielson P, Zhou Q (2017) Corneal Epithelium-Derived Neurotrophic Factors Promote Nerve Regeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 58(11):4695–4702. doi:10.1167/iovs.16-21372
33. Garcia-Hirschfeld J, Lopez-Briones LG, Belmonte C (1994) Neurotrophic influences on corneal epithelial cells. *Experimental Eye Research* 59(5):597–605. doi:10.1006/exer.1994.1145
34. Dua HS, Said DG, Messmer EM, Rolando M, Benitez-Del-Castillo JM, Hossain PN, Shortt AJ, Geerling G, Nubile M, Figueiredo FC, Rauz S, Mastropasqua L, Rama P, Baudouin C (2018) Neurotrophic keratopathy. *Prog Retin Eye Res* 66:107–131. doi:10.1016/j.preteyeres.2018.04.003
35. Subcommittee of the International Dry Eye Workshop (2007) The Definition and Classification of Dry Eye Disease: Report of the Definition and Classification Subcommittee of the International Dry Eye Workshop (2007). *The Ocular Surface* 5(2):75–92. doi:10.1016/S1542-0124(12)70081-2
36. Labetoulle M, Auquier P, Conrad H, Crochard A, Daniloski M, Bouée S, El Hasnaoui A, Colin J (2005) Incidence of herpes simplex virus keratitis in France. *Ophthalmology* 112(5):888–895. doi:10.1016/j.opthta.2004.11.052
37. Dworkin RH, Johnson RW, Breuer J, Gnann JW, Levin MJ, Backonja M, Betts RF, Gershon AA, Haanpää ML, McKendrick MW, Nurmikko TJ, Oaklander AL, Oxman MN, Langston DP, Petersen KL, Rowbotham MC, Schmader KE, Stacey BR, Tying SK, van Wijck AJM, Wallace MS, Wassilew SW, Whitley RJ (2007) Recommendations for the Management of Herpes Zoster. *Clin Infect Dis* 44(Supplement_1):S1-S26. doi:10.1086/510206
38. Sacchetti M, Lambiase A (2014) Diagnosis and management of neurotrophic keratitis. *Clin Ophthalmol* 8:571–579. doi:10.2147/OPHTH.S45921
39. Hamrah P, Cruzat A, Dastjerdi MH, Zheng L, Shahatit BM, Bayhan HA, Dana R, Pavan-Langston D (2010) Corneal sensation and subbasal nerve alterations in

- patients with herpes simplex keratitis. An in vivo confocal microscopy study. *Ophthalmology* 117(10):1930–1936. doi:10.1016/j.ophtha.2010.07.010
40. Hamrah P, Cruzat A, Dastjerdi MH, Prüss H, Zheng L, Shahatit BM, Bayhan HA, Dana R, Pavan-Langston D (2013) Unilateral herpes zoster ophthalmicus results in bilateral corneal nerve alteration. An in vivo confocal microscopy study. *Ophthalmology* 120(1):40–47. doi:10.1016/j.ophtha.2012.07.036
 41. Ambrósio R, JR, Tervo T, Wilson SE (2008) LASIK-associated dry eye and neurotrophic epitheliopathy. Pathophysiology and strategies for prevention and treatment. *J Refract Surg* 24(4):396–407. doi:10.3928/1081597X-20080401-14
 42. Calvillo MP, McLaren JW, Hodge DO, Bourne WM (2004) Corneal reinnervation after LASIK. Prospective 3-year longitudinal study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45(11):3991–3996. doi:10.1167/iovs.04-0561
 43. Baratz KH, Nau CB, Winter EJ, McLaren JW, Hodge DO, Herman DC, Bourne WM (2006) Effects of glaucoma medications on corneal endothelium, keratocytes, and subbasal nerves among participants in the ocular hypertension treatment study. *Cornea* 25(9):1046–1052. doi:10.1097/01.icc.0000230499.07273.c5
 44. Sarkar J, Chaudhary S, Namavari A, Ozturk O, Chang J-H, Yco L, Sonawane S, Khanolkar V, Hallak J, Jain S (2012) Corneal Neurotoxicity Due to Topical Benzalkonium Chloride. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 53(4):1792–1802. doi:10.1167/iovs.11-8775
 45. Zhao H, He Y, Ren Y-R, Chen B-H (2019) Corneal alteration and pathogenesis in diabetes mellitus. *Int J Ophthalmol* 12(12):1939–1950. doi:10.18240/ijo.2019.12.17
 46. Messmer EM, Schmid-Tannwald C, Zapp D, Kampik A (2010) In vivo confocal microscopy of corneal small fiber damage in diabetes mellitus. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 248(9):1307–1312. doi:10.1007/s00417-010-1396-8
 47. Puca A, Meglio M, Vari R, Tamburrini G, Tancredi A (1995) Evaluation of fifth nerve dysfunction in 136 patients with middle and posterior cranial fossae tumors. *Eur Neurol* 35(1):33–37. doi:10.1159/000117086
 48. Rosenberg ML (1984) Congenital trigeminal anaesthesia. A review and classification. *Brain* 107 (Pt 4):1073–1082. doi:10.1093/brain/107.4.1073
 49. Shaheen BS, Bakir M, Jain S (2014) Corneal nerves in health and disease. *Surv Ophthalmol* 59(3):263–285. doi:10.1016/j.survophthal.2013.09.002
 50. Mastropasqua L, Massaro-Giordano G, Nubile M, Sacchetti M (2017) Understanding the Pathogenesis of Neurotrophic Keratitis. The Role of Corneal Nerves. *J Cell Physiol* 232(4):717–724. doi:10.1002/jcp.25623
 51. Mackie IA Neuroparalytic keratitis. 1995. In: FT Fraunfelder, FH Roy, J Grove, *editors* Current ocular therapy, S 452–454

