

Aus dem Physiologischen Institut der Universität München,
Abteilung für Physiologische Genomik

Vorstand: Prof. Dr. Magdalena Götz

**Altersbedingte Veränderung der proliferativen Aktivität
kortikaler reaktiver Astrozyten**

Dissertation

Zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Gábor Heimann

aus

Budapest, Ungarn

2021

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. Swetlana Sirko
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. Nikolaus Plesnila PD Dr. Rupert Egensperger Prof. Dr. Jovica Ninkovic
Dekan:	Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel
Tag der mündlichen Prüfung:	29.04.2021

Eidesstattliche Versicherung

Ich, Gábor Heimann, geb. 29.12.1990 in Budapest, Ungarn, erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema „*Altersbedingte Veränderung der proliferativen Aktivität kortikaler reaktiver Astrozyten*“ selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe. Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Gábor Heimann

München, den 16.08.2021

Inhalt

1. Einleitung.....	5
1.1. Traumatische und ischämische Gehirnverletzungen sind eine große therapeutische Herausforderung	5
1.2. Der zelluläre Aufbau des zentralen Nervensystems.....	6
1.3. Astrozyten sind eine heterogene Zellpopulation	7
1.4. Neurale Stammzellen als spezialisierte astrogliale Zellpopulation.....	10
1.5. Altersbedingte Veränderungen in Morphologie und Funktionalität astroglialer Zellen	12
1.6. Murine und humane Astrozyten unterscheiden sich in deren Eigenschaften.....	13
1.7. Reaktionen des Organismus auf Gewebsverletzungen	14
1.8. Die Rolle von Astrozyten bei Verletzungen des ZNS.....	14
1.9. Der Sonic Hedgehog Signalweg und seine Rolle im ZNS.....	16
2. Zentrale Fragestellungen dieser Arbeit	19
3. Materialien	20
3.1. Geräte.....	20
3.2. Einwegartikel	22
3.3. Puffer und Lösungen.....	23
3.3.1 DNA-Extraktion und Genotypisieren	23
3.3.2 Immunohistochemie.....	24
3.3.3. Tierbehandlung.....	25
3.3.4. Zellkultur.....	25
3.3.5. Antikörper.....	26
4. Methoden.....	27
4.1. Experimentelle Tiere	27
4.2. Extraktion von DNA	27
4.3. Genotypisierung/Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	28
4.4. Unilaterale Stichwundenverletzung	28
4.5. Gewebeentnahme und Herstellung der Einzelzellsuspension	29
4.6. Gewebeentnahme und immunohistochemische Analyse (IHC).....	30
4.7. Fluorescence-activated cell sorting (FACS).....	31
4.8. Neurosphärenassay.....	31
4.9. Immunopanning	31
4.10. Adhärenente Zellkulturen.....	32
4.11. Time-Lapse Videomikroskopie und deren Auswertung.....	32

4.12. Immunocytochemie (ICC)	34
5. Ergebnisse	35
5.1. Altersbedingte physiologische Veränderungen von Astrozyten des somatosensorischen Kortex	35
5.3. Die Aktivierung des Sonic Hedgehog Signalweges bewirkt keine Steigerung der Proliferation von reaktiven Astrozyten in alten Mäusen.....	41
5.4. Etablierung primärer adhärenter Zellkulturbedingungen für die Langzeit-Beobachtung adulter kortikaler Zellen <i>in vitro</i>	43
5.5. Die altersbedingten Veränderungen im Zellteilungsmodus von proliferativen reaktiven Astrozyten	44
5.6. Veränderung der Proliferationsaktivität und des Zellteilungsprogramms in reaktiven Astrozyten durch <i>in vitro</i> Aktivierung des SHH-Signalweges.....	47
6. Diskussion	49
6.1. Aktivierung astroglialer Zellen in der somatosensorischen Hirnrinde mit steigendem Alter	49
6.2. Adhärente 2D-Zellkultur als zuverlässige Methode für <i>in vitro</i> Analyse von reaktiven Astrozyten aus dem adulten post-traumatischen zerebralen Kortex.....	51
6.3. Reaktive parenchymale Astrozyten weisen dem neuraler Stammzellen ähnliches Zellteilungsverhalten auf.....	52
6.4. Herabgesetzte proliferative Kapazität von reaktiven Astrozyten in der alternden post-traumatischen Großhirnrinde.....	53
6.5. Post-traumatische Folgeschäden durch verminderte astrogliale Proliferation in der periläsionalen Zone	54
6.6. Reaktive Astrozyten als lokale Quelle für Neuroregeneration	55
7. Zusammenfassung.....	57
8. Limitierungen der vorliegenden Arbeit	59
9. Ausblick.....	61
10. Publikationen.....	62
11. Danksagung	63
12. Referenzen	64
13. Tabellen- und Abbildungsverzeichnis	73

1. Einleitung

1.1. Traumatische und ischämische Gehirnverletzungen sind eine große therapeutische Herausforderung

Traumatische Verletzungen des Gehirns gehören zu den weltweit führenden Ursachen für Tod und schwere Behinderung des Menschen mit zunehmender Inzidenz in den letzten Jahren [1, 2]. Ischämische und hämorrhagische Schlaganfälle führen vor allem im hohen Alter zu einer eingeschränkten Lebensqualität aufgrund von neurologischer Behinderung und sind eine der häufigsten Todesursachen [3, 4]. Als histopathologisches Korrelat für solche Verletzungen des zentralen Nervensystems (ZNS) kommt es neben diffusem axonalen Schaden und einer passageren Schwellung des geschädigten Gewebes [5] im weiteren Verlauf zu einem massenhaften Zelluntergang sowohl von Neuronen als auch Gliazellen, zu einer extensiven Entzündungsreaktion (Neuroinflammation) [6] sowie schließlich zur Vernarbung des betroffenen Gewebes und seiner Umgebung (periläsionale Zone). Die lokale Astrozytenpopulation nimmt an diesen Prozessen maßgebend teil [6] und unterstützt zudem die Reorganisation und Neuroplastizität des umliegenden Gewebes, damit der Funktionsverlust zumindest teilweise kompensiert werden kann [7, 8]. Pharmakologische Behandlungsversuche, um die Neuroprotektion - des Verhinderns von neuralem Zellschaden und Zelluntergang – zu unterstützen, haben in den letzten Jahrzehnten keinen durchschlagenden Effekt erbracht [9-15]. Neuere zellbasierte therapeutische Ansätze, wie z.B. Stammzelltransplantation oder aber eine Induktion endogener Zellplastizitätsprogramme zum Ersatz von abgestorbenen Zellen befinden sich zwar aktuell noch in frühen Stadien, sind aber vielversprechend [11, 15, 16].

Die Tatsache, dass die reaktiven Astrozyten lokal im geschädigten Gewebe an der Zellerneuerung mitwirken, macht diese Zellpopulation zu einer denkbaren lokalen Stammzellquelle für einen Zellersatz nach Hirnverletzungen. Der damit theoretisch mögliche therapeutische Nutzen von Astrozyten erfordert allerdings ein besseres Verständnis ihrer Reaktion auf Verletzungen, ihres Proliferationsverhaltens und dessen Veränderungen mit zunehmendem Alter.

1.2. Der zelluläre Aufbau des zentralen Nervensystems

Das ZNS der Säugetiere setzt sich im Wesentlichen aus zwei Arten von Zellen zusammen: den Neuronen und den glialen Zellen, die bereits vor 150 Jahren von Rudolf Virchow als „Zwischen-Nervensubstanz“ oder „Kitt“ bezeichnet wurden [17].

Neuronen sind die Hauptfunktionsträger des ZNS, machen aber nur den kleineren Anteil aller Zellen im zentralnervösen Parenchym aus. Sie sind für die Informationsprozessierung und -weiterleitung verantwortlich, welche mittels elektrischer (Aktionspotenziale) und chemischer Signalübertragung erfolgt. Neuronen bestehen aus einem Zellkörper und zwei Arten von Ausläufern – den Dendriten, über die sie Signale empfangen können, und einem Axon, welches auch als Nervenfasern bezeichnet wird und der Signalweitergabe dient. Neurone kommunizieren über sogenannte Synapsen miteinander und bilden neurale Netzwerke, die für die Informationsverarbeitung von essenzieller Bedeutung sind. Sie dienen aber auch der Weitergabe von Informationen an eine Vielzahl von anderen Zellen, wie zum Beispiel Muskelzellen und sekretorischen Zellen [18].

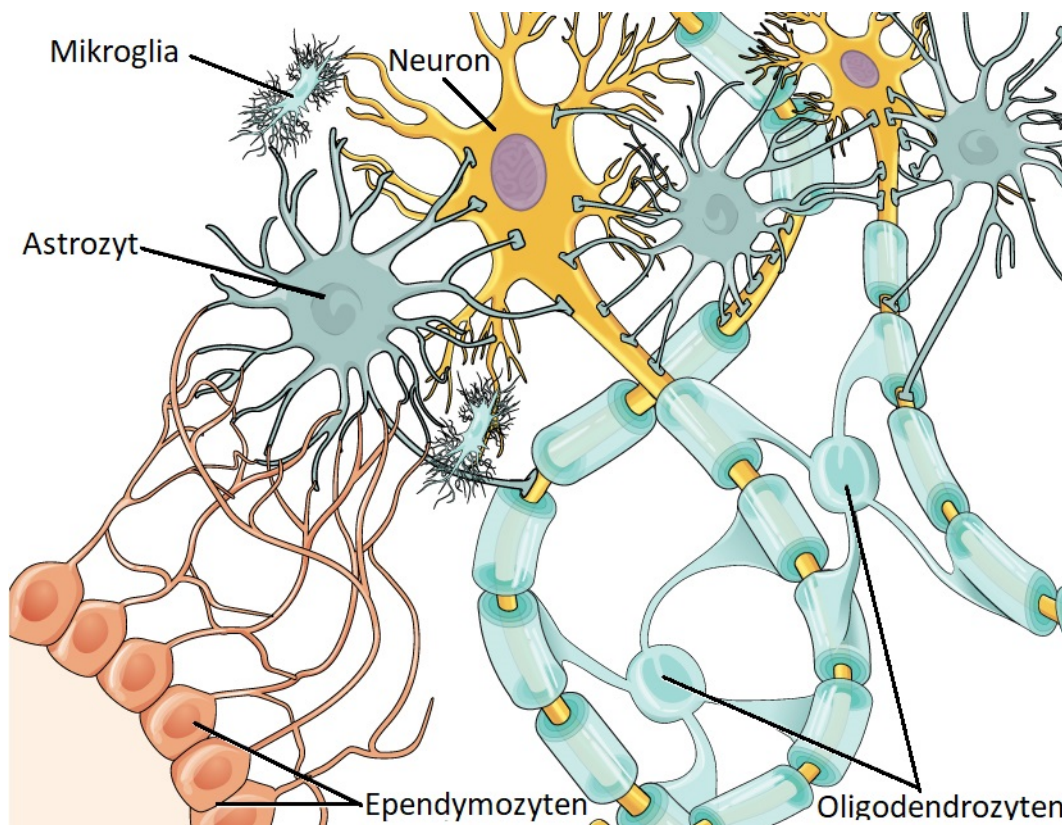


Abb. 1. Schematische Darstellung der Zellen des zentralen Nervensystems. Modifiziert nach [19].

Die glialen Zellen machen den größten Teil der Zelltypen im ZNS aus und werden in Mikro- und Makroglia unterteilt [20]. Mikroglia sind ein wichtiger Bestandteil des lokalen zellulären Immunsystems und sind unter anderem für die Antigenpräsentation verantwortlich [21, 22]. In ruhendem Zustand besitzen sie hochgradig verzweigte Ausläufer, worüber jede Mikroglia-Zelle die Umgebung in einer eigenen Domäne überwacht. Schon bereits während der embryonalen Entwicklung dienen sie der Phagozytose von apoptotischen Neuronen, spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation pränataler Neurogenese, des Axon-Wachstums, der Angiogenese und der Synapsenreifung [23]. Bei der adulten Neurogenese erfüllen sie ähnliche Funktionen [24, 25]. Nach Verletzungen jeglicher Art dienen Mikroglia als die lokalen Phagozyten und Koordinatoren weiterer Immunreaktionen.

Zu den Makroglia gehören Astrozyten, Oligodendrozyten sowie die erst kürzlich beschriebenen NG2 (Neuron-Glia Antigen 2)-positiven Glia (Oligodendrozytenvorläufer, die auch als Polydendrozyten bekannt sind) und Ependymglia [26-28]. Die Zellfortsätze der Oligodendrozyten ummanteln die Axone und bilden die Myelinscheide, die der Isolierung der Axone dient und damit zu einer schnelleren und effizienteren Reizweiterleitung führt. Die NG2-Glia machen etwa 10% der Zellen im ZNS aus, sind gleichmäßig verteilt und fungieren als Vorläuferzellen für Oligodendrozyten (oligodendrocyte precursor cells, OPCs). NG2+ Gliazellen sind bisher am wenigsten erforscht. Da sie synaptische Kontakte mit Neuronen formen, ist jedoch eine funktionelle Beteiligung dieser Zellen am Informationsaustausch innerhalb neuronaler Netze nicht auszuschließen [26, 29]. Ependymglia stammen von radialen Glia ab, kleiden die Liquorräume aus, produzieren Liquor und bilden die Blut-Liquor-Schranke [30]. Astrozyten stellen eine stark heterogene Population glialer Zellen dar und haben vielfältige, Hirnregion-spezifische Funktionen, die in deren Gesamtheit eine neuronale Informationsverarbeitung im ZNS ermöglichen.

1.3. Astrozyten sind eine heterogene Zellpopulation

Astrozyten sind eine äußerst heterogene Zellpopulation, die je nach Lokalisation in weitere Subpopulationen unterteilt werden kann: protoplasmische Astrozyten, fibröse Astrozyten, Radialglia (dazu gehören in höheren Vertebraten die Müller-Glia in der Retina, die semi-radialen Bergmann-Glia im Cerebellum sowie embryonale und postnatale neurale Stammzellen), velate Astrozyten, interlaminäre Astrozyten in höheren Primaten, Tanyzyten in

periventriculären Organen, Pituizyten in der Neurohypophyse, und perivaskuläre Astrozyten an der Pia mater und Glia limitans [31-33]. Ein spezifisches Merkmal astroglialer Zellen ist die Expression des Intermediärfilaments GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein) und weiteren Markerproteinen, die in Tabelle 1 aufgeführt sind.

Marker	Astroglia	Reaktive AG	Müller Glia	Bergmann Glia	Ependymoglia
GFAP	++	+++	-	++	++
S-100β	++	++	++	++	n.a.
Aldh1L1	+	+	n.a.	n.a.	n.a.
Vimentin	-	++	++	+	++
Nestin	-	++	n.a.	++	n.a.
Glutaminsynthetase	++	++	++	++	n.a.
iNOS	+	+++	+	n.a.	n.a.
Zytokeratin	++	++	n.a.	n.a.	+++

Tabelle 1. Etablierte astrogliale Marker-Proteine und deren Vorkommen in einer Auswahl von astroglialen Zellpopulationen. Modifiziert nach [13]. AG = Astroglia.

Da Astrozyten mit ihren Fortsätzen Nervenzellen in verschiedenen Regionen des ZNS bis auf die synaptischen Kontaktstellen nahezu vollständig bedecken, haben sie Kontakt mit verschiedenen Neuronen-Subtypen und können zudem je nach Region in weitere Subpopulationen unterteilt werden [34, 35]. Über die funktionelle, Region-spezifische Heterogenität der Astrozyten auf zellulärer Ebene ist noch nicht viel bekannt, sodass ich mich hier auf die Funktionen der am längsten bekannten protoplasmischen und fibrösen Astrozyten beschränke.

Protoplasmische Astrozyten befinden sich in der grauen Substanz und besitzen mehrere Ausläufer, die sich in Tausende weitere Äste verzweigen und der Zelle eine "buschartige" Erscheinung verleihen [34, 36]. Die Ausläufer stehen in Kontakt mit Neuron-Neuron-Synapsen und bilden somit die sog. ‚tripartiten Synapsen‘, worüber sie auch die neuronale Aktivität modulieren können [37]. Die perivaskulären Endfüße umhüllen Blutgefäße und sind somit das zentrale Element der neurovaskulären Einheit, wo sie den Blutfluss an die lokale Aktivität der Neuronen angleichen und an der Ausbildung der Blut-Hirn-Schranke (BHS) teilnehmen [28, 38-40]. Einzelne Ausläufer stehen mit der Pia mater in Kontakt. Über verschiedene

Rezeptoren und Kanäle können sie dort Neurotransmitter, Wasser und Elektrolyte aufnehmen und somit das extrazelluläre Mikromilieu regulieren. Protoplasmische Astrozyten fungieren auch als Energiespeicher, indem sie den Neuronen, die keinen zellulären Energiespeicher besitzen, Laktat zur Verfügung stellen. Sie haben nicht-überlappende Domänen, sind aber durch interzelluläre *gap junctions* aneinandergeschaltet und bilden somit ein weites astrogliales Synzytium. Das astrogliale Synzytium nimmt neben der Elektrolyt-, Wasser- und Neurotransmitterhomöostase auch in der Modulation der neuronalen Netzwerkaktivität eine bedeutende Rolle ein [37, 41-43]. Über Aquaporin-4 (Aqp-4)-Kanäle scheint dieses Netzwerk auch am Abtransport überflüssiger Makromoleküle mitzuwirken; als Pendant zum lymphatischen System wurde dieses Beseitigungssystem glymphatisches System genannt [44, 45]. Protoplasmische Astrozyten sind durch Gliotransmitter-Freisetzung in der Lage miteinander und mit Neuronen zu kommunizieren [46].

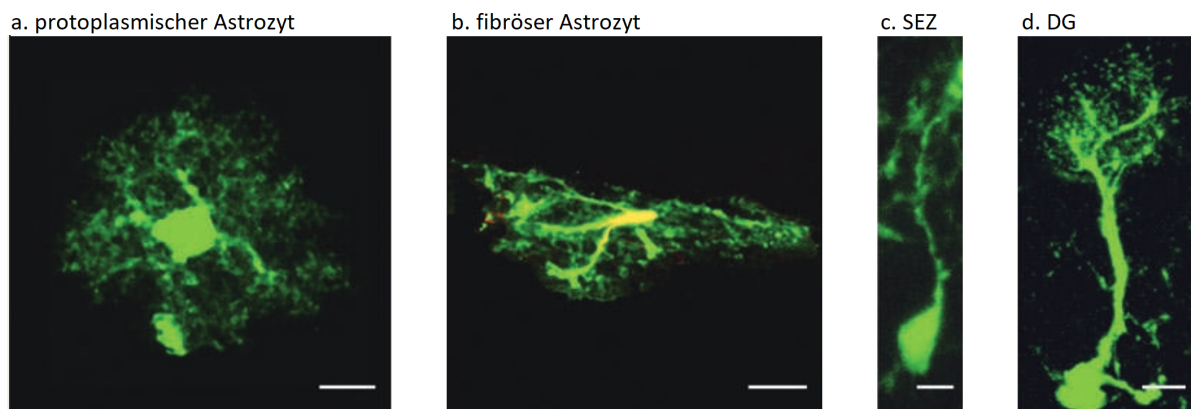


Abb. 2. Verschiedene Subtypen astroglialer Zellen im Gehirn von GlaxCreERT2-GFP reporter Maus. Modifiziert nach [47]. GFP-markierte protoplasmische (a) und fibröse (b) Astrozyten befinden sich jeweils in der grauen und weißen Substanz des zerebralen Kortex. Radiale Astroglia in der Subependymalzone (SEZ, c) und dem Gyrus dentatus (DG) des Hippokampus (d) fungieren als adulte neurale Stammzellen. Maßstab 10 μm .

Fibröse Astrozyten sind in der weißen Substanz lokalisiert und haben im Vergleich zu protoplasmischen Astrozyten weniger, aber längere Ausläufer, die parallel zu den Axonen verlaufen und mit diesen an den Ranvierschen Schnürringen Kontakt aufnehmen. Sie fördern die Myelinisierung, indem sie über eine Freisetzung von Platelet-derived growth factor α (PDGF α) die Proliferation und Migration von OPCs kontrollieren [48]. Im Unterschied zu den protoplasmischen Astrozyten besitzen fibröse Astrozyten überlappende Domänen.

1.4. Neurale Stammzellen als spezialisierte astrogliale Zellpopulation

Die somatischen Zellen eines Organismus entstehen durch die mitotische Teilung einer Mutterzelle in zwei Tochterzellen. Die Definition von Stammzellen ist umstritten, da der Begriff der Stammzelle nicht einheitlich verwendet wird [49].