52. Mergler S, Dietrich-Ntoukas T, Pleyer U (2019) Neurotrophe Keratopathie. *Der Ophthalmologe* 116(8):797–810. doi:10.1007/s00347-019-0946-7
53. Alder J, Mertsch S, Menzel-Severing J, Geerling G (2019) Aktuelle und experimentelle Therapieansätze bei neurotropher Keratopathie. *Ophthalmologe* 116(2):127–137. doi:10.1007/s00347-018-0843-5
54. Schrader S, Wedel T, Moll R, Geerling G (2006) Combination of serum eye drops with hydrogel bandage contact lenses in the treatment of persistent epithelial defects. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology* 244(10):1345–1349. doi:10.1007/s00417-006-0257-y
55. Seitz B, Grüterich M, Cursiefen C, Kruse FE (2005) Conservative and surgical treatment of neurotrophic keratopathy. *Ophthalmologe* 102(1):15–26. doi:10.1007/s00347-004-1161-7
56. Tsubota K, Goto E, Shimmura S, Shimazaki J (1999) Treatment of persistent corneal epithelial defect by autologous serum application. *Ophthalmology* 106(10):1984–1989. doi:10.1016/S0161-6420(99)90412-8
57. Versura P, Giannaccare G, Pellegrini M, Sebastiani S, Campos EC (2018) Neurotrophic keratitis. Current challenges and future prospects. *Eye Brain* 10:37–45. doi:10.2147/EB.S117261
58. Bonini S (2000) Topical treatment with nerve growth factor for neurotrophic keratitis. *Ophthalmology* 107(7):1347–1351. doi:10.1016/s0161-6420(00)00163-9
59. Bonini S, Lambiase A, Rama P, Sinigaglia F, Allegretti M, Chao W, Mantelli F (2018) Phase II Randomized, Double-Masked, Vehicle-Controlled Trial of Recombinant Human Nerve Growth Factor for Neurotrophic Keratitis. *Ophthalmology* 125(9):1332–1343. doi:10.1016/j.ophtha.2018.02.022
60. Pflugfelder SC, Massaro-Giordano M, Perez VL, Hamrah P, Deng SX, Espandar L, Foster CS, Affeldt J, Seedor JA, Afshari NA, Chao W, Allegretti M, Mantelli F, Dana R (2020) Topical Recombinant Human Nerve Growth Factor (Cenegermin) for Neurotrophic Keratopathy. A Multicenter Randomized Vehicle-Controlled Pivotal Trial. *Ophthalmology* 127(1):14–26. doi:10.1016/j.ophtha.2019.08.020
61. Merté R-L, Lanzl IM (2007) Botulinum toxin injection for production of ptosis. *Ophthalmologe* 104(9):767–770. doi:10.1007/s00347-007-1611-0
62. Khammari Chebbi C, Kichenin K, Amar N, Nourry H, Warnet JM, Barritault D, Baudouin C (2008) Étude pilote d'un nouvel agent de thérapie matricielle (RGTA OTR4120®) dans les ulcères de cornée et les dystrophies cornéennes rebelles. *Journal Français d'Ophtalmologie* 31(5):465–471. doi:10.1016/s0181-5512(08)72462-8

63. Aifa A, Gueudry J, Portmann A, Delcampe A, Muraine M (2012) Topical treatment with a new matrix therapy agent (RGTA) for the treatment of corneal neurotrophic ulcers. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 53(13):8181–8185. doi:10.1167/iovs.12-10476
64. Guerra M, Marques S, Gil JQ, Campos J, Ramos P, Rosa AM, Quadrado MJ, Murta JN (2017) Neurotrophic Keratopathy. Therapeutic Approach Using a Novel Matrix Regenerating Agent. *J Ocul Pharmacol Ther* 33(9):662–669. doi:10.1089/jop.2017.0010
65. Fawcett JW, Asher RA (1999) The glial scar and central nervous system repair. *Brain Res Bull* 49(6):377–391. doi:10.1016/s0361-9230(99)00072-6
66. Böhm MRR, Mertsch S, König S, Spieker T, Thanos S (2013) Macula-less rat and macula-bearing monkey retinas exhibit common lifelong proteomic changes. *Neurobiol Aging* 34(11):2659–2675. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2013.04.020
67. Madduri S, Papaloizos M, Gander B (2009) Synergistic effect of GDNF and NGF on axonal branching and elongation in vitro. *Neurosci Res* 65(1):88–97. doi:10.1016/j.neures.2009.06.003
68. Gong Q, Zhang S, Jiang L, Lin M, Xu Z, Yu Y, Wang Q, Lu F, Hu L (2021) The effect of nerve growth factor on corneal nerve regeneration and dry eye after LASIK. *Experimental Eye Research* 203:108428. doi:10.1016/j.exer.2020.108428
69. Levi-Montalcini R (1987) The nerve growth factor 35 years later. *Science* 237(4819):1154–1162. doi:10.1126/science.3306916
70. Sacchetti M, Bruscolini A, Lambiase A (2017) Cenegermin for the treatment of neurotrophic keratitis. *Drugs Today* 53(11):585–595. doi:10.1358/dot.2017.53.11.2722395
71. Deeks ED, Lamb YN (2020) Cenegermin. A Review in Neurotrophic Keratitis. *Drugs* 80(5):489–494. doi:10.1007/s40265-020-01289-w
72. Rao PV, Pattabiraman PP, Kopczyński C (2017) Role of the Rho GTPase/Rho kinase signaling pathway in pathogenesis and treatment of glaucoma. Bench to bedside research. *Experimental Eye Research* 158:23–32. doi:10.1016/j.exer.2016.08.023
73. Hall A (1998) Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 279(5350):509–514. doi:10.1126/science.279.5350.509
74. Honjo M, Tanihara H, Inatani M, Kido N, Sawamura T, Yue BY, Narumiya S, Honda Y (2001) Effects of rho-associated protein kinase inhibitor Y-27632 on intraocular pressure and outflow facility. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42(1):137–144
75. Koga T, Koga T, Awai M, Tsutsui J-i, Yue BYJT, Tanihara H (2006) Rho-associated protein kinase inhibitor, Y-27632, induces alterations in adhesion, contraction and motility in cultured human trabecular meshwork cells. *Experimental Eye Research* 82(3):362–370. doi:10.1016/j.exer.2005.07.006

76. Isobe T, Mizuno K, Kaneko Y, Ohta M, Koide T, Tanabe S (2014) Effects of K-115, a rho-kinase inhibitor, on aqueous humor dynamics in rabbits. *Curr Eye Res* 39(8):813–822. doi:10.3109/02713683.2013.874444
77. Okumura N, Fujii K, Kagami T, Makiko N, Kitahara M, Kinoshita S, Koizumi N (2016) Activation of the Rho/Rho Kinase Signaling Pathway Is Involved in Cell Death of Corneal Endothelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 57(15):6843–6851. doi:10.1167/iovs.16-20123
78. Okumura N, Kinoshita S, Koizumi N (2017) The Role of Rho Kinase Inhibitors in Corneal Endothelial Dysfunction. *Curr Pharm Des* 23(4):660–666. doi:10.2174/1381612822666161205110027
79. Macsai MS, Shiloach M (2019) Use of Topical Rho Kinase Inhibitors in the Treatment of Fuchs Dystrophy After Descemet Stripping Only. *Cornea* 38(5)
80. Lehmann M, Fournier A, Selles-Navarro I, Dergham P, Sebok A, Leclerc N, Tigyi G, McKerracher L (1999) Inactivation of Rho signaling pathway promotes CNS axon regeneration. *Journal of Neuroscience* 19(17):7537–7547. doi:10.1523/JNEUROSCI.19-17-07537.1999
81. Wu D, Yang P, Zhang X, Luo J, Haque ME, Yeh J, Richardson PM, Zhang Y, Bo X (2009) Targeting a dominant negative rho kinase to neurons promotes axonal outgrowth and partial functional recovery after rat rubrospinal tract lesion. *Mol Ther* 17(12):2020–2030. doi:10.1038/mt.2009.168
82. Fournier AE, Takizawa BT, Strittmatter SM (2003) Rho Kinase Inhibition Enhances Axonal Regeneration in the Injured CNS. *Journal of Neuroscience* 23(4):1416–1423. doi:10.1523/JNEUROSCI.23-04-01416.2003
83. Bito H, Furuyashiki T, Ishihara H, Shibasaki Y, Ohashi K, Mizuno K, Maekawa M, Ishizaki T, Narumiya S (2000) A Critical Role for a Rho-Associated Kinase, p160ROCK, in Determining Axon Outgrowth in Mammalian CNS Neurons. *Neuron* 26(2):431–441. doi:10.1016/S0896-6273(00)81175-7
84. Joshi AR, Bobylev I, Zhang G, Sheikh KA, Lehmann HC (2015) Inhibition of Rho-kinase differentially affects axon regeneration of peripheral motor and sensory nerves. *Experimental Neurology* 263:28–38. doi:10.1016/j.expneurol.2014.09.012
85. Hiraga A, Kuwabara S, Doya H, Kanai K, Fujitani M, Taniguchi J, Arai K, Mori M, Hattori T, Yamashita T (2006) Rho-kinase inhibition enhances axonal regeneration after peripheral nerve injury. *Journal of the Peripheral Nervous System* 11(3):217–224. doi:10.1111/j.1529-8027.2006.00091.x
86. Hejtmancik JF, Nickerson JM (2015) *Molecular Biology of Eye Disease*. ISSN. Elsevier Science