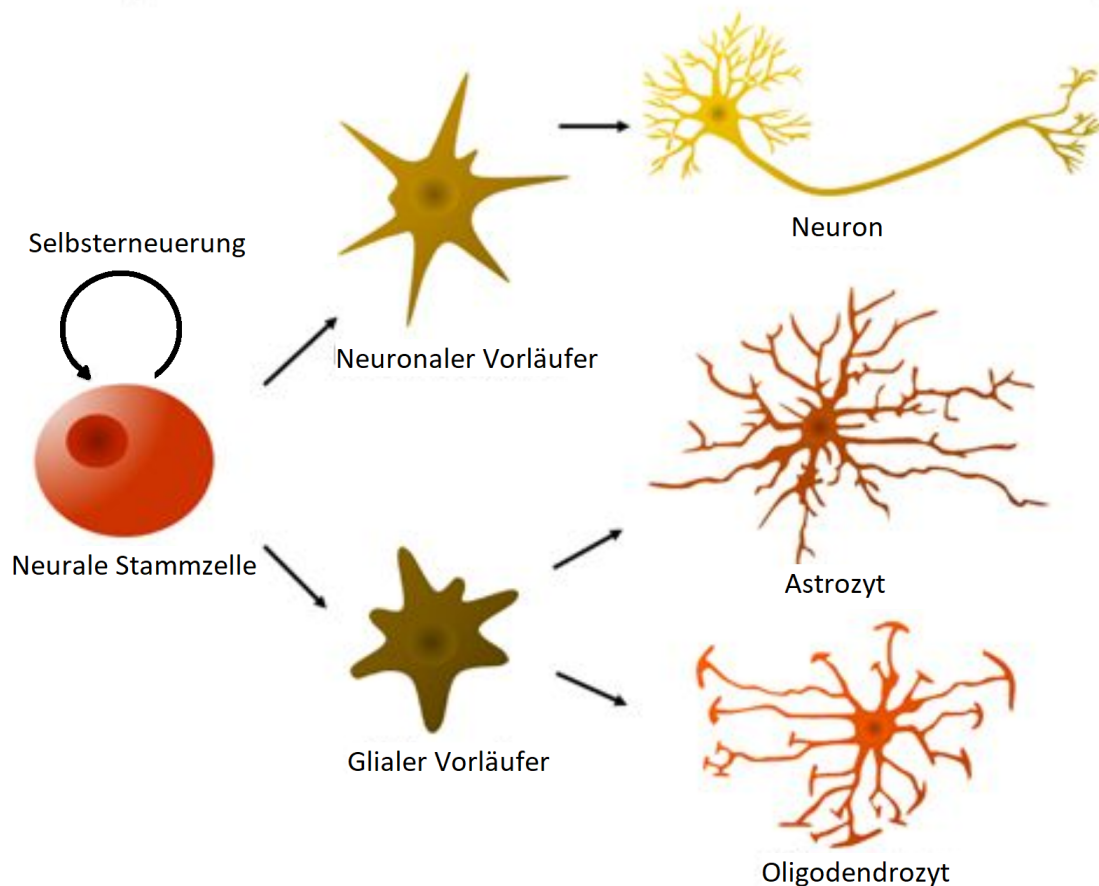


Abb. 3. Schematische Darstellung der Selbsterneuerung und Multipotenzial neuraler Stammzellen. Modifiziert nach [50]. Die embryonalen und postnatalen neuralen Stammzellen generieren alle Neuronen und makroglialen Zellen des zentralen Nervensystems.

Generell werden Stammzellen als Zellen definiert, die sich in einem undifferenzierten Zustand vermehren können (sog. Selbsterneuerung), aber auch differenzierte Zellen hervorbringen können (multipotente Differenzierungskapazität) [51]. Bei der Teilung einer Stammzelle entstehen zwei Tochterzellen, von denen eine Tochterzelle weiterproliferiert, während sich die andere in einen der Mutterzelle ähnlichen Zustand versetzt, um sich später erneut teilen zu können. Diese Zellteilung wird als asymmetrisch bezeichnet, da sich die zwei Tochterzellen proliferativ anders verhalten [52]. Aus der proliferierenden Tochterzelle entstehen durch

weitere Teilungszyklen immer mehr Zellen, die mit jeder Teilung potenziell weniger Zellarten generieren können und deren Abkömmlinge zu funktionellen, erwachsenen Zellen ausdifferenzieren (s. Abb. 3). Ausdifferenzierte Zellen verlieren ihre Fähigkeit zur Teilung. Die neuralen embryonalen und postnatalen Stammzellen sind radiale Gliazellen und erfüllen neben der Generierung von Neuronen und Gliazellen auch in der Organisation neuraler Wanderung eine wichtige Rolle [53-56]. Seit nun mehr als 30 Jahren weiß man, dass auch die adulten neuralen Stammzellen eine spezialisierte Population astroglialer Zellen darstellen [56, 57]. Das Vorkommen von Stammzellen, und somit auch von Neurogenese im adulten Gehirn hat erhebliches Interesse an der Biologie und am Potenzial dieser Zellen geweckt [28, 58, 59]. In erwachsenen Säugern finden sich adulte neurale Stammzellen in der Subependymal-Zone (SEZ) an den lateralen Ventrikeln (LV) und in der Subgranulär-Zone (SGZ) des Gyrus dentatus (DG) im Hippocampus [60].

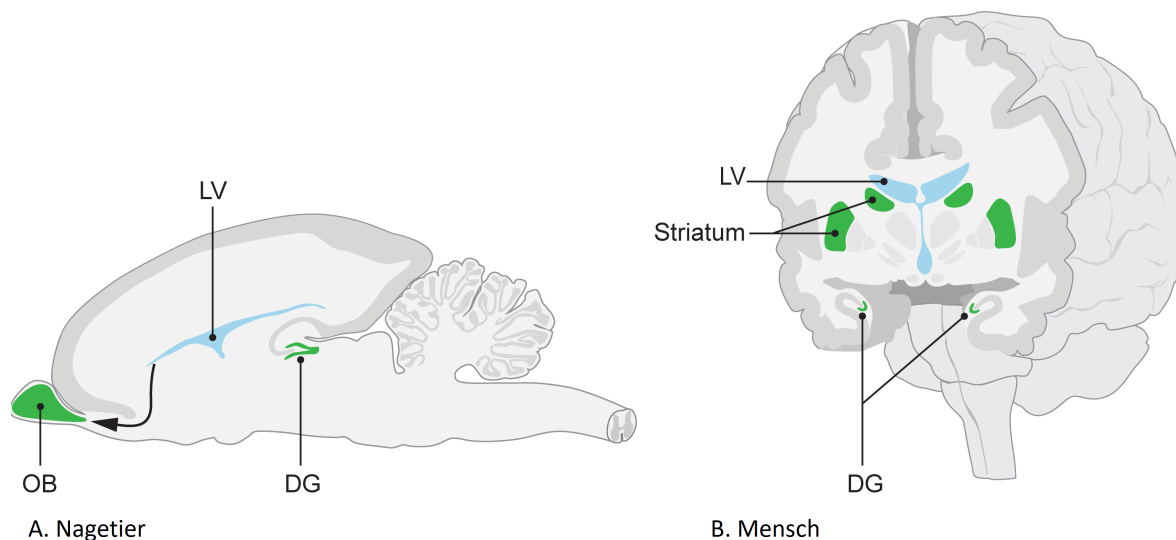


Abb. 4. Schematische Darstellung adulter neuraler Stammzellnischen im Nagetier (A) und Gehirnen vom Menschen. Modifiziert nach [61]. DG Gyrus dentatus, LV Lateralventrikel, OB Bulbus olfactorius.

Beim Nagetier wandern die an den lateralen Ventrikeln generierten neuralen Vorläuferzellen entlang des rostralen migratorischen Stroms zum Riechkolben (Bulbus olfactorius) und differenzieren sich zu Neuronen des Bulbus olfactorius. Im Gegensatz dazu dienen neurale Stammzellen an den lateralen Ventrikeln bei höheren Primaten der Generation neuer striataler Neurone [61]. Die im Gyrus dentatus des Hippokampus von Nagetieren generierten Nervenzellen integrieren sich in die lokalen Netzwerke, wobei der Umsatz an Zellen relativ niedrig ist (s. Abb. 4A). Im Vergleich zu Nagetieren, sorgen die hippokampalen Stammzellen

höherer Primaten für den viel höheren Umsatz an Nervenzellen im Gyrus dentatus (s. Abb. 4B) [61].

1.5. Altersbedingte Veränderungen in Morphologie und Funktionalität astroglialer Zellen

Ein fundamentales Charakteristikum des Alterns ist die reduzierte regenerative Kapazität von alternden Geweben [62]. Wie die Forschungsergebnisse mehrerer präklinischer und klinischer Studien zeigen, sinkt dadurch die Belastbarkeit des Organismus mit zunehmendem Alter drastisch. Es ist daher nicht überraschend, dass ältere Menschen zum Beispiel ein schlechteres Outcome nach einem Schlaganfall oder einer traumatischen Gehirnverletzung haben [63]. Die fehlende Fähigkeit des Organismus mit fortschreitendem Alter adäquat auf solche Verletzungen zu reagieren, um einerseits Schaden zu begrenzen und andererseits eine Rekonstruktion geschädigter Gewebestrukturen durch Wiederherstellung verlorengegangener Zellen zu erwirken, ist ein nachgewiesener Faktor der schlechteren Resilienz [64, 65].

Astrozyten werden mit zunehmendem Alter teilweise hypertroph, akkumulieren Lipofuszin im Zytoplasma [66, 67] und exprimieren signifikant mehr GFAP, Vimentin und S100 β [68]. Bedingt durch eine starke Hochregulation inflammatorischer Gene, wie z.B. Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α), Interleukin 1 β (IL-1 β), Interleukin 6 (IL-6), Transforming Growth Factor β 1 (TGF β 1) und Monocyte Chemoattractant Protein 1 (MCP-1) nehmen sie zudem mit fortschreitendem Lebensalter des Organismus einen stark pro-inflammatorischen Phänotypen an [69, 70]. Darüber hinaus zeigen alternde Astrozyten eine verringerte Expression von Proteinen, die für neuronale und gliale Differenzierung sowie Entwicklung, Axonogenese und Axonführung relevant sind [71]. Gemeinsam mit einer im hohen Alter ebenfalls erhöhten Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke und einem verstärkten Transport von Zytokinen hierüber tritt auch eine Veränderung innerhalb neuro-vaskulärer Nischen auf und juxtavaskuläre Astrozyten verlieren ihren direkten Kontakt zu den Blutgefäßen [72, 73].

1.6. Murine und humane Astrozyten unterscheiden sich in deren Eigenschaften

Die ersten neuroanatomischen und neuropathologischen Erkenntnisse über Astrozyten seit der zweiten Hälfte des 19. Jahrhunderts beruhen hauptsächlich auf *post mortem* Untersuchungen von menschlichen Hirnschnitten [17, 74-76]. In den letzten Jahrzehnten aber erfolgten die meisten embryonalen, funktionellen und genetischen Experimente an Astrozyten in tierexperimentellen Modellen, vor allem Nagetieren [77]. Dabei sind einige a.e. evolutionär bedingte substanzielle Unterschiede zwischen humanen und murinen Astrozyten zu erwähnen: Protoplasmische Astrozyten des Menschen sind ca. 16,5-mal größer als bei Mäusen und sind auch dementsprechend komplexer (s. Abb. 5). Humane Astrozyten haben ungefähr 10-mal so viele Ausläufer und treten im Durchschnitt mit 30-mal so vielen Synapsen (20.000-120.000 vs. 2 Millionen) in Kontakt [78].

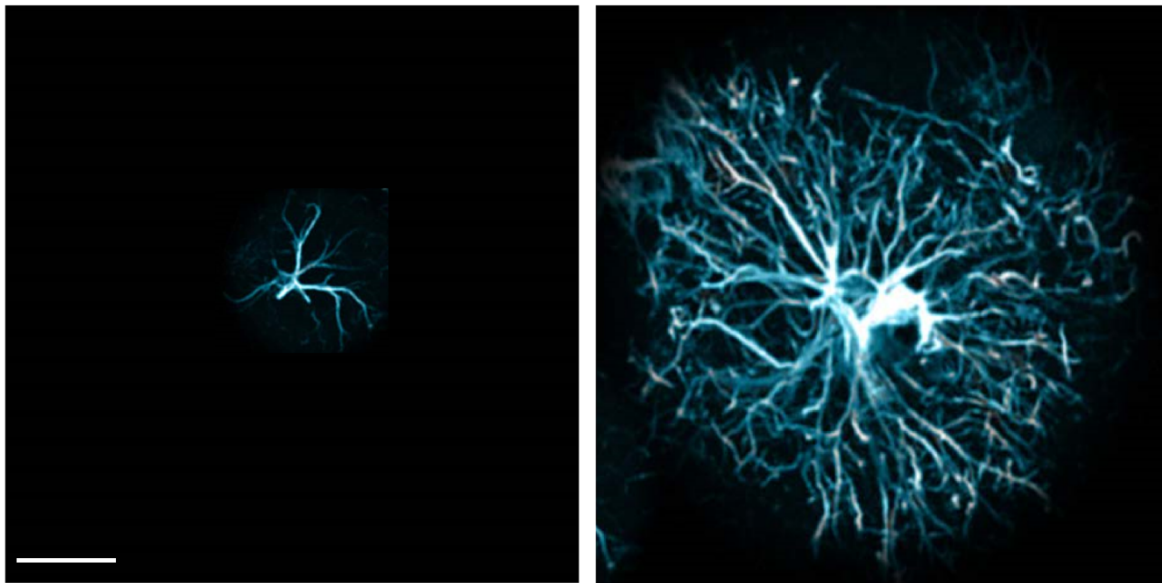


Abb. 5: Vergleich eines GFAP-positiven murinen (links) und humanen (rechts) parenchymatösen Astrozyten. Modifiziert nach [79]. Maßstab 30 μm .

Fibröse Astrozyten haben auch eine entsprechend größere Domäne beim Menschen als bei der Maus. Zudem gibt es Subtypen von Astrozyten, wie z.B. interlaminäre oder polarisierte Astrozyten, die bei Primaten, jedoch nicht in niederen Wirbeltieren vorhanden sind. Diese Astrozyten werden mit den höheren kognitiven Funktionen der Primaten in Verbindung gebracht [77].

1.7. Reaktionen des Organismus auf Gewebsverletzungen

Der Organismus von Säugetieren hat verschiedene Strategien und Möglichkeiten, auf jede Art der Gewebsverletzung, sei es mechanisch, ischämisch oder degenerativ, zu reagieren. Im Rahmen einer Verletzung kommt es in der Regel zu einem Untergang von Zellen, wodurch funktionsfähiges Gewebe verloren geht. Je nach Art und Ausmaß der Zellschädigung kann dies bedrohlich für den Organismus sein, weshalb ein Ersatz der untergegangenen Zellen angestrebt wird und – sofern möglich – erfolgt. Kommt es beispielsweise zu einem Untergang von Leberzellen, kann die Funktion des Organs aufgrund der redundanten Anlage der Leberzellen und deren Fähigkeit zur Regenerierung auch bei größeren Verlusten erhalten werden [80]. Ein weiteres Beispiel ist die Bildung eines funktionell zwar minderwertigen, aber trotzdem in gewissem Maße funktionsfähigen Ersatzgewebes, was bei tiefen Verletzungen der Haut stattfindet [81]. Nicht nur Leber, Haut und Knochen, sondern fast alle Gewebetypen der Säugetiere besitzen ein breites Arsenal von Mechanismen, die eine Selbstregeneration innerhalb gewisser Grenzen ermöglichen. Allerdings bildet das ZNS eine Ausnahme. Kommt es zu einem Untergang von Hirngewebe, zum Beispiel im Rahmen eines Schlaganfalls, neurodegenerativen Erkrankungen oder Schädel-Hirn-Traumata, vermag das Gehirn die funktionellen Beeinträchtigungen je nach Lokalisation der Schädigung gelegentlich recht effektiv zu kompensieren, indem es neue Verbindungen zwischen noch funktionsfähigen Neuronen knüpft. Bei größeren Gewebeverlusten ist dies in der Regel jedoch nicht möglich [82]. Deshalb können schon Verletzungen eines kleinen Ausmaßes zu schweren, die Lebensqualität beeinträchtigenden und teilweise bleibenden Schäden führen. Darüber hinaus ist Narbengewebe im ZNS eine Quelle für sekundäre Pathologien, wie epileptische Anfälle oder fokale Blutungen [83]. Die schädlichen Effekte der Narbenbildung sowie der neurale Zelluntergang sind bis dato nicht behandelbar oder ersetzbar.

1.8. Die Rolle von Astrozyten bei Verletzungen des ZNS

Eine akute Verletzung des ZNS bewirkt in allen Typen neuraler Zellen innerhalb der geschädigten Region eine Reihe von Veränderungen auf morphologischer, struktureller und transkriptioneller Ebene. Da aber im Rahmen dieser Arbeit die verletzungsinduzierten

Veränderungen in Astrozyten behandelt werden, werde ich nachstehend hauptsächlich auf die Reaktion von Astrozyten eingehen.

Astrozyten reagieren auf Verletzungen des umliegenden Gewebes, indem sie hypertrophieren und vergrößerte Areale abdecken. Dabei werden die Domänengrenzen zu den benachbarten Astrozyten weniger respektiert [84, 85], und die Zytoarchitektur der periläsionalen Zone verändert sich bedeutend. Zudem regulieren Astrozyten infolge einer invasiver Hirnschädigung nicht nur fibrilläre Zytoskelett-Proteine und intermediäre Filamente, wie GFAP, Vimentin und Nestin, sondern auch mit Zellproliferation assoziierte Gene hoch [86]. Darüber hinaus unterstützen reaktive Astrozyten eine adäquate Reaktion von umgebenden Zellen (v.a. Mikroglia, NG2-Glia) und fördern die Wiederherstellung der Blut-Hirn-Schranke sowie eine Stabilisierung des umgebenden Mikromilieus z.B. durch Verteilung exzessiven Glutamats oder Kaliums [59, 87]. Es gibt zunehmend Hinweise darauf, dass die Reaktion der einzelnen Astrozyten-Subtypen je nach deren Lokalisation weitere Aspekte beinhaltet. So erwerben beispielsweise einige, an Gefäße räumlich gekoppelte (juxtavaskuläre) Astrozyten infolge invasiver Gehirnschädigung die Fähigkeit, sich zu teilen. Auf diese Weise kann nicht nur das Verletzungsareal vom umgebenden gesunden Gewebe abgegrenzt, sondern auch der post-traumatische Verlust astroglialer Zellen verringert, und teilweise sogar vollständig kompensiert werden [88]. Mittlerweile besteht kein Zweifel daran, dass jegliche Beeinträchtigung astroglialer Reaktion in der periläsionalen Zone eine Reihe gravierender Konsequenzen mit sich bringt. So konnte gezeigt werden, dass eine Verringerung der proliferativen Aktivität reaktiver Astrozyten zu einer lang anhaltenden Infiltration von Monozyten, Makrophagen, Neutrophilen und Lymphozyten, einem Versagen der Reparatur der Blut-Hirn-Schranke und einer stark ausgeprägten Narbenbildung führt [89, 90].

Von besonderem Interesse hier ist aber die Tatsache, dass reaktive Astrozyten noch andere Stammzeleigenschaften *in vitro* zeigen. So können einige reaktive Astrozyten unter proliferativen Zellkulturbedingungen klonal expandieren und sog. Neurosphären bilden, die sich über mehrere Generationen vermehren lassen und dabei die Vorläuferzellen von drei Hauptzelltypen des ZNS – Astrozyten, Oligodendrozyten und Neuronen – generieren können [91, 92]. Die Generierung selbst-erneuerbarer Neurosphären belegt nun eine intrinsisch vorhandene Regenerationsfähigkeit in parenchymalen reaktiven Astrozyten. Allerdings

konnte diese endogene Stammzellkapazität lokaler Astrozyten nicht *in vivo* festgestellt werden. Dies lässt nun vermuten, dass das Mikromilieu im post-traumatischen Parenchym eine neuronale De-Differenzierung reaktiver Astrozyten extrinsisch blockiert [51, 93].

1.9. Der Sonic-Hedgehog-Signalweg und seine Rolle im ZNS

Die Gene der Hedgehog (Hh)-Familie gehören zu den ältesten konservierten und rätselhaftesten Genfamilien [94]. Auf der Suche nach Genen, die in der Segmentierung während der embryonalen Entwicklung mitwirken, wurde das *Hedgehog*-Gen zuerst in *Drosophila melanogaster* entdeckt. Eine Mutation des *Hedgehog*-Gens führt zu einem kugelförmigen, gestachelten Aussehen der *Drosophila*-Embryos, was auch die Namensgebung erklärt. In Vertebraten kennt man allerdings drei *Hh*-Gene - Sonic, Indian und Desert hedgehog (*Shh, Ihh, Dhh*).

Als Haupteffekt der Sonic-Hedgehog (SHH)-Signalwege in Vertebraten gilt die Modulation der Transkription, welche durch die Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren (TF) Gli1-3 induziert wird. Je nach Aktivität des Signalweges wird eine Repressor- oder eine Aktivator-Form dieser TF produziert. In Abwesenheit vom Protein SHH inhibiert sein Rezeptor Patched (Ptc), ein 12-Transmembran(TM)-Protein, die Aktivität des 7-TM-Proteins Smoothened (Smo). Bei der Bindung von SHH an Ptc wird Smo durch Phosphorylierung enthemmt und aktiviert. Auf diese Weise aktiviert Smo letztlich die Gli-Transkriptionsfaktoren. Dabei fungiert Gli1 als ein starker transkriptionaler Aktivator und seine Expression ist ein zuverlässiger Marker für die SHH-Signalwegaktivität. Dagegen enthalten Gli2 und Gli3 sowohl Aktivator- als auch Repressor-Domänen, wobei Gli2 eher als Aktivator und Gli3 hauptsächlich als Repressor fungiert [95-97]. Während der Embryogenese von Wirbeltieren spielt Sonic hedgehog eine wichtige Rolle bei der Entwicklung des Vorderhirns und zahlreicher anderer Gewebe (Herz, Lunge, Magen-Darm-Trakt)[96]. Angesichts der Tatsache, dass SHH die Zellteilung der embryonalen neuralen Stammzellen und insbesondere die asymmetrische Zellteilung fördert [98], kommt es bei supprimierter Aktivität des Signalweges zu zahlreichen Missbildungen, wie z.B. Holoprosencephalie, einer meist intrauterin letalen Gehirnefehlbildung, aber auch fehlenden distalen Extremitäten und Rippen, sowie einer unterentwickelten Wirbelsäule [99, 100]. Im adulten Organismus ist SHH wichtig für Gewebeerhaltung und eine erhöhte Aktivität konnte mit verschiedenen Neoplasien (hepatozelluläres Karzinom, Pankreaskarzinom) in Verbindung

gebracht werden [101]. Eine neuere Erkenntnis ist, dass der SHH-Signalweg auch im adulten Nervensystem aktiv bleibt und unter physiologischen Bedingungen die Proliferation und Differenzierung von neuronalen Stammzellen moduliert.

Im verletzten Gehirn werden je nach Art, Lokalisation und Ausmaß der Verletzung fördernde oder hemmende Effekte auf die Reaktivierung von Astrozyten postuliert [102-105]. Der aktive SHH-Signalweg führt zu einer vermehrten Proliferation von reaktiven Astrozyten, Mikroglia, Oligodendrozyten und NG2+ Zellen, einem besseren neuronalen Überleben und zu einer verbesserten Integrität der Blut-Hirn-Schranke. Vielmehr, bei traumatischen Verletzungen ist die Aktivierung des SHH-Signalweges sowohl notwendig als auch ausreichend für die Förderung der Proliferation und des Stammzellpotentials von reaktiven Astrozyten [91]. Dagegen wurde in einem Mausmodell bei Knockout des SHH-Genes in Nestin-exprimierenden Astrozyten eine schlechtere neurologische Erholung nach einem ischämischen Schlaganfall beobachtet. Nach Gabe eines SHH-Agonisten konnte jedoch eine Verbesserung des neurologischen Outcomes beobachtet werden, was auf einen positiven Effekt des SHH-Signalweges in reaktiven Astrozyten nach akutem zerebralen Schaden hindeutet [106].

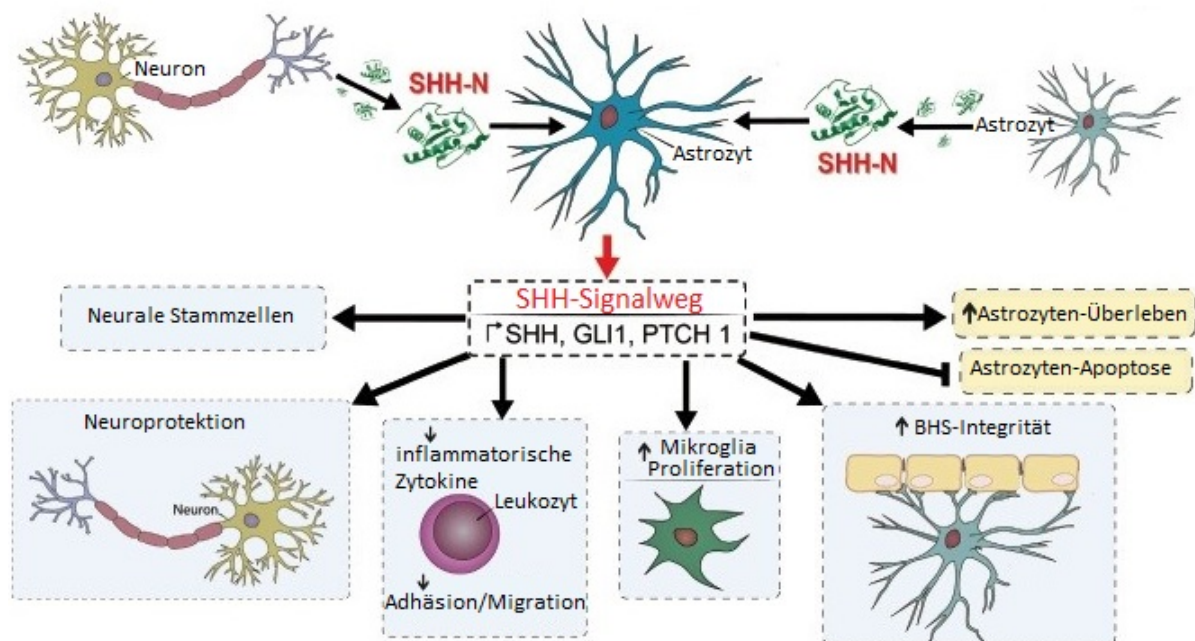


Abb. 6. Schematische Darstellung der Effekte des aktivierten SHH-Signalweges in reaktiven Astrozyten. Modifiziert nach [107]. Das hauptsächlich aus Neuronen und Astrozyten freigesetzte SHH-Protein aktiviert den SHH-Signalweg in reaktiven Astrozyten und fördert dadurch weitere Effekte auf umgebende Zellen und Strukturen.

Das SHH-Protein ist nach seiner Freisetzung aus Zellen funktionell inaktiv und erfordert weitere komplexe, (auto-)proteolytische Schritte zur Aktivierung, was eine externe Zugabe

dieses Proteins für experimentelle Zwecke erschwert [108, 109]. Stattdessen sind Modulatoren einzelner Elemente des Signalweges zur Untersuchung dieser etabliert, wie z.B. die Aktivatoren Purmorphamine (PMA) oder Smoothened-Agonist (SAG), oder der Inhibitor Cyclopamine [110].

2. Zentrale Fragestellungen dieser Arbeit

Astrozyten sind gliale Zellen, die eine essenzielle Rolle in der Homöostase des zentralen Nervensystems (ZNS) spielen, und zwar auf verschiedensten Ebenen: der molekularen, zellulären, regionalen sowie der Organ- und Systemebenen. Somit ist es klar, dass diese Zellen eine zentrale Bedeutung nicht nur für die Funktionalität des ZNS haben, sondern auch die Hauptakteure bei der Reaktion des zentralnervösen Gewebes auf verschiedene Arten von Schädigungen sind und dabei umfassende Schlüsselfunktionen bei der Regulation der Neuroprotektion, Immunabwehr und Phagozytose im geschädigten Gewebe übernehmen. Ausgangspunkt dieser Arbeit ist die Tatsache, dass sich sowohl die Morphologie als auch das funktionelle Verhalten parenchymaler Astrozyten mit zunehmendem Alter verändern. Dies kann zu einer schlechteren Resilienz älterer Organismen nach Gehirnverletzungen beitragen. Daher ist es Ziel der vorliegenden Arbeit, zum einen die altersbedingten Veränderungen im Reaktions- und Proliferationsverhalten kortikaler Astrozyten infolge einer traumatischen Verletzung in der grauen Substanz sowohl *in vivo* als auch *in vitro* zu charakterisieren und zum anderen der Frage nachzugehen, wie die verletzungsassoziierte Aktivierung des SHH-Signalweges das proliferative Verhalten reaktiver Astrozyten im geschädigten Hirnparenchym koordiniert und inwiefern die post-traumatische Modulation dieses Signalweges eine Relevanz für die astrogliale Plastizität im älteren Gehirn hat.

Dadurch ergeben sich folgende Fragestellungen:

1. Wie wirkt sich das physiologische Altern auf kortikale Astrozyten morphologisch und funktionell aus?
2. Wie verändert sich die Reaktivität der Astrozyten im Kontext akuter invasiver Schädigung mit zunehmendem Alter?
3. Wie und warum ändert sich das Proliferationsverhalten von kortikalen Astrozyten mit dem Alter?
4. Lassen sich altersbedingte Einschränkungen der Astrozytenplastizität durch eine gezielte pharmakologische Modulation des SHH-Signalweges beeinflussen bzw. verbessern?

3. Materialien

3.1. Geräte

Geräte	Hersteller
AxioCamHRm camera	Zeiss
Analytische Waage	Sartorius
AxioVision v4.7 imaging software	Zeiss
Binocular MZ6	Leica
Biometra T3000 Thermocycler	Labrepcó
Cell observer Z1	Zeiss
Cryostate CM 3050	Leica
Digital Lab Standard Stereotaxic Instrument	Stoelting Co.
Drill K1070 High Speed Rotary Micromotor Kit	Foredom
Duomax 1030 Plattformschüttler	Heidolph Instruments
Geldox XR	BIO-RAD
Haarrasierer	Philips
Heating unit XL S	Zeiss
HXP 120	Zeiss
Incubator	Binder
Kaltlichtquelle KL 1600 LED	Schott
Konfokaler Mikroskop LSM700	Zeiss
Laminar flow	BDK
Megafuge 8R	Thermo Scientific
Mikroskop AxioImager M2	Zeiss
Mikrowelle	Privileg
Minipuls 3 Peristaltic Pump	Gilson
Phase contrast microscopy objective	Zeiss
pH-Meter inoLab	WTW
Schüttelwasserbad Haake	PSL Systemtechnik
Stereomikroskop SZ61	Olympus

TempModule S	Zeiss
Vortex-Genie	Bender & Hobein AG
Pipetten	Gilson
Kühlschrank	Privileg
Kühlschrank	Liebherr

Tabelle 2 Verwendete Geräte mit Herstellerangabe

3.2. Einwegartikel

Einwegartikel	Hersteller
Nunclon Delta Surface Zellkulturplatte (142475, 150350)	Thermo Scientific
Falcon Zellkulturplatte 353047	Fisher Scientific
Aqua Poly/Mount #18606	Polyscience
Objektträger	Roth
Deckgläser Ø 14 mm (Menzel-Gläser)	Thermo Scientific
PCR-Gefäß	Peqlab
peqGOLD Universal Agarose	Peqlab
Bepanthen Augen- und Nasensalbe	Bayer
Pur-Zellin Zellsofftupfer	Hartmann
Kimberly-Clark Kimtech Science Delicate Task Wischtücher	Fisher Scientific
Bohrkopf	Meisinger
BD Micro-Fine Insulinspritzen, 1,0 ml	B&D
Parafilm PM-996	Cole-Parmer
Reaktionsgefäß (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Plastibrand
Reaktionsgefäß mit safelock (1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf
Serologische Pipetten (5 ml, 10 ml, 15 ml)	Sarstedt
Skalpellschneide (bauchig, 22)	Schreiber GmbH
Nahtmaterial Vicryl Polyglactin 910	Ethicon
Spritze Omnifix-F (1 ml)	Braun
V-Lance Knife, 19G	Alcon
Greiner Zentrifugen-Gefäße (15 ml, 50 ml)	Sigma-Aldrich
Pipettenspitzen	Sarstedt
Sugi Saugtupfer	Kettenbach

Tabelle 3. Verwendete Einwegartikel mit Herstellerangabe

3.3. Puffer und Lösungen

3.3.1 DNA-Extraktion und Genotypisieren

Lyse-Puffer	
NaCl	1 M
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	0,5 M
Natriumlaurylsulfat (SDS)	10%
Tris-HCl (TRISbase pH 8,5)	1 M
Proteinkinase K	10 mg/ml
ddH ₂ O	

PCR-Puffer universell	
KCl	500 mM
Tris-HCl	100 mM
ddH ₂ O, pH 8,7	

dNTP Mix	
dATP, dTTP, dCTP, dGTP	je 2,5 mM
ad ddH ₂ O	1 l

PCR- Masterlösung	
MgCl 25 mM	2,5 µl
PCR-Puffer universell	2,5 µl
Q-Solution	5 µl
dNTP Mix	0,5 µl
Taq DNA-Polymerase	0,5 µl
Primer	0,5 µl
H ₂ O	11 µl

TAE-Puffer	
TRISbase	242g
Na ₂ -EDTA	37,2 g
Essigsäure (100%)	57,1 ml

DNA-Loading Puffer	
Glycerin (100%)	20 ml
TAE-Puffer	1 ml
Bromphenolblau	200 µl
Xylene Cyanol-Lösung	500 µl
ad ddH ₂ O	50 ml

3.3.2 Immunohistochemie

Paraformaldehyd (PFA, 20%)	
Na ₂ HPO ₄	134 g
Paraformaldehyd	400 g
NaOH	10 ml
ad ddH ₂ O, pH 7,4, durch Papierfilter	2 l

Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	
Na ₂ HPO ₄	0,08 M
KH ₂ HPO ₄	0,01 M
NaCl	1,5 M
KCl	0,03 M
ad ddH ₂ O, pH 7,4	1 l

Block-Lösung	
TritonX-100	0,5%
Ziegenserum	10%
ad PBS	

3.3.3. Tierbehandlung

Narkoselösung "MMF"	
Fentanyl-Citrat	12,5 µg
Midazolam	2,5 mg
Medetomidin	250 µg
ad NaCl-Lösung (0,9%)	5 ml

Narkose-Antagonist "BFA"	
Buprenorphin	50 µg
Flumazenil	250 µg
Atipamezol	1,25 mg
ad NaCl-Lösung (0,9%)	5 ml

3.3.4. Zellkultur

Neurosphären-Medium	
L-Glutamin	0,2 mg/ml
B27 supplement	
Penicillin	100 U/ml
Streptavidin	100 µg/ml
ad DMEM-F12-Lösung	

Papain-Lösung	
Papain	30 U/ml
L-Cystein	0,24 mg/ml
DNase I	40 µg/ml
ad MEM-Lösung	

Ovomucoid-Lösung	
Trypsin-Inhibitor	1 mg/ml
BSA	50 µg/ml
DNase I	40 µg/ml
ad L-15-Lösung	100 µg/ml

3.3.5. Antikörper

Primäre Antikörper	Hersteller	Verdünnung für IHC	Verdünnung für ICC
BrdU (Ratte)	Biozol	1:200	-
Ki67 (Hase)	Life Technologies	1:100	-
Aldh111 (Maus)	Millipore	1:200	-
βIII-Tubulin (Maus)	Promega	-	1:250
GFAP (Maus)	Sigma-Aldrich	1:400	1:200
GFAP (Hase)	Dako	1:500	1:300
Iba1 (Hase)	Wako	1:500	1:300
NG2 (Hase)	Chemicon	1:200	1:200
O4 (Maus)	Millipore	1:100	1:50
S100β (Maus)	Sigma-Aldrich	1:250	-

Tabelle 4. Primäre Antikörper mit Hersteller- und Verdünnungsangabe

Es wurden subklassenspezifische, mit folgenden Fluorochromen (Verdünnung) gekoppelte sekundäre Antikörper, jeweils von Dianova, benutzt: Alexa488 (1:500), Alexa594 (1:1000), Alexa633 (1:1000), Cy3 (1:500), Cy5 (1:1000).

4. Methoden

4.1. Experimentelle Tiere

Alle hier beschriebenen *in vivo*-Experimente wurden mit C57BL/6 Mäusen (Charles River Laboratories)[111] durchgeführt. Für *in vitro*-Analysen und die Time-Lapse-Videomikroskopie wurden aus zwei transgenen Mauslinien doppelt-transgene Mäuse generiert: Bei der hGFAP-mRFP1 Mauslinie wurde das Gen für das rot fluoreszierende Protein mRFP1 (monomeric red fluorescent protein 1) dem Promoter für das humane GFAP nachgeschaltet [112]. Bei der hGem-mAG Mauslinie wurde ein chimäres Protein aus dem trunkierten E3-Ligase-Substrat Geminin (110 N-terminale Aminosäuren) und dem grün fluoreszierenden monomeren Azami Green (mAG) produziert [113]. Durch dieses Genkonstrukt werden aktive Zellkerne in den Phasen M, S und G2 des Zellzyklus markiert.

Die Tiere wurden je nach Genotyp und Geschlecht in getrennten Käfigen unter Standardbedingungen gehalten und hatten Flüssigkeits- und Nahrungszugang *ad libitum*. Die Tierhaltung und experimentelle Verfahren wurden nach deutschen und europäischen Richtlinien und mit Zustimmung der Regierung von Oberbayern durchgeführt.

Für die Experimente mit Bromodesoxyuridin (BrdU) wurde das Trinkwasser der Tiere für fünf aufeinanderfolgende Tage (entweder post-operativ oder in der Kontrollgruppe ohne invasive Intervention in vergleichbarem Alter) mit dem Nukleosid-Analogon versetzt (1mg/ml BrdU in 1% Saccharose-Lösung)[114]. Für die Experimente mit *in vivo* SAG-Applikation wurde täglich für insgesamt fünf Tage SAG-Lösung (0,15 mg SAG in 0.5% Methylzellulose/0.2% Tween80 stabilisierter Trinkwasser-Emulsion pro 10 gKG) durch eine Schlundsonde direkt in den Magen appliziert. Untersucht wurden Tiere im Alter von zwei (jung/juvenil), sechs und neun (adult) sowie zwölf und 18 (alt) Monaten.

4.2. Extraktion von DNA

Für die Genotypisierung der Tiere erfolgte eine Desoxyribonukleinsäure(DNA)-Extraktion aus Schwanzbiopsien. Die abgetrennten, maximal 10 mm langen Schwanzspitzen wurden in ein 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen mit 0,5 ml Lyse-Puffer gegeben. Auf einer Schüttelplatte wurden die Biopsien über Nacht bei 55°C agitiert. Nachdem die Behälter mit einem Vortexmischer

geschüttelt wurden, wurden die Eppendorf-Röhrchen bis zum Erhalt eines sichtbaren präzipitierten Pellets aus Haaren und nicht-lysiertem organischem Material zentrifugiert. Der flüssige DNA-haltige Überstand wurde mit 0,5 ml Isopropanol 70% gemischt, woraufhin erneut so lange mit dem Vortexmischer geschüttelt wurde, bis die sichtbare Viskosität der Lösung verschwand. Das aggregierte DNA-Präzipitat wurde in einem separaten Röhrchen in 500 µl Puffer-Lösung (10 mM Tris-HCl; 0,1 mM EDTA mit pH 7,5) gegeben [115].