87. Jurkunas UV, Bitar MS, Funaki T, Azizi B (2010) Evidence of oxidative stress in the pathogenesis of fuchs endothelial corneal dystrophy. *The American Journal of Pathology* 177(5):2278–2289. doi:10.2353/ajpath.2010.100279
88. Choi MH, Lee IK, Kim GW, Kim BU, Han Y-H, Yu D-Y, Park HS, Kim KY, Lee JS, Choi C, Bae YS, Lee BI, Rhee SG, Kang SW (2005) Regulation of PDGF signalling and vascular remodelling by peroxiredoxin II. *Nature* 435(7040):347–353. doi:10.1038/nature03587
89. Yao J, Taylor M, Davey F, Ren Y, Aiton J, Coote P, Fang F, Chen JX, Du Yan S, Gunn-Moore FJ (2007) Interaction of amyloid binding alcohol dehydrogenase/Abeta mediates up-regulation of peroxiredoxin II in the brains of Alzheimer's disease patients and a transgenic Alzheimer's disease mouse model. *Mol Cell Neurosci* 35(2):377–382. doi:10.1016/j.mcn.2007.03.013
90. Voigt D, Scheidt U, Derfuss T, Brück W, Junker A (2017) Expression of the Antioxidative Enzyme Peroxiredoxin 2 in Multiple Sclerosis Lesions in Relation to Inflammation. *Int J Mol Sci* 18(4). doi:10.3390/ijms18040760
91. Liu J, Su G, Gao J, Tian Y, Liu X, Zhang Z (2020) Effects of Peroxiredoxin 2 in Neurological Disorders. A Review of its Molecular Mechanisms. *Neurochemical Research* 45(4):720–730. doi:10.1007/s11064-020-02971-x
92. Valek L, Kanngießner M, Häussler A, Agarwal N, Lillig CH, Tegeder I (2015) Redoxins in peripheral neurons after sciatic nerve injury. *Free Radic Biol Med* 89:581–592. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2015.09.008
93. Portela A, Esteller M (2010) Epigenetic modifications and human disease. *Nat Biotechnol* 28(10):1057–1068. doi:10.1038/nbt.1685
94. Zhou M, Luo J, Zhang H (2018) Role of Sirtuin 1 in the pathogenesis of ocular disease (Review). *Int J Mol Med* 42(1):13–20. doi:10.3892/ijmm.2018.3623
95. Ozawa Y, Kubota S, Narimatsu T, Yuki K, Koto T, Sasaki M, Tsubota K (2010) Retinal aging and sirtuins. *Ophthalmic Res* 44(3):199–203. doi:10.1159/000316484
96. Balaiya S, Abu-Amero KK, Kondkar AA, Chalam KV (2017) Sirtuins Expression and Their Role in Retinal Diseases. *Oxid Med Cell Longev* 2017:3187594. doi:10.1155/2017/3187594
97. Shindler KS, Ventura E, Rex TS, Elliott P, Rostami A (2007) SIRT1 activation confers neuroprotection in experimental optic neuritis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48(8):3602–3609. doi:10.1167/iovs.07-0131
98. Guo W, Qian L, Zhang J, Zhang W, Morrison A, Hayes P, Wilson S, Chen T, Zhao J (2011) Sirt1 overexpression in neurons promotes neurite outgrowth and cell survival through inhibition of the mTOR signaling. *J Neurosci Res* 89(11):1723–1736. doi:10.1002/jnr.22725

99. Hirano T, Ishihara K, Hibi M (2000) Roles of STAT3 in mediating the cell growth, differentiation and survival signals relayed through the IL-6 family of cytokine receptors. *Oncogene* 19(21):2548–2556. doi:10.1038/sj.onc.1203551
100. Leonard WJ, O'Shea JJ (1998) Jaks and STATs. Biological implications. *Annu Rev Immunol* 16:293–322. doi:10.1146/annurev.immunol.16.1.293
101. Qu M, Qi X, Wang Q, Wan L, Li J, Li W, Li Y, Zhou Q (2019) Therapeutic Effects of STAT3 Inhibition on Experimental Murine Dry Eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 60(12):3776–3785. doi:10.1167/iovs.19-26928
102. Zhou Q, Chen P, Di G, Zhang Y, Wang Y, Qi X, Duan H, Xie L (2015) Ciliary neurotrophic factor promotes the activation of corneal epithelial stem/progenitor cells and accelerates corneal epithelial wound healing. *Stem Cells* 33(5):1566–1576. doi:10.1002/stem.1942
103. Hwang J, Namgung U (2020) Cdk5 Phosphorylation of STAT3 in Dorsal Root Ganglion Neurons Is Involved in Promoting Axonal Regeneration After Peripheral Nerve Injury. *Int Neurourol J* 24(Suppl 1):S19-27. doi:10.5213/inj.2040158.080
104. Jin K, Zhu Y, Sun Y, Mao XO, Xie L, Greenberg DA (2002) Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(18):11946–11950. doi:10.1073/pnas.182296499
105. Yan J, Zeng Y, Jiang J, Zhou J, Yin Z, Wang Z, Zhu P (2007) The expression patterns of vascular endothelial growth factor and thrombospondin 2 after corneal alkali burn. *Colloids Surf B Biointerfaces* 60(1):105–109. doi:10.1016/j.colsurfb.2007.06.013
106. Li Z, Burns AR, Han L, Rumbaut RE, Smith CW (2011) IL-17 and VEGF are necessary for efficient corneal nerve regeneration. *The American Journal of Pathology* 178(3):1106–1116. doi:10.1016/j.ajpath.2010.12.001
107. Yu CQ, Zhang M, Matis KI, Kim C, Rosenblatt MI (2008) Vascular endothelial growth factor mediates corneal nerve repair. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49(9):3870–3878. doi:10.1167/iovs.07-1418
108. Kurtz J-E, Ray-Coquard I (2012) PI3 kinase inhibitors in the clinic. An update. *Anticancer Res* 32(7):2463–2470
109. Xu J-T, Tu H-Y, Xin W-J, Liu X-G, Zhang G-H, Zhai C-H (2007) Activation of phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase B/Akt in dorsal root ganglia and spinal cord contributes to the neuropathic pain induced by spinal nerve ligation in rats. *Experimental Neurology* 206(2):269–279. doi:10.1016/j.expneurol.2007.05.029
110. Abid MR, Guo S, Minami T, Spokes KC, Ueki K, Skurk C, Walsh K, Aird WC (2004) Vascular endothelial growth factor activates PI3K/Akt/forkhead signaling in

- endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24(2):294–300.
doi:10.1161/01.ATV.0000110502.10593.06
111. Ishiyama M (1997) A highly water-soluble disulfonated tetrazolium salt as a chromogenic indicator for NADH as well as cell viability. *Talanta* 44(7):1299–1305.
doi:10.1016/S0039-9140(97)00017-9
112. Ngamwongsatit P, Banada PP, Panbangred W, Bhunia AK (2008) WST-1-based cell cytotoxicity assay as a substitute for MTT-based assay for rapid detection of toxigenic *Bacillus* species using CHO cell line. *J Microbiol Methods* 73(3):211–215.
doi:10.1016/j.mimet.2008.03.002
113. SHOLL DA (1953) Dendritic organization in the neurons of the visual and motor cortices of the cat. *J Anat* 87(4):387–406
114. Horton HR, Moran LA, Scrimgeour KG, Perry MD, Rawn JD, Biele C (2008) *Biochemie, 4. Aufl. bio - Biologie*. Pearson Studium, München
115. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* 25(4):402–408.
doi:10.1006/meth.2001.1262
116. Craig JP, Nichols KK, Akpek EK, Caffery B, Dua HS, Joo C-K, Liu Z, Nelson JD, Nichols JJ, Tsubota K, Stapleton F (2017) TFOS DEWS II Definition and Classification Report. *The Ocular Surface* 15(3):276–283. doi:10.1016/j.jtos.2017.05.008
117. Bonini S, Rama P, Olzi D, Lambiase A (2003) Neurotrophic keratitis. *Eye* 17(8):989–995. doi:10.1038/sj.eye.6700616
118. Semeraro F, Forbice E, Romano V, Angi M, Romano MR, Filippelli ME, Di Iorio R, Costagliola C (2014) Neurotrophic Keratitis. *Ophthalmologica* 231(4):191–197.
doi:10.1159/000354380
119. Meng ID, Kurose M (2013) The role of corneal afferent neurons in regulating tears under normal and dry eye conditions. *Experimental Eye Research* 117:79–87.
doi:10.1016/j.exer.2013.08.011
120. Labetoulle M, Baudouin C, Calonge M, Merayo-Llodes J, Boboridis KG, Akova YA, Aragona P, Geerling G, Messmer EM, Benítez-Del-Castillo J (2019) Role of corneal nerves in ocular surface homeostasis and disease. *Acta Ophthalmol* 97(2):137–145.
doi:10.1111/aos.13844
121. Asghar O, Petropoulos IN, Alam U, Jones W, Jeziorska M, Marshall A, Ponirakis G, Fadavi H, Boulton AJM, Tavakoli M, Malik RA (2014) Corneal confocal microscopy detects neuropathy in subjects with impaired glucose tolerance. *Diabetes Care* 37(9):2643–2646. doi:10.2337/dc14-0279
122. Malik RA, Kallinikos P, Abbott CA, van Schie CHM, Morgan P, Efron N, Boulton AJM (2003) Corneal confocal microscopy. A non-invasive surrogate of nerve fibre

- damage and repair in diabetic patients. *Diabetologia* 46(5):683–688.
doi:10.1007/s00125-003-1086-8
123. Petropoulos IN, Alam U, Fadavi H, Marshall A, Asghar O, Dabbah MA, Chen X, Graham J, Ponirakis G, Boulton AJM, Tavakoli M, Malik RA (2014) Rapid automated diagnosis of diabetic peripheral neuropathy with in vivo corneal confocal microscopy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 55(4):2071–2078. doi:10.1167/iovs.13-13787
 124. Stettner M, Hinrichs L, Guthoff R, Bairov S, Petropoulos IN, Warnke C, Hartung H-P, Malik RA, Kieseier BC (2016) Corneal confocal microscopy in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Ann Clin Transl Neurol* 3(2):88–100.
doi:10.1002/acn3.275
 125. Ferdousi M, Azmi S, Petropoulos IN, Fadavi H, Ponirakis G, Marshall A, Tavakoli M, Malik I, Mansoor W, Malik RA (2015) Corneal Confocal Microscopy Detects Small Fibre Neuropathy in Patients with Upper Gastrointestinal Cancer and Nerve Regeneration in Chemotherapy Induced Peripheral Neuropathy. *PLoS ONE* 10(10):e0139394. doi:10.1371/journal.pone.0139394
 126. Malin SA, Davis BM, Molliver DC (2007) Production of dissociated sensory neuron cultures and considerations for their use in studying neuronal function and plasticity. *Nature Protocols* 2(1):152–160. doi:10.1038/nprot.2006.461
 127. Melli G, Höke A (2009) Dorsal Root Ganglia Sensory Neuronal Cultures. A tool for drug discovery for peripheral neuropathies. *Expert Opin Drug Discov* 4(10):1035–1045. doi:10.1517/17460440903266829
 128. Scott BS (1977) Adult mouse dorsal root ganglia neurons in cell culture. *J Neurobiol* 8(5):417–427. doi:10.1002/neu.480080503
 129. Wang S, Ghezzi CE, White JD, Kaplan DL (2015) Coculture of dorsal root ganglion neurons and differentiated human corneal stromal stem cells on silk-based scaffolds. *J Biomed Mater Res A* 103(10):3339–3348. doi:10.1002/jbm.a.35465
 130. Heinrich T, Hübner C, Kurth I (2016) Isolation and Primary Cell Culture of Mouse Dorsal Root Ganglion Neurons. *BIO-PROTOCOL* 6(7). doi:10.21769/BioProtoc.1785
 131. Fornaro M, Sharthiya H, Tiwari V (2018) Adult Mouse DRG Explant and Dissociated Cell Models to Investigate Neuroplasticity and Responses to Environmental Insults Including Viral Infection. *J Vis Exp* (133). doi:10.3791/56757
 132. Al-Ali H, Beckerman SR, Bixby JL, Lemmon VP (2017) In vitro models of axon regeneration. *Experimental Neurology* 287(Pt 3):423–434.
doi:10.1016/j.expneurol.2016.01.020
 133. Klimovich P, Rubina K, Sysoeva V, Semina E (2020) Three-Dimensional Model of Dorsal Root Ganglion Explant as a Method of Studying Neurotrophic Factors in Regenerative Medicine. *Biomedicines* 8(3). doi:10.3390/biomedicines8030049