4.3. Genotypisierung/Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Jeweils 2 µl der extrahierten DNA-Proben wurden mit 23 µl einer PCR-Masterlösung vermischt. Für den Nachweis des hGFAP-mRPF1 Konstrukts wurden die Primer 5'-CCC CGT ATT GCA GAA GAA GA-3' und 5'-CTT GGC CAT GTA GGT GGT CT-3', für das hGem-mAG die Primer 5'-CTT CTT CTA CGA CAT GTT-3' und 5'-GCA TCT AGA TTA CAG CGC CTT TCT CCG TTC TGC-3' verwendet. Die PCR wurde nach folgenden Protokollen in einem Thermocycler durchgeführt:

hGFAP-mRFP1

Schritte (34 Zyklen)	Temperatur	Zeit
1. Denaturation	90°C	30 Sekunden
2. Primerhybridisierung	60°C	30 Sekunden
3. Elongation	72°C	60 Sekunden

hGem-mAG

Schritte (34 Zyklen)	Temperatur	Zeit
1. Denaturation	94°C	30 Sekunden
2. Primerhybridisierung	55°C	30 Sekunden
3. Elongation	72°C	60 Sekunden

4.4. Unilaterale Stichwundenverletzung

Die unilaterale Verletzung des somatosensorischen Kortex wurde wie bereits in [91, 114, 116-118] beschrieben durchgeführt. Für die Operation wurden die Versuchstiere durch eine

intraperitoneale Injektion von 0,1 ml/g Körpergewicht (KG) Narkoselösung "MMF" anästhesiert. Die Tiefe der Narkose wurde vor Beginn des Eingriffes durch ausgefallene motorische Reaktion auf Schmerzreiz sichergestellt (Druck mit Pinzette auf die hinteren Pfoten). Die Maus wurde durch zwei bis in die Meatus acusticus internae vorgeschobene Stifte und einen Fixateur an den Nagezähnen fixiert. Der Schädel wurde von der Stirn bis zum Nacken rasiert und desinfiziert. Nach einem medianen Schnitt bis auf die Schädelkalotte wurden die zwei freien Hautlappenenden mit dem darunterliegenden Weichteilgewebe auseinandergeschoben, um freien Zugang zum Knochen zu erhalten. Mit einer Dental-Bohrmaschine (Foredom) wurde paramedian eine Kraniotomie von ca. 2 mm Durchmesser durchgeführt. Das Operationsgebiet wurde daraufhin mit einer 0,9%-igen NaCl-Lösung gespült. Mit einer in drei zueinander orthogonalen Schienen fixierten Lanzette wurde in das freiliegende somatosensorisch-kortikale Gewebe eine 0,6 – 0,7 mm tiefe und 1 mm lange Stichverletzung stereotaktisch gesetzt, ohne dabei eine Subduralvene zu durchtrennen. Anschließend wurde die Wunde mit drei Knopfnähten geschlossen, die Wirkung des Anästhetikums mit einer kontralateralen intraperitonealen Injektion von 0,1ml/gKG einer antagonisierenden Lösung "BFA" aufgehoben und das Tier zum Aufwachen für zwei Stunden in einen auf 32°C Temperatur gewärmten Inkubator verlagert.

4.5. Gewebeentnahme und Herstellung der Einzelzellsuspension

Die Tiere wurden durch eine CO₂-Narkose anästhesiert und durch zervikale Dislokation getötet. Das Gehirn wurde aus dem Schädel präpariert und in *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) mit 10%igem fetalem Kalbsserum (FCS) zur weiteren mikroskopischen Dissektion transportiert. Die lädierten somatosensorisch-kortikalen sowie die kontralateralen nicht-lädierten (oder bei nicht-operierten Kontrollmäusen die entsprechenden somatosensorischen) Stellen wurden mit einer Stanze von 35 mm Durchmesser ausgestanzt. Die faserige weiße Substanz sowie die stark adhärenenten Meningen der entnommenen Gewebestücke wurden mithilfe von Mikropinzetten entfernt. Die Gewebestücke wurden bis zur Lyse in DMEM mit 10%igem FCS aufbewahrt.

Für die adhärenenten Zellkulturen und für das Immunopanning wurden die Gewebestücke mit dem Enzym Papain verdaut, welches zuvor in einer *Minimum Essential Medium Eagle* (MEM)-Lösung mit 0,24mg/ml L-Cystein und 40µg/ml DNase I für 10 Minuten aktiviert wurde. Die

Gewebeproben wurden für 15 Minuten mit dieser Lösung behandelt und dabei alle 5 Minuten resuspendiert. Nach 15 Minuten wurde die Verdauung mit dem gleichen Volumen an Ovomuroid-Lösung (1mg/ml Trypsin-Inhibitor, 50 µg/ml Bovines Serum-Albumin (BSA), 40 µg/ml DNase I in L-15 Medium) gestoppt. Nach einer 5-minütigen Zentrifugation bei 200 g wurden die Zellen für die Kultivierung in Neurosphären-Medium (0,2mg/ml L-Glutamin, B27 Supplement, 100U/ml Penicillin, 100µg/ml Streptavidin in DMEM-F12 Medium) oder für eine *fluorescence-activated cell sorting* (FACS)-Analyse in DMEM mit 10% FCS resuspendiert.

Für die Neurosphären-Kulturen und FACS-Analysen wurde das entnommene Gewebe mit Trypsin (0,025%) für 20 Minuten bei 37 °C verdaut. Nach mehrmaliger Resuspension der Lösung (bis keine Partikel mehr frei sichtbar waren) wurde die Verdauung mit Ovomuroid-Lösung gestoppt.

4.6. Gewebeentnahme und immunohistochemische Analyse (IHC)

Für die immunohistochemische Analyse wurden die Versuchstiere durch eine intraperitoneale Injektion von Ketamin/Rompun (Ketaminhydrochlorid 100 µg/gKG; Xylazinhydrochlorid 20 µg/gKG) tief anästhesiert, in einer CO₂-Kammer getötet und in Rückenlage auf dem Sektionstisch fixiert. Die Bauchhöhle wurde eröffnet, die Öffnung beidseits bis an die Flanken erweitert. Nach medianer Durchtrennung des Zwerchfells wurden die Rippen durchtrennt und die Thoraxflügel aufgeklappt, um freien Blick auf das Herz zu gewinnen. Die linke Kammer wurde an den zuführenden Schenkel einer Pumpe angeschlossen, der rechte Vorhof wurde eröffnet. Das Gefäßsystem wurde zunächst mit PBS durchspült, bis die dunkelrote Farbe der Leber ausbleichte, anschließend wurde der Körper mit 4%-igem PFA (Para-Formaldehyd) bis zum Erreichen einer Rigidität des Schwanzes, der Extremitäten und des Nackens durchspült.

Das entfernte und fixierte Gehirn wurde für einen Tag in 30%iger Sucrose-Lösung kryoprotektiv behandelt. Nach der Saccharose-Behandlung wurde das Gehirn in Aqua Poly/Mount-Schaum eingefroren, mit einem Kryostaten in 30µm dünne koronare Schnitte geschnitten und nach Standardprotokollen der Hersteller mit den in Tabelle 4 aus Kapitel 3.3.5. aufgeführten Antikörpern in Block-Lösung verdünnt gefärbt. Proliferierende Zellen wurden mit BrdU markiert, welches den Versuchstieren an fünf aufeinanderfolgenden Tagen im Trinkwasser (1 mg/ml BrdU im Trinkwasser mit 1% Saccharose) vor der Tötung zugeführt

wurde. Hirnschnitte für die BrdU-Färbung wurden in einer Natrium-Zitrat-Lösung (10mM, pH von 6) bei 95°C für 20 Minuten vorbehandelt. Zellkerne wurden mit 4',6'-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI; 0,1 µg/ml) visualisiert.

4.7. Fluorescence-activated cell sorting (FACS)

Die Zellsuspension wurde bei 200 g für 5 Minuten zentrifugiert, das entstandene Pellet in BD FACSFlow TM resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde bei 70 psi durch eine Öffnung mit einem Durchmesser von 70 µm in das FACS-Gerät FACS Aria (von BD) eingeführt. Die intrazellulären Fluorochrome wurden mit LASER-Licht detektiert (grün: Stimulation bei 488 nm, Detektion bei 530 nm; rot: Stimulation bei 584 nm, Detektion bei 607 nm). Zelltrümmer und -aggregate wurden mit *forward scatter* und *sideward scatter* gegatet. Für Fluorochrome wurde mit Zellsuspensionen von Wildtyp-Mäusen gegatet. Ein- und zweifach positive Zellfraktionen wurden simultan mit einer Ereignisgeschwindigkeit von unter 2000/s in Eppendorf-Gefäße mit DMEM und 10% FCS sortiert.

4.8. Neurosphärenassay

Die durch FACS gewonnenen doppelt-positiven Zellen (je nach Experiment 200-300 Ereignisse) wurden in einer Neubauer-Zählkammer gezählt und bis zu einer Dichte von 1 Zelle pro 25 µl mit Neurosphären-Medium (mit 20 ng/ml Fibroblasten-Wachstumsfaktor (FGF) und Epidermalem Wachstumsfaktor (EGF)) verdünnt. Je 25 µl wurden in Wells einer Terasaki-Platte gefüllt. Die Kulturen wurden täglich hinsichtlich des Auftretens von Zeichen einer Neurosphären-Entwicklung untersucht.

4.9. Immunopanning

Für diese Untersuchung wurde die unter Kapitel 4.5. beschriebene Zellsuspension benutzt. Sterile Plastik-Immunopanning-Schalen mit einem Durchmesser von 8 cm wurden über Nacht mit 15µg/ml biotinylierten polyklonalen sekundären Antikörpern gegen primäre Hamster-Antikörper in TrisHCl (pH 9.5) inkubiert. Am Folgetag wurden die sekundären Antikörper dreimal mit PBS + 0,1% BSA (pH 7,4) gewaschen und anschließend für zwei Stunden mit

primären Hamster-Antikörpern gegen den Glutamat-Transporter GLT-1 inkubiert. Anschließend folgten drei weitere Waschschrte mit PBS mit 1% BSA (PBS-A).

Die Zellsuspension wurde erst zwei Stunden nach der Lyse im Immunopanning untersucht, um eine Regenerierung der oberflächlichen Antigene zu ermöglichen. Die Zellen wurden auf den mit GLT-1-Antikörpern beschichteten Platten ausplattiert und die nicht-adhärente Fraktion der Zellen nach einer Stunde durch mehrere Waschschrte entfernt. Die adhärenen Zellen wurden auf Poly-L-Ornithin (PLO)-beschichteten coverslips für weitere immunozytochemische Analysen ausplattiert. Da die Adhäsion zwischen den primären Antikörpern gegen GLT-1 und dem Antigen zu stark für eine rein mechanische Dissoziation ist, wurden die noch haftenden Zellen für 10 Minuten mit 0,05% Trypsin behandelt. Die Verdauung wurde mit einer Ovomuroid-Lösung gestoppt, die Lösung abzentrifugiert und die Zellen erneut in Neurosphären-Medium resuspendiert.

4.10. Adhärente Zellkulturen

24-Well-Platten wurden mit PLO (100 µg/ml in PBS) über Nacht vorbehandelt, zwei Stunden vor dem Ausplattieren der Zellen dreimal mit PBS gewaschen und ein zweites Mal mit Laminin (20 µg/ml in PBS) behandelt. Zuletzt folgten erneut drei Waschschrte mit PBS. Die kortikalen Zellen wurden im Nährmedium (Neurosphären-Medium mit 10% BSA und FGF und EGF, jeweils 20 ng/ml) mit einer Dichte von 200.000 bis 250.000 Zellen pro Well in den vorbehandelten Wells ausplattiert. Nach zwei Tagen im Brutschrank bei 37°C, 21% O₂ und 5% CO₂ erfolgte zur besseren Sichtbarkeit ein Austausch auf frisches Nährmedium, wobei auch entstandener Detritus entfernt wurde. Die Zugabe weiterer Modulatoren (SAG, Cyclopamin) erfolgte nach diesem Waschschrte.

4.11. Time-Lapse Videomikroskopie und deren Auswertung

Die Time-Lapse Videomikroskopie der primären kortikalen Zellkulturen wurde mit einem Zeiss cell observer in einem Inkubator bei einer konstanten Temperatur von 37°C und einem CO₂-Gehalt von 5% ausgeführt. Phasenkontrast-Bilder von bis zu 72 verschiedenen Positionen in bis zu 8 Wells einer 24-well-Platte wurden reihenweise alle 5 Minuten, grüne (Stimulation bei

488 nm, Detektion bei 530 nm) und rote (Stimulation bei 584 nm, Detektion bei 607 nm) Fluorochrom-Bilder mit einer Zeiss LASER-Lichtquelle alle 450 Minuten mit einer AxioCamHRm Kamera und der Zeiss AxioVision 4.7 Software angefertigt. Am Ende jedes Experiments wurden die immunozytochemisch gefärbten Zellkulturen an den entsprechenden Stellen nochmals photographiert.

Die Auswertung der Time-Lapse Videomikroskopie-Aufnahmen erfolgte mit einer von der Arbeitsgruppe von Prof. Timm Schroeder entwickelten Software, dem Timm's Tracking Tool [119]. Bei einer selbstgesteuerten Geschwindigkeit zwischen 1 und ca. 7 frames pro Sekunde (fps) wurden einzelne Zellen in Brightfield-Aufnahmen verfolgt. Bei einer Zellteilung wurden beide Tochterzellen nacheinander verfolgt. Der Tod einer Zelle, Verlust der Zelle in der Menge oder das Auswandern aus dem Bilderrahmen wurden entsprechend notiert und in den Stammbäumen markiert („x“ für Tod, „?“ für Verlust jeglicher Art). Die Nummerierung der Zellen erfolgte folgendermaßen: Für eine Mutterzelle n , wurden die Tochterzellen mit $2n$ und $2n+1$ benannt.

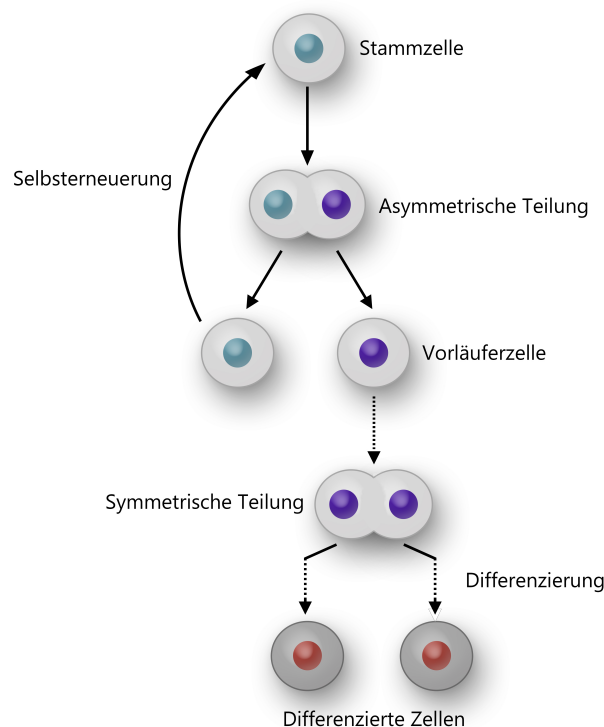


Abb. 7. Schematische Darstellung des Teilungsverhaltens von Stammzellen. Modifiziert nach [38]. Die Tochterzellen einer Stammzelle verhalten sich unterschiedlich. Eine Tochterzelle teilt sich wie die Mutterzelle nach einer längeren Ruhephase und sorgt somit für die Selbsterneuerung der Stammzelle. Die andere Tochterzelle proliferiert rege weiter über symmetrische Teilungen (gepunktete Pfeile), bis sich die Tochterzellen ausdifferenzieren.

Die aufgezeichneten Zellteilungen wurden (wie in Abb. 7 ersichtlich) in folgende Klassen unterteilt: symmetrisch proliferativ, falls beide Tochterzellen weiterproliferierten; asymmetrisch proliferativ, falls eine Tochterzelle weiterproliferierte und die andere keine Zellteilungsaktivität mehr zeigte; sowie symmetrisch nicht-proliferativ, falls keine der Tochterzellen sich weiter teilte.

4.12. Immunocytochemie (ICC)

Die adhärennten Zellen wurden dreimal mit PBS für jeweils 5 Minuten gewaschen und anschließend für 5 Minuten mit 2%-igem PFA fixiert. Die Fixierung wurde mit PBS und 1% Kalbserum-Albumin (bovine serum albumine, BSA) gestoppt. Die Färbung der Zellen erfolgte nach Standardprotokollen der Hersteller mit den in Tabelle 3.3.5. aufgeführten in Block-Lösung verdünnten Antikörpern. Die Zellkerne wurden mit 4',6'-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI; 0,1 µg/ml) visualisiert.

5. Ergebnisse

5.1. Altersbedingte physiologische Veränderungen von Astrozyten des somatosensorischen Kortex

Die altersbedingten Veränderungen in parenchymalen Astrozyten innerhalb der kortikalen grauen Substanz (GS) wurden in Hirnschnitten von Mäusen aus drei Altersgruppen untersucht: jung (2-3 Monate), adult (6-9 Monate) sowie alt (12-18 Monate). Dabei ließ sich feststellen, dass sich die Anzahl GFAP-immunopositiver Astrozyten in der somatosensorischen Hirnrinde mit zunehmendem Alter graduell erhöht, während die gesamte astrogliale Population unverändert bleibt (Abb. 9A). Im Vergleich zu jungen Tieren ist die dreifache Zunahme in der Anzahl von GFAP+ Astrozyten in alten Mäusen (Abb. 9B) mit progressiven Veränderungen in der Morphologie dieser Astrozyten assoziiert, die im Gegensatz zu ruhenden Aldh1l1+/GFAP- Zellen, welche über das ganze Altersspektrum eine unveränderte Morphologie zeigten, zunehmend hypertroph wurden (Abb. 8, 9C).

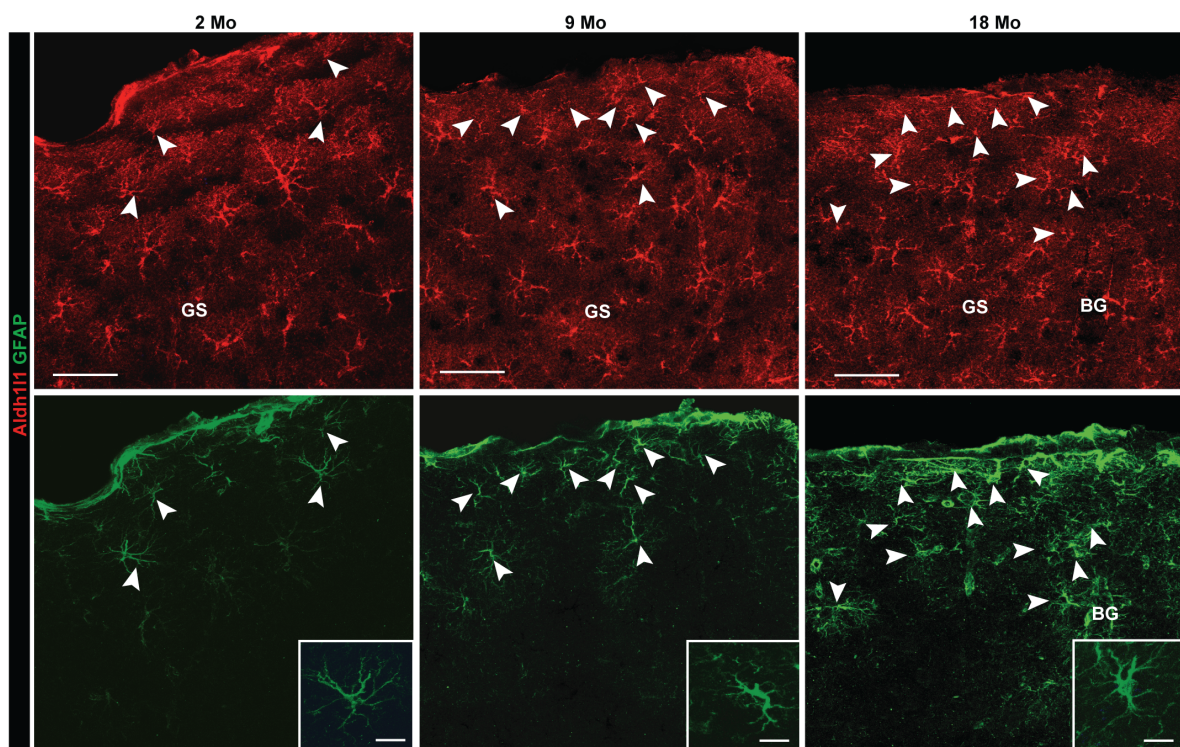


Abbildung 8. Altersbedingte Veränderungen der astroglialen Zellpopulation in der gesunden somatosensorischen grauen Substanz (Teil 1) GFAP+ Astrozyten (weiße Pfeile) zeigen im Gegensatz zu Aldh1l1+GFAP- negativen Astrozyten eine altersbedingte Hypertrophie. BG Blutgefäß, CC Corpus callosum, SV Seitenventrikel. Maßstab im Überblick 100 μ m, in hochauflösenden Bildern 20 μ m. Modifiziert nach [117].

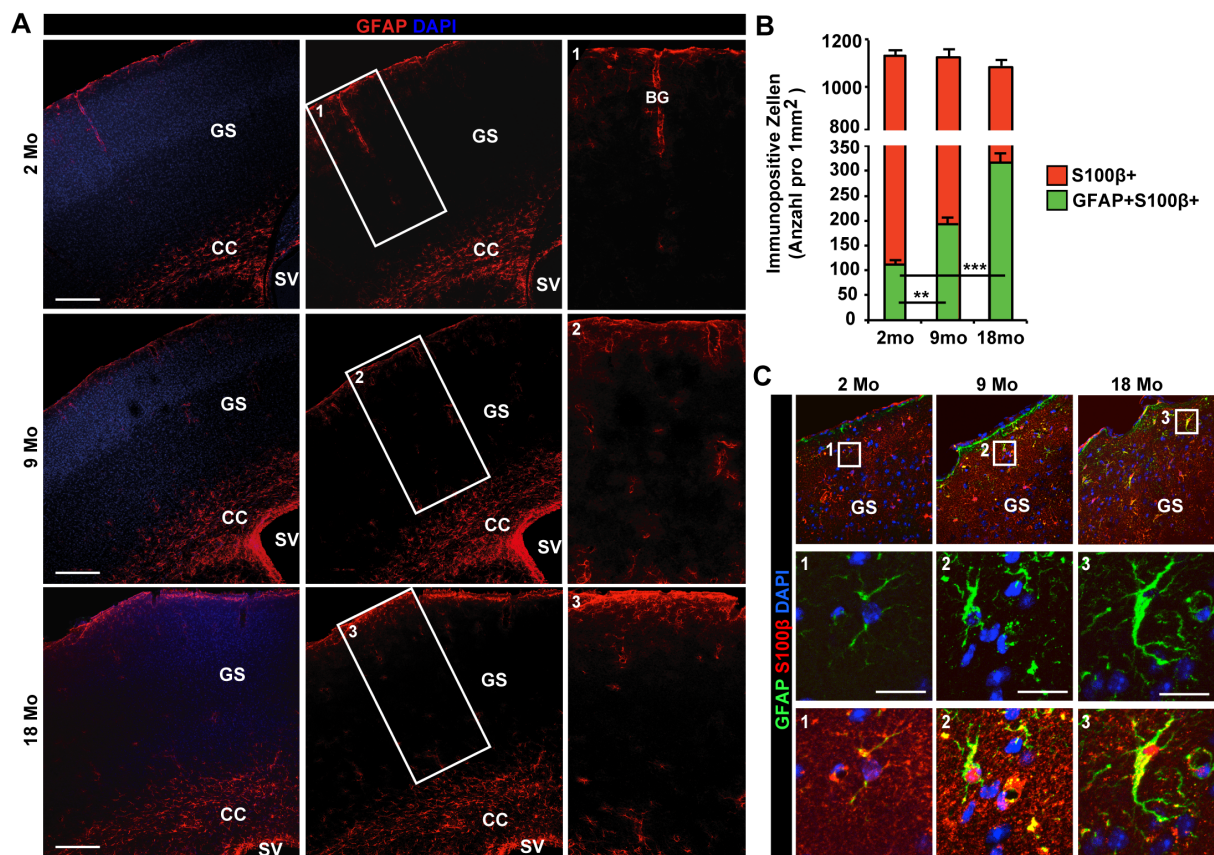


Abbildung 9. Altersbedingte Veränderungen der astroglialen Zellpopulation in der gesunden somatosensorischen grauen Substanz (Teil 2). (A) Verteilung der GFAP-positiven Astrozyten in Hirnschnitten von 2, 9 und 18 Monate (Mo) alten Mäusen. Hochauflösende Bilder sind durch nummerierte, eingerahmte Regionen gekennzeichnet. Maßstab 200 μm . (B) Die Quantifizierung von S100 β + und GFAP+/S100 β + Zellen in den drei untersuchten Altersklassen zeigt eine signifikante Zunahme der GFAP+ Zellen, wobei die S100 β + Zellzahl unverändert bleibt. Die Ergebnisse der Quantifizierung werden als Durchschnitt \pm Standardabweichung von $n \geq 3$ unabhängigen Versuchen gezeigt. Die Prüfung auf signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen erfolgte mittels eines zweiseitigen ungepaarten Student-t-Tests. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ oder *** $p < 0,001$. (C) Die Doppelfärbung von S100 β und GFAP zeigt die Zunahme und morphologische Veränderungen von GFAP+ Zellen, vor allem in den oberen Schichten der Hirnrinde. Hochauflösende Bilder sind durch nummerierte, eingerahmte Regionen gekennzeichnet und zeigen morphologische Veränderungen zunehmenden Alters. Maßstab 75 μm , in den hochauflösenden Bildern 20 μm . Modifiziert nach [117].

Um die mit dem Alter zunehmende proliferative Kapazität GFAP-positiver hypertropher Astrozyten zu untersuchen, wurde den Mäusen aller Altersgruppen 5 Tage lang BrdU über das Trinkwasser verabreicht. BrdU ist ein synthetisches Nukleosid-Analogon, das während der S-Phase des Zellzyklus anstelle von Thymidin eingebaut wird und somit neu-synthetisiertes

DNA markiert. Mit spezifischen monoklonalen Antikörpern kann BrdU visualisiert werden und wird deshalb für die Markierung proliferierender Zellen eingesetzt [120, 121]. In der grauen Substanz junger Mäuse fanden sich vereinzelte BrdU+ Astrozyten [91, 122], in hohem Alter sind aber praktisch keine Astrozyten mehr mit proliferativer Aktivität zu sehen ($1,0 \pm 0,2$ und

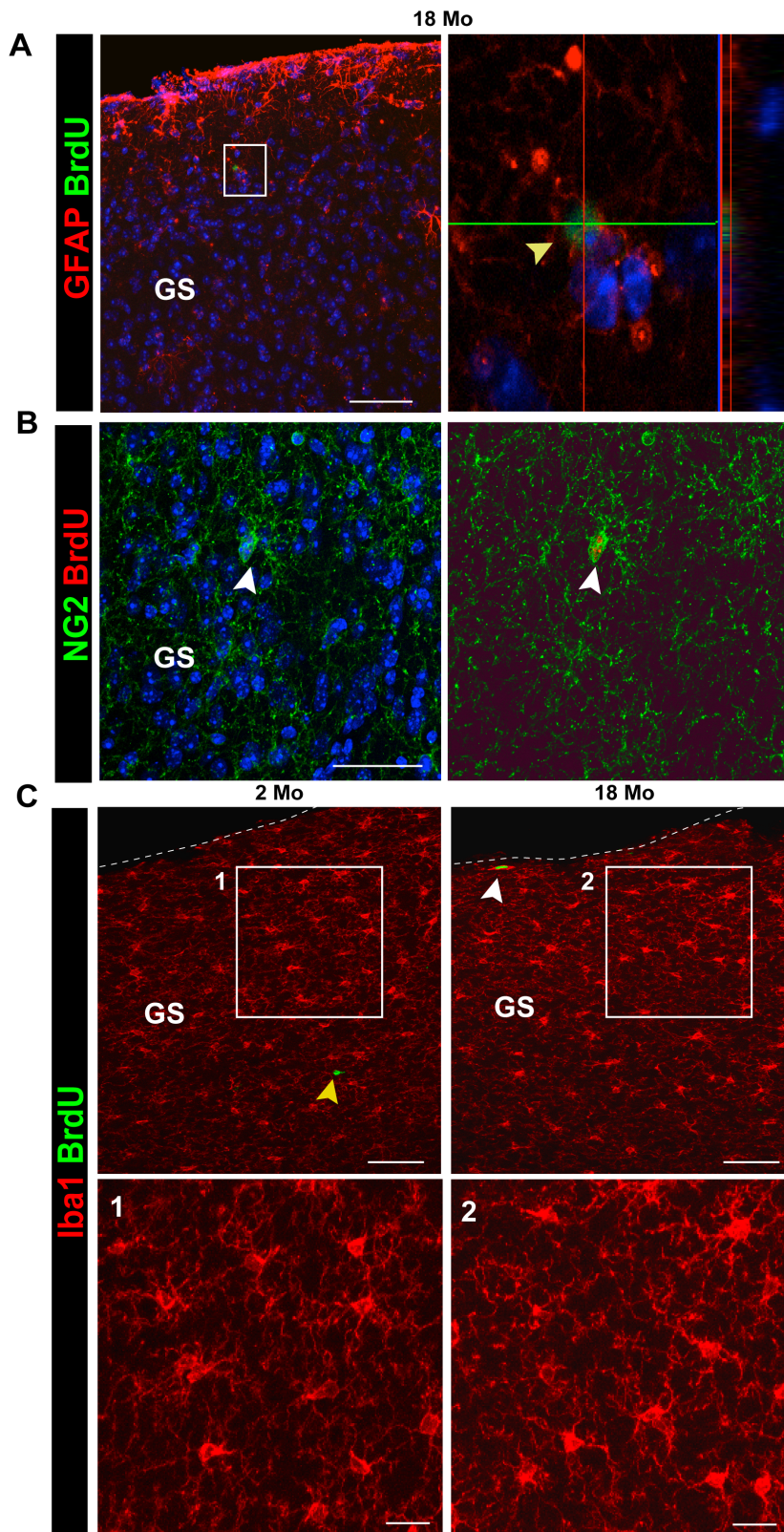


Abbildung 10. Altersbedingte Veränderung glialer Zellen in der kortikalen grauen Substanz (GS).

(A) Im Kortex von 18 Monate alten Mäusen finden sich keine GFAP+BrdU+ Zellen (markiertes Areal rechts vorgehoben zeigt BrdU-Positivität einer Zelle an einen GFAP+ Astrozyten angrenzend, aber nicht im Astrozyten). Maßstab 75 µm. (B) NG2+ Gliazellen in 18 Monate alten Mäusen sind vereinzelt BrdU-positiv, zeigen aber keine veränderte Morphologie. Maßstab 20 µm. (C) Iba1+ Mikroglia zeigen in 18 Monaten alten Mäusen im Vergleich zu 2 Monate alten Mäusen keine erhöhte BrdU-Positivität oder signifikante Hypertrophie. Maßstab 100 µm, in hochauflösenden Bildern 20 µm. Modifiziert nach [117].

0 GFAP+BrdU+ positive Zellen/mm² graue Substanz in jungen und alten nichtlädierten Hirnen, Abb. 10 A). Gleichzeitig nahm auch die proliferative Aktivität nicht-astroglialer Zellen, wie Iba1+ Mikroglia oder NG2+ Glia, ab (s. Abb. 10B, 10C). Diese initiale Analyse zeigte, dass während des physiologischen Alterungsprozesses ca. ein Drittel der parenchymalen Astrozyten in der somatosensorischen grauen Substanz einen veränderten morphologischen Phänotypen erwerben, der auf eine Aktivierung, jedoch nicht auf eine proliferative Aktivität der Astroglia hindeutet.

5.2. Altersbedingte Veränderungen in der Reaktion astroglialer Zellen auf invasive Schädigung der somatosensorischen grauen Substanz

Ausgehend von Befunden im intakten zerebralen Kortex scheinen Astrozyten in der somatosensorischen Hirnrinde mit dem Alterungsprozess einen zunehmend ‚aktivierten‘ Status zu erwerben. Somit stellte sich die Frage nach den altersbedingten Veränderungen in der Aktivierung astroglialer Zellen im Kontext einer traumatischen Verletzung in der grauen Substanz. Kann eine invasive Verletzung in jeder Altersgruppe eine heterogene astrogliale Reaktion auslösen? Wie erwartet zeigte sich bereits während der akuten Phase nach traumatischer Verletzung eine ausgeprägte reaktive Astrogliose – die evolutionär konservierte natürliche Reaktion astroglialer Zellen auf pathophysiologische Veränderungen im ZNS [53, 59, 123], die durch Hypertrophie der Astrozyten, eine signifikante Hochregulation von GFAP, sowie eine Polarisation der astrozytären Ausläufer in Richtung der Wunde gekennzeichnet ist (Abb. 11A). Um die mit Altern assoziierten morphologischen Unterschiede in reaktiven Astrozyten festzustellen, wurde eine morphometrische Analyse des lädierten Gewebes mittels immunhistochemischer Detektion von GFAP und Aldh1l1 durchgeführt. Es zeigte sich eine, in Relation zu der Entfernung von der Läsionsstelle, variable Ausprägung reaktiver Veränderungen sowohl in jungen als auch in alten Tieren. Allerdings fanden sich eindeutige Unterschiede zwischen den Altersgruppen. So zeigten Astrozyten in der Nähe der Läsion (<300 µm entfernt) bei alten Tieren eine schwächere GFAP-Immunreaktivität und eine reduziertere Komplexität astroglialer Zellprozesse als bei jüngeren Tieren. Mit zunehmender Entfernung von der Wunde nahmen Astrozyten wieder den physiologischen

Phänotypen auf, mit der für protoplasmische Astrozyten typischen buschartigen Morphologie und immunhistochemisch nicht nachweisbarem Level von GFAP.

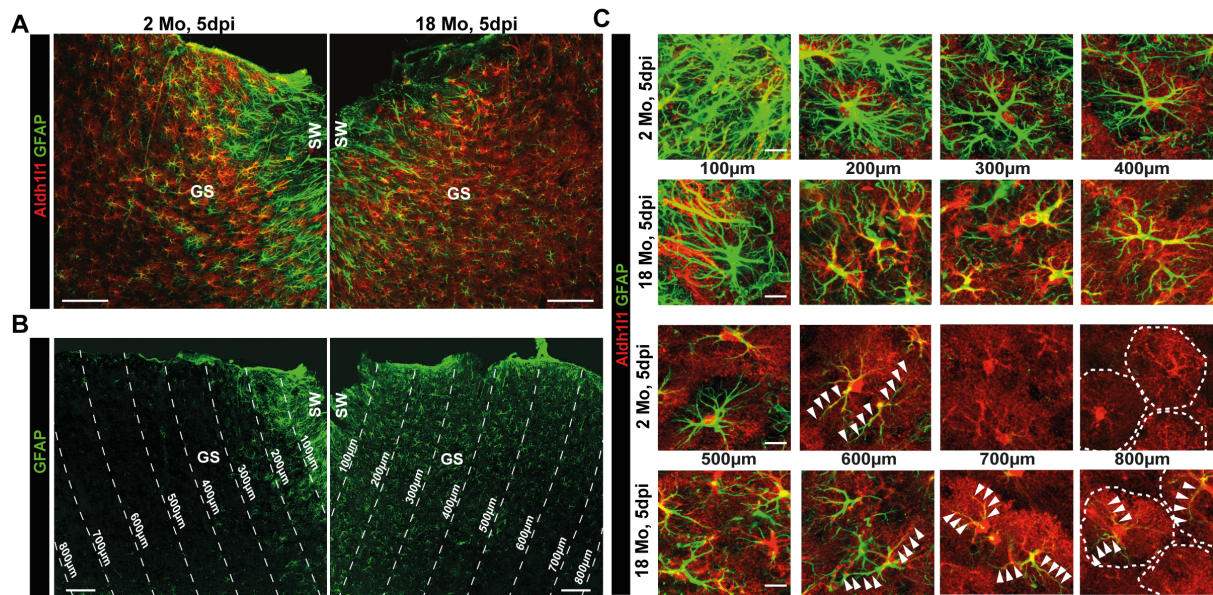


Abbildung 11 Altersbedingte Veränderungen der astroglialen Zellpopulation in der geschädigten somatosensorischen grauen Substanz (Teil 1) (A) Die Stichverletzung in der somatosensorischen Hirnrinde löst eine vermehrte GFAP-Expression der umliegenden Astrozyten aus. Färbung von GFAP und Aldh1l1 5 Tage nach Verletzung (5 days post-intervention (dpi)). Maßstab 100 μm . (B) Ein repräsentativer Überblick zeigt die Verteilung von GFAP+ Astrozyten in der Verletzungsumgebung junger und alter Mäuse 5 Tage nach Intervention. In alten Mäusen ist die Ausweitung der Reaktion ist größer als in jungen Mäusen; die Dichte der GFAP+ Zellen aber niedriger. Maßstab 100 μm . (C) Die Bilderreihe zeigt Astrozyten in zunehmender Entfernung von der Stichverletzung bei jungen und alten Tieren. Die reaktive Morphologie der Astrozyten in der Nähe der Verletzung ist in alten Tieren weniger ausgeprägt, wobei sie auch bei größerer Entfernung noch GFAP-positive Zellausläufer entwickeln (weiße Pfeile). Maßstab 15 μm . Modifiziert nach [117].

Es zeigte sich aber altersbedingt ein vergrößertes Areal von GFAP+ Astrozyten ($712 \pm 64\mu\text{m}$ und $545 \pm 56\mu\text{m}$ in 18 Monate alten und 2 Monate alten Tieren; $p = 0,011$). Dabei waren in diesem Areal, insbesondere in alten Tieren, weniger bis keine morphologischen Veränderungen der GFAP+ Astrozyten und deren Ausläufern mehr zu sehen (Abb. 11B, 11C). Nun zeigte sich trotz einer größeren Ausbreitung der reaktiven Astroglie in alten Mäusen eine niedrigere Dichte von reaktiven Astrozyten in der Nähe der Wunde im Vergleich zu jungen Tieren (Abb. 11B, 11C, 12B).

Dabei zeigte sich in jungen jedoch nicht in alten Mäusen bereits 5 Tage nach Verletzung eine über 80% wiederhergestellte astrogliale Population (vergleiche Abb. 8B mit 10D). Dies war der erste Hinweis auf eine massiv beeinträchtigte post-traumatische Regeneration

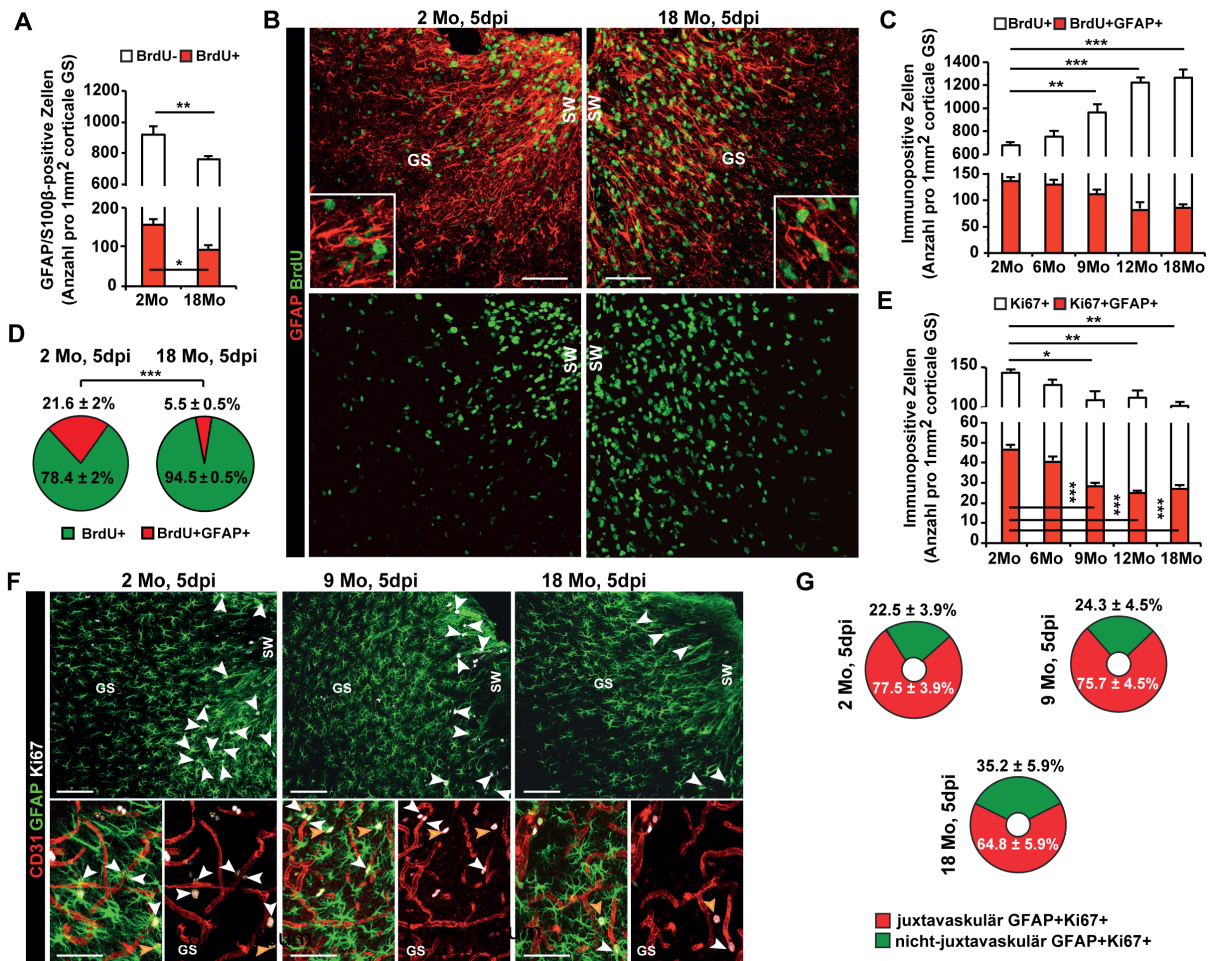


Abbildung 12. Altersbedingte Veränderungen der astroglialen Zellpopulation in der geschädigten somatosensorischen grauen Substanz (Teil 2) (A) GFAP+ und GFAP+/BrdU+ Zellzahlen in der Nähe der Stichverletzung (bis 300 μ m) nehmen in alten Tieren 5 Tage nach Intervention ab. (B) Die Färbungen zeigen eine altersbedingte Zunahme der BrdU+ Zellen aber eine Abnahme der GFAP+BrdU+ reaktiven Astrozyten. Maßstab 100 μ m. (C) Die Diagramme zeigen die Abnahme des proliferierenden Astrozytenpools mit der Zunahme aller proliferierenden Zellen in der Verletzungsumgebung. (D) Die Kuchendiagramme zeigen die relative Abnahme der GFAP+ Zellen im BrdU+ Zellpool. (E) Die Diagramme zeigen die altersbedingte Abnahme der Ki67+ und der GFAP+Ki67+ Zellen in der Verletzungsumgebung. Die Quantifizierung erfolgte in $n \geq 3$ unabhängigen Versuchen. Die Prüfung auf signifikante Unterschiede zwischen zwei Gruppen erfolgte mittels eines zweiseitigen ungepaarten Student-t-Tests; bei mehreren Datensätzen mittels eines einfachen ANOVA-Tests. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ oder *** $p < 0,001$. (F) Die meisten GFAP+Ki67+ Zellen (weiße Pfeile) waren in Blutgefäßnähe (CD31+) zu finden. Maßstab 75 μ m. (G) Die juxtavaskuläre Assoziation der proliferierenden Astrozyten scheint sich mit dem Alter nicht zu verändern. Modifiziert nach [117].

astroglialer Zellen in der Verletzungsumgebung in älteren Mäusen. Da die Zellproliferation der einzige Weg ist, um untergangene Astrozyten im post-traumatischen kortikalen Parenchym zu ersetzen [88], bestand das nächste Ziel in der Bestimmung der astroglialen Proliferation in der periläsionalen Zone von jungen bzw. alten Tieren. Hierfür wurde den verletzten Mäusen BrdU im Trinkwasser ab zwei Stunden nach der Intervention für insgesamt fünf Tage verabreicht.