134. Wilson SE, Ambrósio R (2001) Laser in situ keratomileusis-induced neurotrophic epitheliopathy. *American Journal of Ophthalmology* 132(3):405–406.
doi:10.1016/s0002-9394(01)00995-3
135. Araki K, Ohashi Y, Kinoshita S, Hayashi K, Kuwayama Y, Tano Y (1994) Epithelial wound healing in the denervated cornea. *Curr Eye Res* 13(3):203–211.
doi:10.3109/02713689408995778
136. Baker KS, Anderson SC, Romanowski EG, Thoft RA, SundarRaj N (1993) Trigeminal ganglion neurons affect corneal epithelial phenotype. Influence on type VII collagen expression in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34(1):137–144
137. Kubilus JK, Linsenmayer TF (2010) Developmental Corneal Innervation. Interactions between Nerves and Specialized Apical Corneal Epithelial Cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51(2):782–789. doi:10.1167/iovs.09-3942
138. Chan KY, Jones RR, Bark DH, Swift J, Parker JA, JR, Haschke RH (1987) Release of neuronotrophic factor from rabbit corneal epithelium during wound healing and nerve regeneration. *Experimental Eye Research* 45(5):633–646.
doi:10.1016/s0014-4835(87)80112-4
139. Ong ES, Jeng BH (2021) Current and future therapies for persistent corneal epithelial defects and neurotrophic keratopathy. *Curr Opin Ophthalmol*.
doi:10.1097/ICU.0000000000000749
140. Boyd JG, Gordon T (2003) Neurotrophic factors and their receptors in axonal regeneration and functional recovery after peripheral nerve injury. *Mol Neurobiol* 27(3):277–324. doi:10.1385/MN:27:3:277
141. Lambiase A, Aloe L, Centofanti M, Parisi V, Báo SN, Mantelli F, Colafrancesco V, Manni GL, Bucci MG, Bonini S, Levi-Montalcini R (2009) Experimental and clinical evidence of neuroprotection by nerve growth factor eye drops. Implications for glaucoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(32):13469–13474.
doi:10.1073/pnas.0906678106
142. Seiler M, Schwab ME (1984) Specific retrograde transport of nerve growth factor (NGF) from neocortex to nucleus basalis in the rat. *Brain Res* 300(1):33–39.
doi:10.1016/0006-8993(84)91338-6
143. Korsching S, Auburger G, Heumann R, Scott J, Thoenen H (1985) Levels of nerve growth factor and its mRNA in the central nervous system of the rat correlate with cholinergic innervation. *EMBO J* 4(6):1389–1393
144. Cuello AC, Bruno MA, Allard S, Leon W, Iulita MF (2010) Cholinergic Involvement in Alzheimer's Disease. A Link with NGF Maturation and Degradation. *Journal of Molecular Neuroscience* 40(1):230–235. doi:10.1007/s12031-009-9238-z

145. Chiaretti A, Piastra M, Polidori G, Di Rocco C, Caresta E, Antonelli A, Amendola T, Aloe L (2003) Correlation between neurotrophic factor expression and outcome of children with severe traumatic brain injury. *Intensive Care Med* 29(8):1329–1338. doi:10.1007/s00134-003-1852-6
146. Song Y-W, Chen J-Y, Li X, Wang L, Pan Z-Q (2021) Therapeutic potential of Rho-associated kinase inhibitor Y27632 in corneal endothelial dysfunction. An in vitro and in vivo study. *Int J Ophthalmol* 14(1):19–25. doi:10.18240/ijo.2021.01.03
147. Schlötzer-Schrehardt U, Zenkel M, Strunz M, Gießl A, Schondorf H, da Silva H, Schmidt GA, Greiner MA, Okumura N, Koizumi N, Kinoshita S, Tourtas T, Kruse FE (2020) Potential Functional Restoration of Corneal Endothelial Cells in Fuchs Endothelial Corneal Dystrophy by ROCK Inhibitor (Ripasudil). *American Journal of Ophthalmology* 224:185–199. doi:10.1016/j.ajo.2020.12.006
148. Sun C-C, Chiu H-T, Lin Y-F, Lee K-Y, Pang J-HS (2015) Y-27632, a ROCK Inhibitor, Promoted Limbal Epithelial Cell Proliferation and Corneal Wound Healing. *PLoS ONE* 10(12):e0144571. doi:10.1371/journal.pone.0144571
149. Messmer EM (2020) Wundheilung nach Amnionmembran-, Limbus- und Hornhauttransplantation. *Der Ophthalmologe* 117(12):1163–1170. doi:10.1007/s00347-020-01211-5
150. Pak JH, Choi H-j, Choi CY, Tchah H (2006) Expression of 1-cys peroxiredoxin in the corneal wound-healing process. *Cornea* 25(10 Suppl 1):S29-35. doi:10.1097/01.ico.0000247210.01262.98
151. Wahlig S, Lovatt M, Mehta JS (2018) Functional role of peroxiredoxin 6 in the eye. *Free Radic Biol Med* 126:210–220. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2018.08.017
152. CHANDRASEKARAN K, SALIMIAN M, Konduru SR, Choi J, Kumar P, Long A, Klimova N, HO C-Y, Kristian T, RUSSELL JW (2019) Overexpression of Sirtuin 1 protein in neurons prevents and reverses experimental diabetic neuropathy. *Brain* 142(12):3737–3752. doi:10.1093/brain/awz324
153. Schartner E, Sabbir MG, Saleh A, Silva RV, Roy Chowdhury S, Smith DR, Fernyhough P (2018) High glucose concentration suppresses a SIRT2 regulated pathway that enhances neurite outgrowth in cultured adult sensory neurons. *Experimental Neurology* 309:134–147. doi:10.1016/j.expneurol.2018.08.001
154. Bareyre FM, Garzorz N, Lang C, Misgeld T, Büning H, Kerschensteiner M (2011) In vivo imaging reveals a phase-specific role of STAT3 during central and peripheral nervous system axon regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(15):6282–6287. doi:10.1073/pnas.1015239108
155. Rosenstein JM, Mani N, Khaibullina A, Krum JM (2003) Neurotrophic effects of vascular endothelial growth factor on organotypic cortical explants and primary

- cortical neurons. *Journal of Neuroscience* 23(35):11036–11044.
doi:10.1523/JNEUROSCI.23-35-11036.2003
156. Sondell M, Sundler F, Kanje M (2000) Vascular endothelial growth factor is a neurotrophic factor which stimulates axonal outgrowth through the flk-1 receptor. *Eur J Neurosci* 12(12):4243–4254. doi:10.1046/j.0953-816x.2000.01326.x
157. Kim T-i, Chung JL, Hong JP, Min K, Seo KY, Kim EK (2009) Bevacizumab Application Delays Epithelial Healing in Rabbit Cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50(10):4653–4659. doi:10.1167/iovs.08-2805
158. Kim EC, Lee WS, Kim MS (2010) The Inhibitory Effects of Bevacizumab Eye Drops on NGF Expression and Corneal Wound Healing in Rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51(9):4569–4573. doi:10.1167/iovs.09-4937
159. Bock F, Onderka J, Rummelt C, Dietrich T, Bachmann B, Kruse FE, Schlötzer-Schrehardt U, Cursiefen C (2009) Safety Profile of Topical VEGF Neutralization at the Cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50(5):2095–2102. doi:10.1167/iovs.07-1129
160. Guaiquil VH, Pan Z, Karagianni N, Fukuoka S, Alegre G, Rosenblatt MI (2014) VEGF-B selectively regenerates injured peripheral neurons and restores sensory and trophic functions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111(48):17272–17277.
doi:10.1073/pnas.1407227111
161. Sánchez-Alegría K, Flores-León M, Avila-Muñoz E, Rodríguez-Corona N, Arias C (2018) PI3K Signaling in Neurons. A Central Node for the Control of Multiple Functions. *Int J Mol Sci* 19(12). doi:10.3390/ijms19123725
162. Kimpinski K, Mearow K (2001) Neurite growth promotion by nerve growth factor and insulin-like growth factor-1 in cultured adult sensory neurons. Role of phosphoinositide 3-kinase and mitogen activated protein kinase. *J Neurosci Res* 63(6):486–499. doi:10.1002/jnr.1043
163. Burroughs SL, Duncan RS, Rayudu P, Kandula P, Payne AJ, Clark JL, Koulen P, Kaja S (2012) Plate reader-based assays for measuring cell viability, neuroprotection and calcium in primary neuronal cultures. *J Neurosci Methods* 203(1):141–145.
doi:10.1016/j.jneumeth.2011.09.007
164. Piccinini F, Tesei A, Arienti C, Bevilacqua A (2017) Cell Counting and Viability Assessment of 2D and 3D Cell Cultures. Expected Reliability of the Trypan Blue Assay. *Biol Proced Online* 19:8. doi:10.1186/s12575-017-0056-3
165. Langhammer CG, Previtiera ML, Sweet ES, Sran SS, Chen M, Firestein BL (2010) Automated Sholl analysis of digitized neuronal morphology at multiple scales. Whole cell Sholl analysis versus Sholl analysis of arbor subregions. *Cytometry A* 77(12):1160–1168. doi:10.1002/cyto.a.20954

166. Ishizaki T, Uehata M, Tamechika I, Keel J, Nonomura K, Maekawa M, Narumiya S (2000) Pharmacological properties of Y-27632, a specific inhibitor of rho-associated kinases. *Mol Pharmacol* 57(5):976–983
167. Haberberger RV, Barry C, Matusica D (2020) Immortalized Dorsal Root Ganglion Neuron Cell Lines. *Front Cell Neurosci* 14:184. doi:10.3389/fncel.2020.00184