Wie erwartet, war die Population BrdU-markierter Astrozyten in der Verletzungsumgebung bei alten Tieren im Vergleich zu jungen Mäusen um 40 % reduziert (Abb. 12A, 12B). Interessanterweise proliferierten in der Umgebung der Verletzung bei den alten Tieren insgesamt aber fast doppelt so viele Zellen, was vor allem durch die deutlich ausgeprägte mitotische Aktivität mikroglialer Zellen in den alten Tieren zu erklären ist ($60.0 \pm 1.9\%$ und $77.5 \pm 2.1\%$ BrdU+Iba1+ Zellen unter allen BrdU+ Zellen in der Wunde von juvenilen und alten Tieren, $p=0,0003$). Im Gegensatz dazu war die Proliferation von Astrozyten und NG2-Glia in alten im Vergleich zu jungen Tieren signifikant reduziert ($20,1 \pm 1,9\%$ und $8,8 \pm 1,4\%$ BrdU+NG2+ Zellen sowie $21,6 \pm 2\%$ und $5,5 \pm 0,5\%$ BrdU+GFAP+ Zellen unter allen BrdU+ Zellen in der Wunde von juvenilen und alten Tieren, $p=0,0001$) (Abb. 12D).

Reaktive Astrozyten im post-traumatischen Kortex zeigen während der ersten Tage nach Verletzung eine hohe proliferative Aktivität und erreichen deren Maximum am fünften Tag nach der Verletzung [91, 114, 118, 124]. Daher wurde die Teilungsaktivität am fünften Tag nach der Verletzung mittels Ki-67, einem Marker des aktiven Zellzyklus, untersucht. Es zeigte sich eine mit dem Alter abnehmende proliferative Aktivität aller Zellgruppen mit einem Unterschied von etwa 30% zwischen jungen und alten Mäusen; bei den Astrozyten lag dieser Unterschied bei etwa 40% (Abb. 12E). Interessanterweise war die juxtavaskuläre Assoziation der Proliferation vom Alter nicht beeinflusst (Abb. 12F, 12G).

5.3. Die Aktivierung des Sonic Hedgehog Signalweges bewirkt keine Steigerung der Proliferation von reaktiven Astrozyten in alten Mäusen

Ausgehend von den oben dargestellten Ergebnissen lag eines der Ziele der vorliegenden Dissertation in der genauen Analyse der altersbedingten Abnahme der proliferativen Kapazität. Um festzustellen, ob und inwiefern eine Aktivierung des SHH-Signalweges die

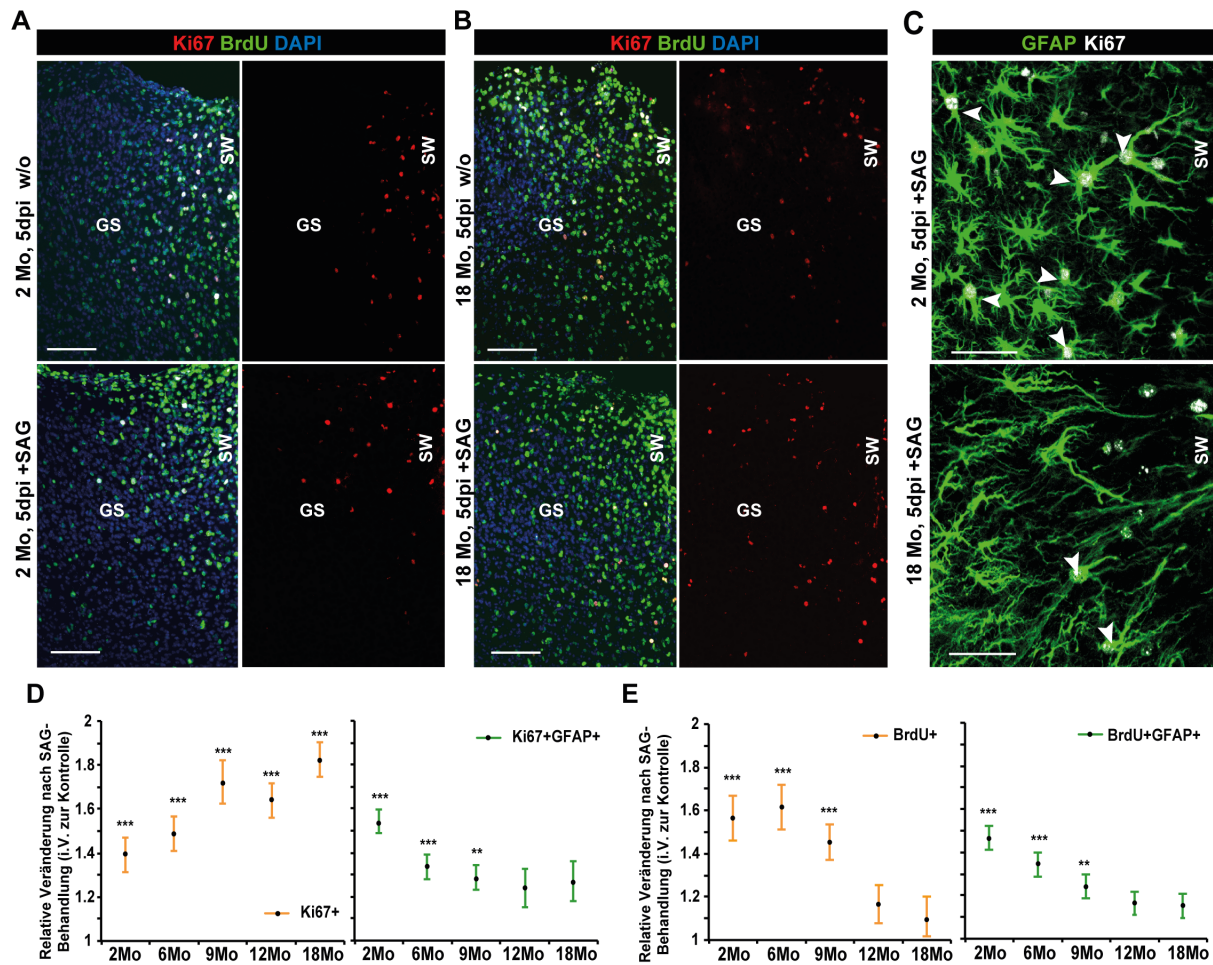


Abbildung 13. Proliferationsanalyse der somatosensorischen grauen Substanz nach Aktivierung des SHH-Signalweges (A,B) Die Färbungen zeigen eine Zunahme der Ki67+ und BrdU+ Zellen nach *in vivo*-Aktivierung des SHH-Signalweges mittels SAG sowohl in jungen als auch in alten Tieren. Maßstab 75 μm. (C) *In vivo*-Aktivierung des SHH-Signalweges führt zu einer ausgeprägteren astrozytären Hypertrophie und Proliferation nach einer Verletzung in jungen Mäusen im Vergleich zu alten Mäusen. Maßstab 100 μm. (D) Das Diagramm zeigt eine altersbedingte Zunahme der Rekrutierung Ki67+ Zellen nach *in vivo* SAG-Zugabe, aber eine Abnahme dieses proliferationsfördernden Effektes bei GFAP+ Zellen mit höherem Alter (erkennbar an der abnehmenden relativen Veränderung Ki67+GFAP+ Zellen bei SAG-behandelten Tieren i.v. zu Kontrolltieren). (E) Das Diagramm zeigt eine Zunahme von BrdU+ Zellen nach *in vivo*-Aktivierung des SHH-Signalweges durch SAG-Applikation in Mäusen jungen und mittleren Alters und die stetige altersbedingte Abnahme des fördernden Effektes von SAG auf GFAP+BrdU+ Zellen. Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt. Die Datenpunkte mit farbigen Fehlerbalken signalisieren die relative Zahl einfach (orange) sowie zweifach (grün) positiver Zellen von SAG-behandelten Tieren im Vergleich zu Kontrolltieren (jeweils n≥3 Tiere pro Gruppe pro Zeitpunkt). Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mittels zweiseitigem ungepaartem Student-t-Test oder zwischen mehreren Datensätzen mittels einfachen ANOVA-Tests ermittelt und mit * p < 0,05, ** p < 0,01 oder *** p < 0,001 markiert. Modifiziert nach [117].

proliferative Aktivität reaktiver Astrozyten modulieren kann, wurde operierten Mäusen systemisch SAG appliziert. Durch die Aktivierung des SHH-Signalweges nach der Stichverletzung erhöhte sich in allen Altersklassen die Anzahl der Ki67+ und BrdU+ Zellen in der periläsionalen Zone signifikant (Abb. 13). Allerdings konnte diese Zunahme an Proliferation nicht bei den reaktiven Astrozyten beobachtet werden, da der Pool von GFAP+Ki67+ Zellen keine signifikante altersbedingte Zunahme zeigte ($28,9 \pm 1,7$ und $35,3 \pm 2,2$ doppelt-positive Zellen/mm² Wunde ohne bzw. mit Zugabe von SAG bei 18 Monate alten Mäusen, $p=0,19$). In jungen Mäusen waren $39,2 \pm 1,7\%$ der Ki67+ Zellen auch GFAP+, bei alten nur $20,1 \pm 1,5\%$; bei BrdU-Markierung fanden sich insgesamt ca. 30% weniger GFAP+BrdU+ Zellen in älteren Wunden ($217,9 \pm 15,9$ und $156,1 \pm 12,9$ GFAP+BrdU+ positive Zellen/mm² Wunde in jungen und alten lädierten Hirnen); der Anteil von reaktiven Astrozyten am proliferativen Pool lag in jungen Tieren bei $20,6 \pm 1,9\%$, in alten Tieren bei nur $10,5 \pm 0,9\%$ (GFAP+BrdU+ aller BrdU+ Zellen in der Wunde).

5.4. Etablierung primärer adhärenter Zellkulturbedingungen für die Langzeit-Beobachtung adulter kortikaler Zellen *in vitro*

Um die Teilungsaktivität isolierter Astrozyten genauer untersuchen zu können, wurden zuerst zwei Zellselektionsmethoden getestet. In einer ersten Versuchsreihe wurden GFAP-RFP+/Geminin-AzG+ doppelt-positive Zellen mittels FACS isoliert und als einzelne Zellen unter proliferativen Bedingungen in Terasaki-Wells ausplattiert. Allerdings eignete sich diese Methode nicht für die Erhaltung adulter kortikaler Zellen *in vitro*, da bereits nach 48 Stunden keine vitalen Zellen mehr nachweisbar waren.

In einem zweiten Versuch wurden Astrozyten durch Immunopanning mit dem membranständigen GLT-1 angereichert und ausplattiert. Auch hier waren nach zwei Tagen keine lebenden reaktiven Astrozyten mehr nachweisbar. Da isolierte reaktive Astrozyten in beiden getesteten Ansätzen nicht in einer Kultur überlebten, ging ich entweder von einem Mangel an interzellulärem Kontakt der Astrozyten mit anderen (Glia-)Zellen oder von einem zu ‚aggressiven‘ Zellselektionsverfahren aus. Vor allem weil adulte reaktive Astrozyten auch bei einer sehr geringen Zelldichte (1 Zelle/5µl) üblicherweise zur raschen Expansion und Neurosphärenbildung in Zellkultur neigen [91], scheint eher letzteres die Hauptursache zu sein. Da beide Zellisoliationsverfahren in einem erheblichen Zellverlust resultierten, erschien

eine adhärenzte 2D-Zellkultur für akut-dissoziierte adulte reaktive Gliazellen [114] als das bestgeeignete Zellkultursystem zum Studium der zellbiologischen Veränderungen in Astrozyten während des Alterungsprozesses. Nach einer Serie von Vorversuchen unter Anwendung verschiedener Zellkulturmedien und Etablierung der bestgeeigneten Ausplattierungszelldichte konnte ich dieses modifizierte Zellkulturparadigma für Langzeitanalysen anwenden. In dieser Zellkultur konnten keine Neuronen identifiziert werden; insgesamt zwei Drittel der Zellen waren Astrozyten und Mikroglia und nur ca. 5% der Zellen Oligodendroglia. Die Zusammensetzung der Zellkulturen zeigte keine signifikante Veränderung mit dem Alter der Mäuse ($35,3 \pm 1,9\%$ und $30,9 \pm 2,5\%$ GFAP+ Zellen, $p=0,177$ sowie $40,2 \pm 2,2\%$ und $43,8 \pm 2,0\%$ Iba1+ Zellen, $p=0,221$ bei jungen und alten Tieren). In dieser Umgebung konnte eine hohe Überlebensrate von Astrozyten erreicht werden, und nach acht Tagen zeigten sich unter diesen Kulturbedingungen voneinander unabhängige Kolonien von GFAP-positiven Astrozyten, was auf eine Expansion einzelner Zellen hindeutete. Um sicher nachvollziehen zu können, ob diese Kolonien durch die Vermehrung einzelner reaktiven Astrozyten oder durch ein Adhärenzieren von mehreren Astrozyten entstanden sind, wurde das Verhalten von Astrozyten in diesen Zellkulturen mittels einer engmaschigen Time-Lapse-Videomikroskopie analysiert.

5.5. Die altersbedingten Veränderungen im Zellteilungsmodus von proliferativen reaktiven Astrozyten

Mithilfe von Time-Lapse-Aufnahmen ist es mir gelungen, einzelne reaktive Astrozyten in einer 2D-Zellkultur sicher zu verfolgen, deren Zellteilungen zu dokumentieren und die entstandene Zellkolonie zu charakterisieren (Abb. 14A, 14B, 14C). Da es unter diesen Zellkulturbedingungen zu einer signifikanten Expansion auch von anderen Zelltypen kam, war die zeitliche Begrenzung der Experimente von einer Überwucherung der Zellen gegeben. Nach acht Tagen war die Zelldichte so hoch, dass die einzelnen Zellen einander überlagerten, was eine genaue Verfolgung einzelner Zellen erschwerte. Um eine hohe Anzahl der Tochterzellen von reaktiven Astrozyten verfolgen und am Ende immunozytochemisch untersuchen zu können, wurden die Zellen deshalb bis zu acht Tage nach dem Ausplattieren kultiviert.

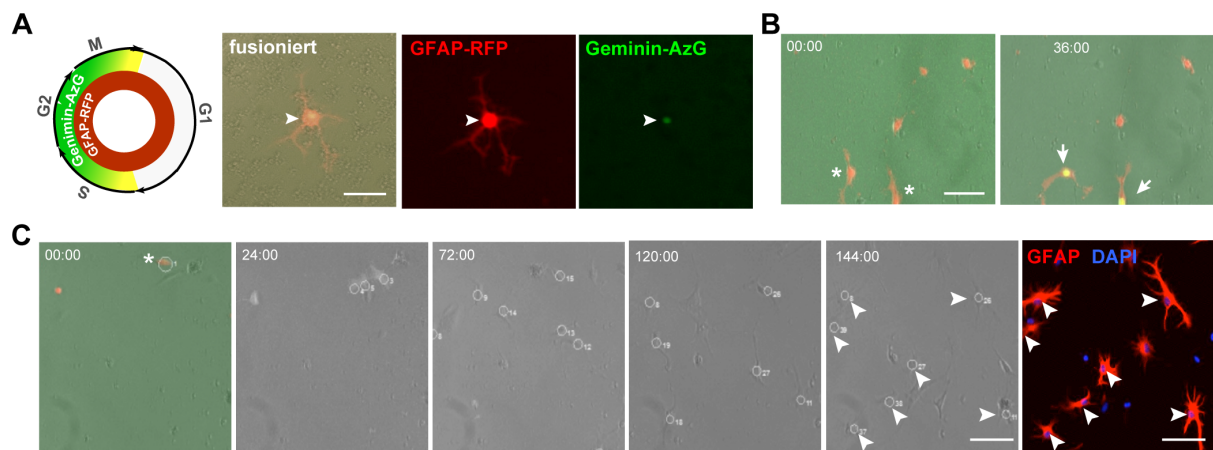


Abbildung 14. Time-Lapse-Videomikroskopie und Stammbaumanalyse von kortikalen Zellkulturen (Teil 1) (A) Das Schema zeigt die Expression der fluoreszenten Protein-Kopplungen Azami-Green(AzG)-Geminin (grüne Farbe) und GFAP-RFP+ (rote Farbe) im Laufe des Zellzyklus. Die Bilderreihe zeigt eine doppel-positive Zelle *in vitro*. Maßstab 20 μ m. (B) Proliferierende GFAP+ Zellen (*) waren durch die Expression vom Geminin-AzG (\rightarrow) von Zellteilungs-inaktiven Zellen unterscheidbar. Maßstab 20 μ m. Zeitpunktmarkierung links oben Stunde:Minute nach Aufnahmebeginn. (C) Durch eine Verfolgung der Zellen auf Hellfeld-Bildern konnte die Entstehung einer Zellkolonie nachvollzogen werden. Die immunozytochemische Analyse zeigte durchgehend GFAP+ Tochterzellen (weiße Pfeile). Maßstab 20 μ m. Zeitpunktmarkierung links oben Stunde:Minute nach Aufnahmebeginn. Modifiziert nach [117].

Die entstandenen Kolonien wurden immunozytochemisch untersucht. Dabei zeigte sich, dass es sich um rein GFAP-positive Zellen handelte (Abb. 14C), die stets negativ für β III-Tubulin (neuronaler Marker) oder O4 (Oligodendrozyten-Marker) waren. Somit ließ sich feststellen, dass reaktive Astrozyten in der Lage sind, zu expandieren, jedoch keine neuronalen Zellen hervorbringen können und somit kein De-Differenzierungspotential in andere neuroektodermale Zellarten besitzen.

Um altersbedingte Veränderungen im Proliferationsverhalten der reaktiven Astrozyten zu verstehen, habe ich Stammbaumanalysen mithilfe der Time-Lapse Videoaufnahmen durchgeführt. Mit Hellfeld-Aufnahmen alle 5 Minuten und Fluorochrom-Bildern alle 450 Minuten konnte ich einzelne reaktive Astrozyten zuverlässig nachverfolgen und durch die Erstellung von Stammbäumen deren proliferatives Verhalten analysieren (Abb. 15). Die Zellteilungsart einer Zelle wurde rekursiv über die mitotische Aktivität der Tochterzellen definiert. Wenn z.B. keine der Tochterzellen proliferierte, wurde die Teilung der Mutterzelle als nicht-proliferativ klassifiziert. Teilte sich ausschließlich eine der Tochterzellen, wurde die

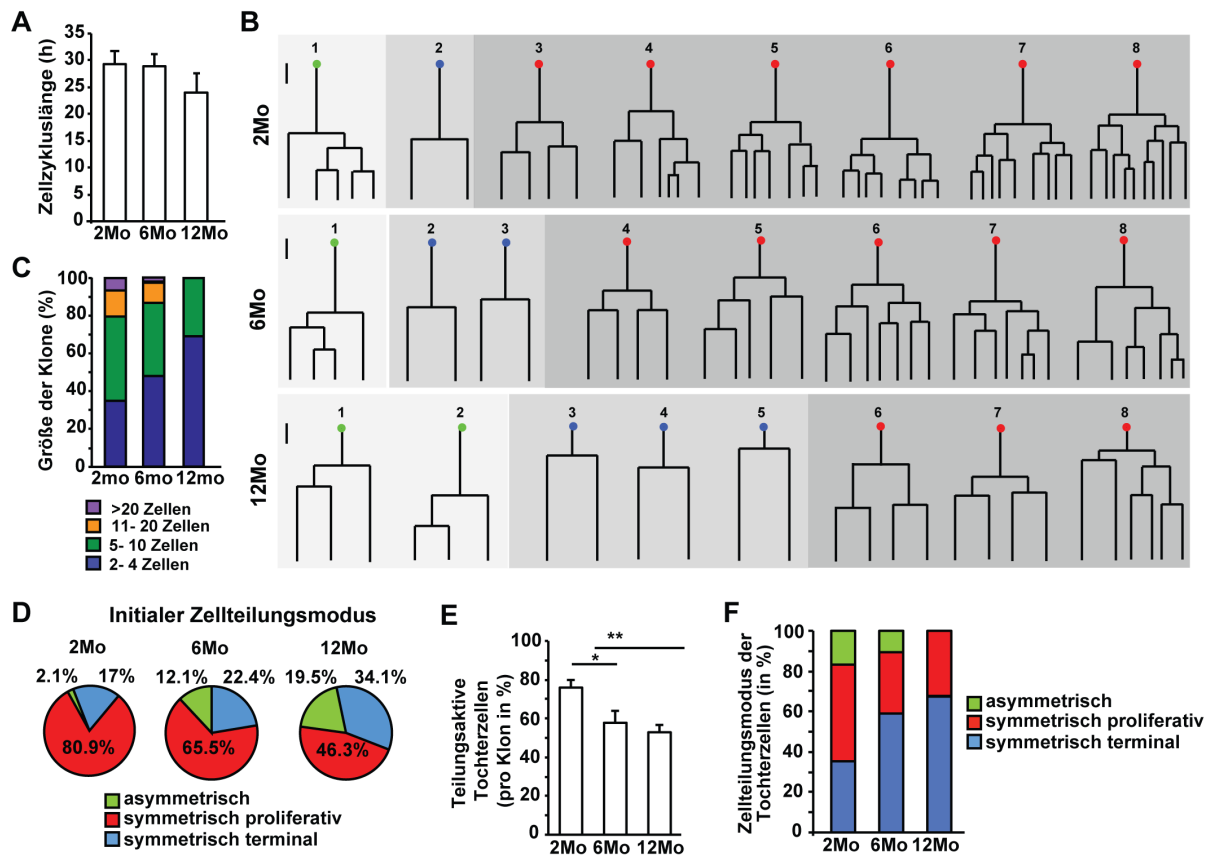


Abbildung 15. Time-Lapse-Videomikroskopie und Stammbaumanalyse von kortikalen Zellkulturen (Teil 2) (A)

Das Diagramm zeigt die Länge des Zellzyklus nach Verletzung in den drei Altersgruppen, die sich nicht verändert. (B) Beispiele von Stammbäumen einzelner GFAP-RFP+/Geminin-AzG+ Zellen zeigen, dass reaktive Astrozyten sich *in vitro* in jeder Altersgruppe symmetrisch-proliferativ (leicht-graue Verschattung), symmetrisch-terminal (mitteldunkelgraue Verschattung) und asymmetrisch-proliferativ (dunkelgraue Verschattung) teilen konnten. Maßstab 24 Stunden. (C) Die Größe von Zellkolonien GFAP-RFP+/Geminin-AzG+ Zellen zeigt eine altersbedingte Abnahme. (D) Tortendiagramme zeigen den initialen Zellteilungsmodus GFAP-RFP+/Geminin-AzG+ Zellen bei jungen, adulten und alten Tieren. (E) Die relative Anzahl der sich teilenden Tochterzellen nimmt mit zunehmendem Alter ab. (F) Die altersbedingte Veränderung der Zellteilungsmodi der Tochterzellen von GFAP-RFP+/Geminin-AzG+ Zellen zeigt, dass reaktive Astrozyten mit zunehmendem Alter die Fähigkeit zur Selbsterneuerung verlieren und mit zunehmendem Alter eine symmetrisch-terminale Zellteilung präferieren. Die Quantifizierung erfolgte in $n \geq 3$ unabhängigen Versuchen. Die Prüfung auf signifikante Unterschiede zwischen zwei Gruppen erfolgte mittels eines zweiseitigen ungepaarten Student-t-Tests; bei mehreren Datensätzen mittels eines einfachen ANOVA-Tests. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ oder *** $p < 0,001$. Modifiziert nach [117].

Teilung als asymmetrisch-proliferativ klassifiziert, und falls sich beide Tochterzellen teilten, wurde die Teilung als symmetrisch-proliferativ definiert. Junge reaktive Astrozyten teilten sich initial zu 81% symmetrisch-proliferativ, zu 17% terminal und zu 2% asymmetrisch-

proliferativ. Bei adulten und alten Zellen sind die korrespondierenden Werte 66% bzw. 46% symmetrisch proliferativ, 22% bzw. 34% terminal sowie 12% bzw. 20% asymmetrisch proliferativ (Abb. 15D). Auffällig war der Unterschied zwischen den durch Proliferation generierten Zellkolonien – reaktive Astrozyten aus jungen Tieren haben signifikant mehr und zudem auch größere Kolonien mit über 10 Zellen hervorbringen können (Abb. 15C). Die Frequenz sowie die Länge der Zellzyklen unterschieden sich nicht zwischen den Altersgruppen (Abb. 15A).

5.6. Veränderung der Proliferationsaktivität und des Zellteilungsprogramms in reaktiven Astrozyten durch *in vitro* Aktivierung des SHH-Signalweges

Um der Abnahme der proliferativen Kapazität mit dem Alter entgegenzuwirken, wurde eine Versuchsreihe durchgeführt, bei der durch Zugabe von SAG zum Kulturmedium der SHH-Signalweg *in vitro* aktiviert wurde (Abb. 16). Durch die Aktivierung dieses potenten Signalweges konnte eine verstärkte Expansion sowie eine Veränderung der Zellteilungsmodi

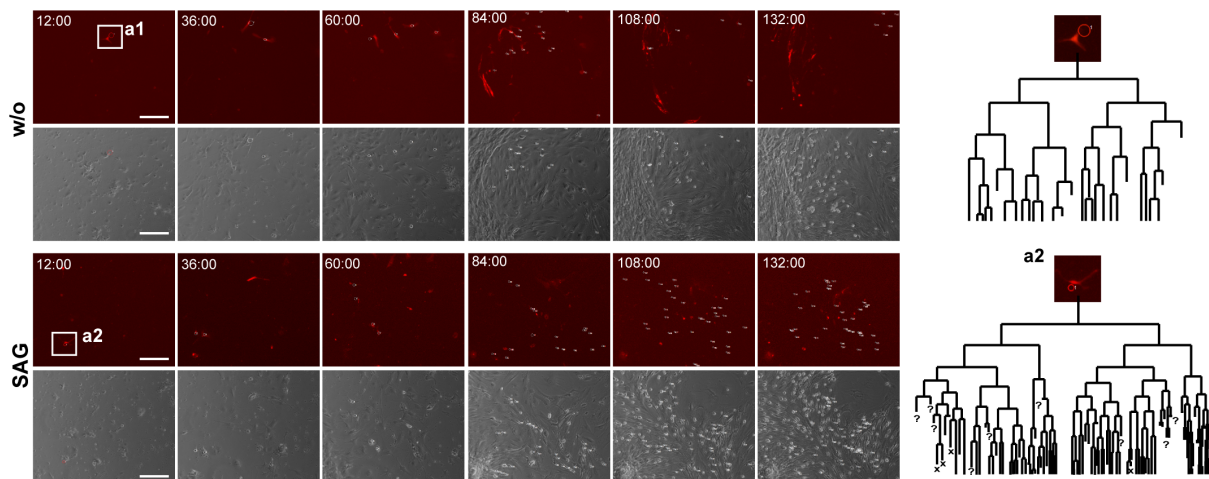


Abbildung 16 Veränderung der Proliferationsaktivität durch *in vitro* Aktivierung des SHH-Signalweges (Teil 1)

(A) Die Zellreihen zeigen Ausschnitte zu markierten Zeitpunkten (links oben Stunde:Minute nach Aufnahmebeginn) aus der Entstehung einer Zellkolonie aus einzelnen GFAP-RFP+/Geminin-AzG+ Zellen junger Tiere ohne oder mit *in vitro* Zugabe von SAG zur Förderung des SHH-Signalweges. Rote Bilderreihen zeigen RFP+ Zellen, schwarz-weiße die Hellfeld-Aufnahmen. Die oberen Bilderreihen zeigen Kontroll-Bedingungen, die unteren die Experimente nach Zugabe von SAG. Rechts daneben sind die Stammbäume der einzelnen Kolonien dargestellt, die eine Zunahme der proliferativen Aktivität innerhalb der Kolonie nach SAG-Zugabe zeigen. Maßstab 40 µm. Modifiziert nach [117].

Vergleich zu Zellen alter Mäuse mehr Zellklone (10,3% vs. 2,1%) mit mehr als 20 Zellen (Abb. 17D). Insgesamt steigerte sich auch der Anteil initial symmetrisch- bzw. asymmetrisch-proliferativer Zellteilungen bei jungen Zellen von 83% auf 88% bei Zugabe von SAG (mit einem Zuwachs der asymmetrischen Proliferation von 2% auf 18%), bei adulten und alten Zellen gab es keine signifikante Änderung (vgl. Abb. 15D und 17B). Alle Tochterzellen waren GFAP+, aber O4 und β III-Tubulin negativ.

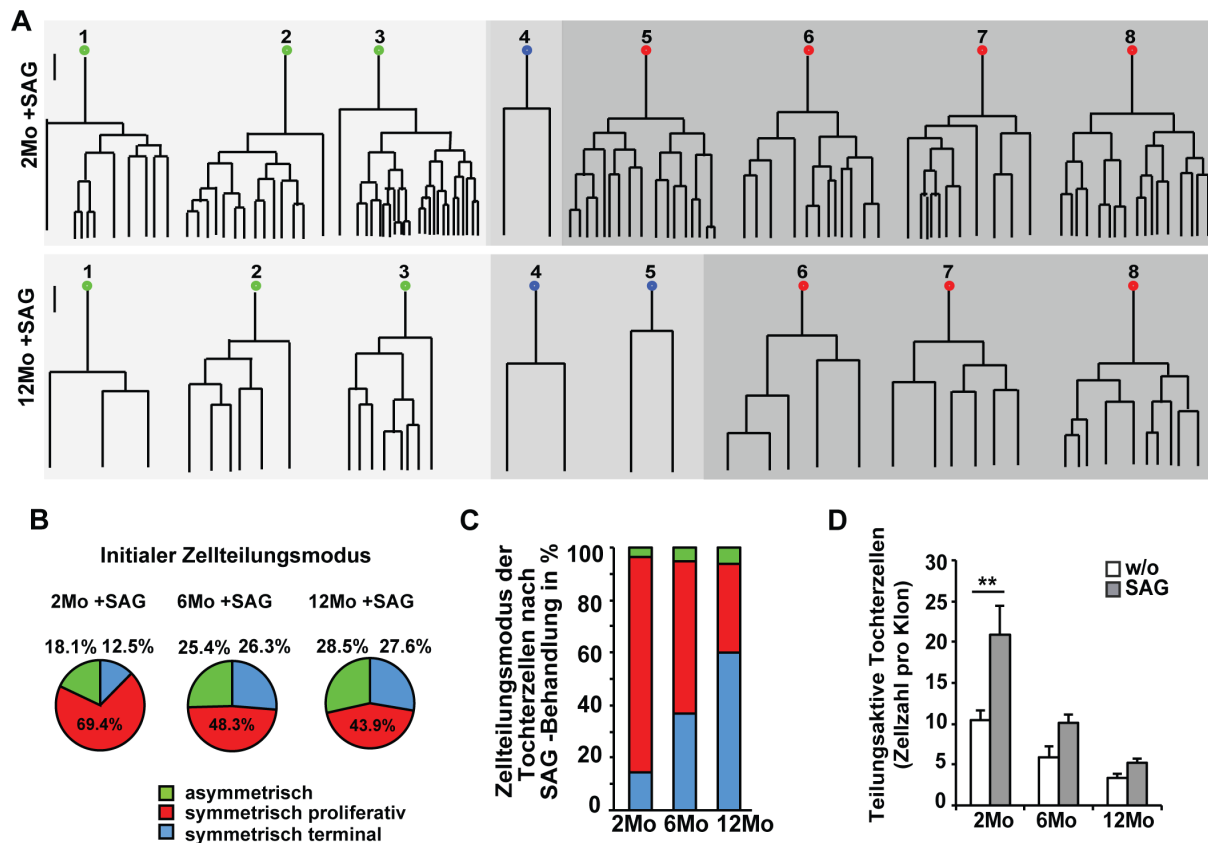


Abbildung 17 Veränderung der Proliferationsaktivität durch *in vitro* Aktivierung des SHH-Signalweges (Teil 2)

(A) Beispiele von Stammbäumen einzelner GFAP-RFP+/Geminin-AzG+ Zellen zeigen, dass sich reaktive Astrozyten *in vitro* nach Zugabe von SAG symmetrisch-proliferativ (leicht-graue Verschattung), symmetrisch-terminal (mitteldunkelgraue Verschattung) und asymmetrisch-proliferativ (dunkelgraue Verschattung) teilen konnten. (B) Die Tortendiagramme zeigen den initialen Zellteilungsmodus GFAP-RFP+/Geminin-AzG+ Zellen bei jungen, adulten und alten Tieren nach Zugabe von SAG. (C) Mit zunehmendem Alter nimmt der Effekt von SAG auf die Förderung der Zellteilungsaktivität ab. (D) Mit zunehmendem Alter nimmt der Effekt von SAG auf die Förderung von symmetrischer-proliferativer Zellteilung ab. Die Quantifizierung erfolgte in $n \geq 3$ unabhängigen Versuchen; dargestellt sind Die Prüfung auf signifikante Unterschiede zwischen zwei Gruppen erfolgte mittels eines zweiseitigen ungepaarten Student-t-Tests; bei mehreren Datensätzen mittels eines einfachen ANOVA-Tests. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ oder *** $p < 0,001$. Modifiziert nach [117].

6. Diskussion

Ziel meiner Doktorarbeit war es, ein besseres Verständnis der astroglialen Veränderungen infolge einer Gewebsverletzung im zerebralen Kortex zu erlangen sowie die Einflüsse des Alterns auf die astrogliale Reaktion in der post-traumatischen grauen Substanz (GS) zu untersuchen. Dies ermöglicht die Exploration einer vielversprechenden lokalen therapeutischen Option für die Wiederherstellung der zellulären Homöostase im zentralnervösen Gewebe nach akutem, fokalem Zelluntergang. Die Veränderungen am gesunden und verletzten zerebralen Kortex von jungen, erwachsenen und alten Mäusen habe ich sowohl *in vivo* als auch *in vitro* untersucht. Zur weiteren Einordnung der beobachteten altersbedingten Abnahme der Plastizität habe ich die Auswirkung einer Stimulation des SHH-Signalweges in allen durchgeführten Experimenten analysiert.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte ich erstmals zeigen, dass reaktive Astrozyten in der post-traumatischen somatosensorischen GS von älteren Tieren im Vergleich zu jungen Mäusen ein verändertes proliferatives Verhalten aufweisen und dass dies am ehesten auf intrinsischen Veränderungen von Astrozyten mit zunehmendem Alter des Organismus beruht. Diese intrinsischen Veränderungen führen zu einer Abnahme der astroglialer Zellen im verletzten Parenchym und darüber hinaus zu weiteren Folgeschäden, wie erhöhter Inflammation, verzögerter Rekonstruktion der Blut-Hirn-Schranke und ausgeprägter, langanhaltender reaktiver Gliose bei älteren post-traumatischen Tieren. Diese Erkenntnisse weisen darauf hin, dass eine therapeutische Nutzung reaktiver Astrozyten als endogene Quelle für post-traumatische Regeneration bei alten Tieren eine gezielte und effektive Modulation erfordert. Diese potenzielle Regeneration abgestorbener Zellen hätte eine enorme Relevanz vor allem bei traumatischen Hirnschäden und territorialen Hirninfarkten der am häufigsten betroffenen Region des ZNS, der somatosensorischen Hirnrinde.

6.1. Aktivierung astroglialer Zellen in der somatosensorischen Hirnrinde mit steigendem Alter

Veränderungen von Astrozyten während des physiologischen Alterungsprozesses wurden bisher in Mischkulturen aus der Großhirnrinde [70], dem Hippocampus [68], dem Cerebellum

[125] und dem Rückenmark [126] untersucht. Die meisten *in vivo* Untersuchungen beziehen sich auf die Expressions- und immunhistochemische Analyse astrozytärer Marker (GFAP, GS, S100 β) [68, 125, 127], und Transkriptomanalysen [70, 128, 129]. Aus diesen Studien ist ersichtlich, dass das Altern der Astrozyten eine ausgeprägte Heterogenität zeigt, sowohl morphologisch als auch transkriptionell. Hinsichtlich der Veränderung der homöostatischen Funktionen von alten Astrozyten ist allerdings bisher nur wenig bekannt. Diesbezüglich beschrieben sind eine Zunahme des mitochondrialen oxidativen Metabolismus [130], eine erniedrigte Glutamat-Clearance [131] und eine Abnahme der neuroprotektiven Kapazität [132]. Dabei ist zu beachten, dass für die *in vitro* Analysen von alternden Astrozyten größtenteils künstlich gealterte Zellen [71, 131, 132] oder unselektiert Zellen aus mehreren Regionen des ZNS verwendet wurden, was mit einer begrenzten Aussagekraft einhergeht.

In der vorliegenden Arbeit konnte ich zeigen, dass physiologisch alternde Astrozyten in der somatosensorischen grauen Substanz, vor allem in den oberen Schichten des Kortex, ab einem mittleren Alter der Tiere GFAP hochregulieren. Im Gegensatz zu z.B. Astrozyten des entorhinalen Kortex, eignen sie sich auch eine hypertrophe Morphologie an, was als Zeichen von zunehmender (Re-)Aktivierung gewertet werden kann. In zwei verschiedenen Arbeiten konnten in tieferen Hirnregionen Hinweise auf eine zunehmende proliferative Aktivität von Gliazellen nachgewiesen werden [133, 134], was allerdings in der somatosensorischen grauen Substanz nicht der Fall ist. Tatsächlich zeigen weder Astrozyten noch Mikroglia in dieser zerebralen Region eine erhöhte Teilungsaktivität. Diese Feststellung ist in Einklang mit den Ergebnissen einer genomweiten Expressionsanalyse in der Großhirnrinde von alten gesunden Ratten, wo sich eine hochregulierte Expression anti-proliferativer Gene gezeigt hatte [133], sowie mit neueren Transkriptionsanalysen, in denen in alten Tieren im Striatum und Hippocampus im Gegensatz zum Kortex deutlich mehr mit Reaktivierung assoziierte Gene hochreguliert waren [129]. In dieser Arbeit konnte keine veränderte Anzahl von parenchymalen Astrozyten in der somatosensorischen Hirnrinde mit zunehmendem Alter festgestellt werden, was auf ein streng kontrolliertes physiologisches Gleichgewicht innerhalb der kortikalen Zellpopulation während des Alterungsprozesses hinweist. Diese Beobachtungen liefern somit zusätzliche Hinweise für die strukturelle und funktionelle regional-spezifische Heterogenität astroglialer Zellen.