5 ANHANG

5.1 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1: Anatomische Darstellung des Verlaufs des N. trigeminus	4
Abb. 2: Pathogenese der NK	8
Abb. 3: schematische Darstellung des Versuchsaufbaus	23
Abb. 4: Präparation der DRG	25
Abb. 5: Nicht-dissoziiertes DRG auf Chamber Slide 4 Tage nach Aussaat	28
Abb. 6: Auswertung des Single Neuron Assays mittels <i>ImageJ</i>	32
Abb. 7: Vergleich der Neurone auf Wachstumsuntergründen.....	38
Abb. 8: Nervenfasernwachstum eines nicht-dissoziierten DRG nach vier Tagen	39
Abb. 9: GNFL unbehandelter Neurone nach 24 h und 48 h pro cm ²	40
Abb. 10: Auswertung WST-1 Assay, ROCK Inhibitor	41
Abb. 11: Auswertung WST-1 Assay, STAT3 Inhibitor.....	42
Abb. 12: Trypanblaufärbung, 0 h, 24 h, 48 h	43
Abb. 13: Vitalität der Neurone nach 24 h und 48 h, NGF	44
Abb. 14: Vitalität der Neurone nach 24 h und 48 h, ROCK Inhibitor	45
Abb. 15: Vitalität der Neurone nach 24 h und 48 h, PRX2.....	46
Abb. 16: Vitalität der Neurone nach 24 h und 48 h, Conoidin A.....	47
Abb. 17: Vitalität der Neurone nach 24 h und 48 h, SIRT1 Aktivator	48
Abb. 18: Vitalität der Neurone nach 24 h und 48 h, SIRT1 Inhibitor	49
Abb. 19: Vitalität der Neurone nach 24 h und 48 h, STAT3 Inhibitor	50
Abb. 20: Vitalität der Neurone nach 24 h und 48 h, VEGF-A.....	51
Abb. 21: Vitalität der Neurone nach 24 h und 48 h, PI3K Inhibitor.....	52
Abb. 22: GNFL im Scratch Assay 24 h und 48 h nach NGF Zugabe	54
Abb. 23: β -III Tubulin Färbung, Scratch Assay, ROCK Inhibitor und GNFL im Scratch Assay 24 h und 48 h nach ROCK Inhibitor Zugabe	55

Abb. 24: GNFL im Scratch Assay 24 h und 48 h nach PRX2 Zugabe	56
Abb. 25: GNFL im Scratch Assay 24 h und 48 h nach Conoidin A Zugabe	57
Abb. 26: GNFL im Scratch Assay 24 h und 48 h nach SIRT Aktivator Zugabe.....	58
Abb. 27: GNFL im Scratch Assay 24 h und 48 h nach SIRT Inhibitor Zugabe	60
Abb. 28: GNFL im Scratch Assay 24 h und 48 h nach STAT3 Inhibitor Zugabe	61
Abb. 29: GNFL im Scratch Assay 24 h und 48 h nach VEGF-A Zugabe	62
Abb. 30: Scratch Assay 24 h und 48 h nach PI3K Inhibitor Zugabe	63
Abb. 31: Nervenfaserverzweigung Single Neuron Assay, 48 h, NGF	66
Abb. 32: Nervenfaserverzweigung Single Neuron Assay, 48 h, ROCK Inhibitor.....	67
Abb. 33: Nervenfaserverzweigung Single Neuron Assay, 48 h, PRX2	68
Abb. 34: Nervenfaserverzweigung Single Neuron Assay, 48 h, Conoidin A	69
Abb. 35: Nervenfaserverzweigung Single Neuron Assay, 48 h, SIRT1 Aktivator.....	70
Abb. 36: Nervenfaserverzweigung Single Neuron Assay, 48 h, SIRT1 Inhibitor.....	72
Abb. 37: Nervenfaserverzweigung Single Neuron Assay, 48 h, STAT3 Inhibitor	73
Abb. 38: Nervenfaserverzweigung Single Neuron Assay, 48 h, VEGF-A	74
Abb. 39: Nervenfaserverzweigung Single Neuron Assay, 48 h, PI3K Inhibitor	75
Abb. 40: qrt-PCR, ROCK 2 mRNA-Expression, Scratch Assay und ROCK Inhibition.....	78

5.2 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: modifizierte Klassifikation nach klinischen Aspekten	9
Tabelle 2: Auflistung aller genutzten Substanzen und Konzentrationen	17
Tabelle 3: Liste der verwendeten Chemikalien und Lösungen	18
Tabelle 4: List der verwendeten Antikörper	19
Tabelle 5: Liste der Nährmedien unter Angabe der hinzugefügten Zusätze	19
Tabelle 6: List der verwendeten Verbrauchsmaterialien und Kits	20
Tabelle 7: Liste der Kits mit Angaben der Bestandteile	20
Tabelle 8: Liste der verwendeten Geräte	21
Tabelle 9: Liste der verwendeten Programme	22
Tabelle 10: Liste der verwendeten Primer inklusive Sequenzen.....	22
Tabelle 11: Angabe der Bestandteile des Mastermix.....	35

6 DANKSAGUNG

Ich danke sehr herzlich Prof. Dr. Dr. Stefan Schrader für die Überlassung des Themas. Es hat mein Interesse für die Augenheilkunde geweckt und mich dazu motiviert selbst Augenärztin zu werden. Ich danke Ihnen auch für die konstruktive Kritik und die kompetenten Anregungen, die mich stets vorangebracht haben.

Mein besonderer Dank gilt Dr. rer. nat. Sonja Mertsch, die mich während der Laborarbeit und darüber hinaus unterstützt hat und mir stets beratend zur Seite gestanden hat. Deine ehrliche Kritik hat nicht nur dieses Projekt maßgeblich vorangebracht, sondern auch mich als Menschen.

Des Weiteren danke ich Dr. rer. nat. Joana Witt und Dr. rer. nat. Jana Dietrich, die mich sehr herzlich aufgenommen haben und mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite standen. Ohne euch wäre die Laborarbeit nicht möglich gewesen.

Ich möchte mich auch bei Till für die liebevolle Unterstützung während dieser Arbeit, sowie die grafische Inspiration bedanken.

Zum Schluss gilt mein außerordentlicher Dank meinen Eltern und meinen Schwestern Viola und Beatrice. Euer Vertrauen, euer bedingungsloser Beistand und liebevolle Aufmunterung haben mich durch schwierige Zeiten getragen. Ich danke euch.