6.2. Adhärente 2D-Zellkultur als zuverlässige Methode für eine *in vitro* Analyse von reaktiven Astrozyten aus dem adulten post-traumatischen zerebralen Kortex

In dieser Arbeit konnte ich erstmals eine gemischte Zellkultur zur Untersuchung adulter Astrozyten etablieren und damit die hier durchgeführten Untersuchungen ermöglichen. Eine bisher häufig angewandte Methode zur Untersuchung von Astrozyten ist die immunhistochemische Färbung von GFAP. GFAP ist im Soma und in dickeren Ausläufern von Astrozyten zu finden eine immunhistochemische Darstellung dieses Markers ermöglicht aber eine Darstellung von nur ungefähr 15% des Volumens einzelner ausgereiften Astrozyten [135]. Die Färbung nach GFAP zeigt somit nicht die Architektur bzw. das Ausmaß der feinen Prozesse, mit denen eine Zelle über Tausende von Zellkontakten zu Nachbarzellen in das umliegende Gewebe eingebettet ist [78]. Die pathophysiologische Astrozytenreaktivierung führt zu einer Hochregulation der GFAP-Expression sowie zu einer hypertrophen Morphologie und einer Zunahme der Vernetzung zwischen benachbarten Astrozyten [59]. Allerdings werden bei einer Lyse von entnommenem Gewebe die Zell-Zell-Kontakte sowohl enzymatisch als auch mechanisch zerstört. Geht man davon aus, dass ein reifer parenchymaler Astrozyt mehr als 10.000 Zell-Zell-Verbindungen aufweisen kann [33, 59], liegt die Annahme nahe, dass eine solch komplexe Morphologie eher zerstört werden kann, als die eines morphologisch weniger komplexen embryonalen oder postnatalen Astrozyten. Obwohl sich bei der hier durchgeführten Zellkulturmethode eine Zelldichte von $1-1,25 \times 10^3/\text{mm}^2$ maximal effektiv ergab, haben schätzungsweise nur 1-2% der Astrozyten überlebt, und das ohne signifikanten altersabhängigen Unterschied.

Zweifellohne lassen sich an isolierten Zellen die intrinsischen Veränderungen präziser untersuchen und zelluläre Signalwege zelltypspezifisch modulieren. An dieser Stelle ist aber auch zu erwähnen, dass, obwohl für beide Methoden – Immunopanning und FACS – eine Reihe von Isolierungsprotokollen für neurale Zellen existiert [136-138], solche Isolierungsmethoden für embryonale und postnatale Astrozyten [139, 140], nicht aber für adulte reaktive Astrozyten geeignet sind. Somit ist zurzeit noch keine effektive und reproduzierbare Methode zur langfristigen Kultivierung von selektiv angereicherten adulten reaktiven Astrozyten etabliert.

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals eine Zellkulturmethode für adulte reaktive Gliazellen etabliert, was in Kombination mit der hohen zeitlichen und räumlichen Auflösung der Time-Lapse-Videomikroskopie die Verfolgung einzelner Astrozyten (und auch Mikroglia) erlaubte. Inwieweit sekundäre Effekte über z.B. Mikroglia-Astrozyten-Kontakte eine Rolle bei der Proliferation von Astrozyten spielen, lässt sich durch diese Methode aber nicht weiter eingrenzen.

6.3. Reaktive parenchymale Astrozyten weisen ein den neuronalen Stammzellen ähnliches Zellteilungsverhalten auf

Eine *in vivo* Untersuchung von Zellteilungen ist technisch bedingt sehr schwierig und wenig ergiebig. Durch Zwei-Photonen-Mikroskopie lassen sich die oberflächlichen 500 µm der Hirnrinde untersuchen, die zeitliche Auflösung ist allerdings bei Aufnahmen in Abständen von je ein bis zwei Tagen eingeschränkt; Zellbewegung und -teilung lassen sich kaum bis gar nicht nachverfolgen [88].

Für die *in vitro* Bestimmung einer Stammzellkapazität reaktiver Astrozyten ist der Neurosphären-Assay die "Goldstandard"-Methode [91]. Diese Methode lässt aber weder eine genaue Beobachtung der Zellteilungen noch eine genaue Zuordnung der generierten Vorläuferzellen zur Mutterzelle zu, wodurch die Entstehung dieser Zellklonen nicht rekonstruierbar ist. Eine adhärente 2D-Zellkultur lässt eine Verfolgung der Einzelzellen mit hoher zeitlicher Auflösung (Bilder in Abständen von je 5 Minuten) und räumlicher Genauigkeit zu. Somit ist jede einzelne Zellteilung aufgrund der Erstellung von Stammbäumen mit weiterführender Analyse der Zellteilungsmodi genau nachvollziehbar. Mithilfe der Stammbaumanalysen ist es mir im Rahmen dieser Arbeit tatsächlich gelungen, die asymmetrische Zellteilung – ein Hauptmerkmal von neuronalen Stammzellen – von proliferierenden parenchymalen reaktiven Astrozyten festzustellen. Es stellte sich allerdings heraus, dass die altersbedingte Veränderung des Zellteilungsprogramms in reaktiven Astrozyten zunehmend häufiger mit einer terminalen Zellteilung assoziiert ist, was letztendlich zum fast kompletten Verlust der Selbsterneuerungskapazität von reaktiven Astroglia in älteren Tieren führt.

6.4. Herabgesetzte proliferative Kapazität von reaktiven Astrozyten in der alternden post-traumatischen Großhirnrinde

Im Einklang mit vorherigen Studien zeigte sich in dieser Arbeit eine mit dem Alter zunehmende Zellproliferation als Folge einer Verletzung in der Großhirnrinde. Dies aber nur wenn man die gesamte Masse der Gliazellen betrachtet. Denn diese Zunahme betrifft hauptsächlich die Mikroglia; reaktive Astrozyten zeigen im Gegensatz dazu eine signifikante Abnahme ihrer proliferativen Aktivität. Diese Beobachtung ist besonders interessant, wenn man bedenkt, dass in anderen Hirnregionen, wie z.B. dem Hippocampus, eher eine Zunahme astroglialer Proliferation nach Verletzung im höheren Alter stattfindet [133, 134]. Das impliziert nicht nur die Heterogenität astroglialer Reaktion in den verschiedenen Hirnregionen, sondern unterstreicht auch Region-spezifische Effekte des Alterns auf lokal residente Astrozyten. Es ist aber auch anzumerken, dass bislang nur wenig über Alter-assoziierte Veränderungen in kortikalen Astrozyten bekannt ist, und die diesbezüglich am besten erforschte Region der Hippocampus ist, wo aber die Differenzierung zwischen reaktiven Astrozyten und neuralen Stammzellen der SGZ mittels Expression von GFAP erschwert ist (s. Tabelle 1).

Abgestorbene Astrozyten in der post-traumatischen Hirnrinde können nicht aus den adulten Stammzell-Reservoirs (SEZ und SGZ) ersetzt werden, da die Regeneration der astroglialen Population in der Hirnrinde hauptsächlich durch Zellteilung lokaler reaktiver Astrozyten, und nicht durch eine Zellmigration aus diesen klassischen adulten Stammzellnischen erfolgt [88, 91, 116]. Somit verhindert die Abnahme von Verletzungs-induzierter proliferativer Aktivität lokaler Astrozyten in der Hirnrinde alter Organismen die Wiederherstellung der astroglialen Homöostase, und führt somit zu einer herabgesetzten Neuroprotektion, die sich in der im Alter zunehmenden Größe der nekrotischen Region und massiven Narbenbildung sowie der erhöhten Leckage der Blut-Hirn-Schranke widerspiegelt [117].

In dieser Arbeit fand sich eine mit zunehmendem Alter herabgesetzte proliferative Aktivität der reaktiven Astrozyten. Da die Länge der Zellzyklen keine signifikante Änderung zeigte, die Zellen aber weniger Teilungen durchliefen und sich insgesamt seltener asymmetrisch teilten, ist von Fehlern in der Initiierung der Zellteilung sowie der Festlegung des Zellteilungsmodus auszugehen. Trotz einer *in vivo* Aktivierung des SHH-Signalweges, der die Aktivierung neuraler Stammzellen [141] und die Ausprägung stammzellähnlicher Eigenschaften in reaktiven

Astrozyten fördert [91], ließ sich diese Abnahme der proliferativen Aktivität mit dem Alter nicht beheben. Molekularbiologische Untersuchungen [117] zeigen eine Herunterregulation von Komponenten des SHH-Signalweges in alternden Astrozyten (Smo, Ptch1 und deren Effektor cyclin D1 (Ccmd1)). Diese legt eine intrinsische Veränderung der alten Astrozyten als Erklärung für die herabgesetzte proliferative Aktivität nahe.

Die ausbleibende Wiederherstellung der reduzierten proliferativen Aktivität *in vivo* in älteren Mäusen durch Förderung des SHH-Signalweges lässt sich auch *in vitro* reproduzieren, wo die meisten zellulären und molekularen Signale (z.B. Zytokine, Zell-Zell-Kontakte) nur noch in deutlich geringerem Ausmaß nachweisbar waren. Dies ist in Einklang mit der Vermutung einer intrinsischen Veränderung als Ursache für die reduzierte Reaktionsfähigkeit der Astrozyten. Trotz dieser Vermutung sind weitere Untersuchungen erforderlich, um den Effekt der mit dem Alter veränderten extrinsischen Faktoren zu verstehen: bekannt sind eine Abnahme des im Plasma zirkulierenden SHH-Proteins, Konzentrationsänderungen der systemischen zirkulierenden Wachstumsfaktoren wie IGF-1, FGF-2, EGF und VEGF [73, 142, 143], Gefäßschäden, und die Zunahme schädlicher Mikroglia.

Die genauen Gründe für die altersbedingten intrinsischen Veränderungen reaktiver Astrozyten sind bisher nicht bekannt. Es ist aber erwähnenswert, dass in adulten und seneszenten neuronalen Stammzellen ebenfalls eine Abnahme der Proliferation festgestellt wurde [144-146], wofür laut bisherigen Untersuchungen unter anderem Telomer-Verkürzung, eine progressive Akkumulation von DNA-Schäden und epigenetische Veränderungen [147, 148] verantwortlich sein könnten. Proliferierende, in gewissem Maße entdifferenzierte reaktive parenchymale Astrozyten können als eine Subpopulation der plastischen Astroglia verstanden werden, die außerhalb der neurogenen Nischen agieren, sodass dieselben Mechanismen für altersbedingte Funktionsverluste verantwortlich gemacht werden können.

6.5. Post-traumatische Folgeschäden durch verminderte astrogliale Proliferation in der periläsionalen Zone

Das Wiederherstellen der astroglialen Population nach einer Verletzung in der Großhirnrinde ist ein notwendiger Mechanismus, der die weitere Reparatur und eventuelle Neuroregeneration ermöglicht. Reaktive Astrozyten sind an der Neuroprotektion, am

Wiederaufbau der Blut-Hirn-Schranke, der Modulation der Immunantwort, der physischen Barrierebildung im Sinne einer Narbe und sogar an der Phagozytose [60, 85, 114, 149] beteiligt. Somit ist es denkbar, dass die hier festgestellten altersbedingten Defizite in der Entstehung eines entdifferenzierten und plastischen Astrozytenpools eine insuffiziente Geweberegeneration bedingen, wobei durch ausbleibende Schadensbegrenzung weitere reaktive Astrozyten und umgebende Zellen geschädigt werden können. Reaktive Astrozyten sind außerdem durch Neubildung von extrazellulärer Matrix, Förderung der Axonregeneration und Modulierung der Synapsenbildung nach einer Verletzung wichtig für die post-traumatische Neuroplastizität und eine funktionelle neurologische Regenerierung [82, 150], wobei durch ausbleibende Proliferation mit dem Alter weniger Astrozyten diese Funktionen erfüllen können. Diese Mängel in der Schadensbegrenzung und im darauffolgenden Gewebewiederaufbau durch ineffiziente Proliferation der Astrozyten erklären die herabgesetzte Resilienz und schlechtere funktionelle Regenerierung alter Organismen bei Schäden des zentralen Nervensystems.

6.6. Reaktive Astrozyten als lokale Quelle für Neuroregeneration

Transplantation von Stammzellen zur Regenerierung von abgestorbenen Nervenzellen ist ein vielversprechender therapeutischer Ansatz bei verschiedenen neurologischen Krankheiten [16]. Allerdings müssen je nach Pathogenese und Lokalisation des Schadens verschiedene Hürden überwunden werden: Globale angeborene neurodegenerative Krankheiten (z.B. angeborene metabolische Erkrankungen wie Lysosomen-Speicher-Krankheiten) erfordern im Vergleich zu lokalisierten erworbenen neurodegenerativen Krankheiten (z.B. M. Parkinson) oder territorialen akut erworbenen Krankheiten (z.B. Schädel-Hirn-Traumata oder Schlaganfälle) eine andere Vorbehandlung der verwendeten Zelllinien und andere Applikationswege [16, 151]. Systemisch transplantierte Zellen scheinen nur in kleinen Zahlen den gewünschten Ort zu erreichen. Es wird deshalb davon ausgegangen, dass die Sekretion neurotrophischer Faktoren durch die transplantierten Zellen funktionell die größte Rolle spielt. In dieser Arbeit zeige ich, dass reaktive Astrozyten im jungen Alter nach einer akuten Verletzung des ZNS wie traumatischem Hirnschaden eine im gesamten geschädigten Gewebe eingebettete Population sind, die sich eine stammzellähnliche Proliferationsaktivität aneignen, welche sich durch systemische Applikation von ausgewählten Pharmaka einfach

modulieren lassen würde. Da diese Zellen schon im geschädigten Gewebe lokalisiert sind, wäre das Problem der Applikation gelöst. Im höheren Alter sind jedoch aufgrund intrinsischer Veränderungen der Astrozyten dessen Plastizität und Proliferationsaktivität herabgesetzt, sodass die Ansätze zur Behebung dieses Mangels noch weiterer Forschung bedürfen.

Bei extensivem Zelluntergang wie einem territorialen Schlaganfall oder Schädel-Hirn-Trauma erscheinen lokale reaktive Astrozyten eine vielversprechende Quelle zur Neuroregeneration.

7. Zusammenfassung

Traumatische Schädigungen des zentralen Nervensystems (ZNS) führen zu lang-anhaltenden Beschwerden körperlicher, kognitiver sowie psychosozialer Art und gehören zu den häufigsten Todesursachen des Menschen in allen Altersklassen. Verletzungen dieser Art gehen mit einem massiven Zelluntergang im zentral-nervösen Gewebe einher, wobei das Ausmaß des dadurch verursachten Gewebsschadens mit dem Alter zunimmt.

Akute Verletzungen im ZNS führen zu einer (Re-)Aktivierung verschiedener Zellarten. Dies trifft unter anderem für die lokalen Astrozyten zu, die bereits unter physiologischen Bedingungen als wichtige Regulatoren der Homöostase und der neuralen Aktivität fungieren. Auch nach einer Verletzung des ZNS erfüllen reaktive Astrozyten eine Vielzahl der Aufgaben, die für eine Wiederherstellung der Gewebhomöostase von essenzieller Bedeutung sind. Zudem können sie im geschädigten Hirnparenchym die Fähigkeit zur Proliferation (wieder)erlangen, und zeigen sogar Stammzellkapazität *in vitro*. Deshalb ist dieser Subtyp glialer Zellen als mögliche endogene Quelle für den Zellersatz nach einem traumatischen Ereignis im ZNS von besonderem Interesse. Allerdings gibt die Tatsache, dass die lokalen reaktiven Astrozyten an der Zellerneuerung mitwirken ohne jedoch eine Restitution nach Gehirnschädigungen zu bewirken, Anlass zur intensiven Suche nach Optionen, diese Stammzellquelle für den therapeutischen Einsatz bei Behandlung nach Hirnverletzungen effektiv nutzen zu können.

Um aus diesem Stammzellreservoir eine funktionelle Regeneration des abgestorbenen Nervengewebes gezielt bewirken zu können, bedarf es aber der präzisen Kenntnis ihrer Eigenschaften und Funktionen. Das zentrale Ziel meiner Arbeit war es daher, die Mechanismen des endogenen Stammzellpotentials reaktiver Astrozyten sowie die Dynamik ihrer altersbedingten Veränderungen umfassend zu untersuchen und genauer zu verstehen. Mit Hilfe einer breiten Palette an zell- und molekularbiologischen Methoden, transgenen Mauslinien, einer pharmakologischen Studie *in vivo* und *in vitro*, Fluoreszenzmikroskopie und einer Rekonstruktion von klonal-generierten Astrozytenkolonien *in vitro*, konnte ich nachweisen, dass die endogene Plastizität reaktiver Astrozyten im post-traumatischen murinen Gehirn mit steigendem Alter tatsächlich signifikant reduziert ist. Dabei konnte ich erstmals zeigen, dass sich das proliferative Programm in reaktiven kortikalen Astrozyten mit zunehmendem Alter der Mäuse stark verändert und vor allem die stammzellähnlichen

asymmetrisch-proliferativen Zellteilungsmuster reaktiver Astrozyten altersbedingt abnehmen. Mittels umfangreicher Analysen von drei klinisch-relevanten Altersgruppen post-traumatischer Tiere habe ich festgestellt, dass ein beträchtliches Defizit verletzungsassoziierter Proliferation von Astrozyten im geschädigten Hirnareal bei alten Tieren durch eine *in vivo* Aktivierung des pleiotropen und proliferationsfördernden Sonic Hedgehog-Signalweges nicht verringert werden kann. Im Angesicht der umfassenden Schlüsselfunktionen, die Astrozyten bei der Regulation der Gewebemöostase, Neuroprotektion, Immunabwehr und Phagozytose im geschädigten Gewebe übernehmen, war es nicht überraschend, dass die verhinderte Wiederherstellung eines astroglialen Equilibriums im post-traumatischen Parenchym von alten Mäusen mit einer vermehrten Inflammation und einer Ausbreitung des nekrotischen Areals einhergeht. Auch wenn die dahinterstehenden Mechanismen noch nicht geklärt sind, schaffen die Ergebnisse meiner Arbeit grundlegende Erkenntnisse über die altersbedingten Veränderungen der reaktiven Astrozytenpopulation nach einer invasiven Hirnschädigung. Die Erkenntnisse aus dieser Studie weisen zudem darauf hin, dass eine progressive Manifestation der Gewebeschädigungen im älteren Gehirn in enge Verbindung mit der altersbedingten Beeinträchtigung der Astrozytenfunktionalität, insbesondere ihrer Plastizität, gebracht werden kann und dass diese zur klinisch-beobachteten Abnahme der Überlebensrate von älteren Patienten nach einer Gehirnverletzung beiträgt.

8. Limitierungen der vorliegenden Arbeit

Tierexperimentelle Modelle sind zweifelsohne unerlässlich, jedoch sind zur Klärung der altersbedingten Veränderung der proliferativen Aktivität und Plastizität im neuropathologischen Kontext ergänzende Untersuchungen an humanen Astrozyten nötig.

Meine Untersuchungen beziehen sich auf kortikale Astrozyten, von denen beim Menschen mehrere weitere Subtypen (wie z.B. interlaminäre und polarisierte Astrozyten) bekannt sind, die aber bei Mäusen nicht existieren [77, 152]. Trotz bekannter Unterschiede zwischen humanen und murinen Astrozyten (wie z.B. Morphologie, Größe, Komplexität), besitzen Astrozyten von Säugetieren eine Fülle von gemeinsamen grundlegenden, fundamentalen Eigenschaften, vor allem was phylogenetisch ältere Funktionen betrifft [77, 78]. Selbst wenn eine Extrapolation der Ergebnisse nicht ohne weiteres möglich ist [77], legt die Tatsache, dass die Proliferation ein phylogenetisch altes Merkmal von Stammzellen, und somit auch von neuronalen Stammzellen ist, die Vermutung der evolutionären Konservierung dieser Funktion in spezialisierten Subpopulation astroglialer Zellen im erwachsenen Gehirn nahe.

Die meisten Erkenntnisse der Funktionalität reaktiver Astrozyten basieren bis dato auf Untersuchungen von künstlich gealterten embryonalen Zellkulturen oder immortalisierten Zelllinien, welche weit vom physiologischen Zustand von Astrozyten entfernt sind.

In dieser Arbeit ist es mir gelungen, das Potenzial der im Organismus natürlich gealterten Astrozyten in primären ‚gemischten‘ Zellkulturen zu beschreiben. Dabei sollte auch bedacht werden, dass Astrozyten als wichtige Regulatoren der Mikroumgebung und Homöostase im ZNS ständig mit anderen Zellen interagieren und zudem parakrin stimuliert werden. In dieser Hinsicht stellt die Mischkultur zweifelsohne einen Vorteil dar. Obwohl man intensiv daran arbeitet, eine 3D-Matrixbeschichtung für die *in vitro*-Untersuchung von neuronalen Zellen zu entwickeln, ist diese Methode bis dato leider nicht etabliert. Somit existiert immer noch keine alternative Methode, mit der man die Zellen des neuronalen Parenchyms über mehrere Tage mit einer hohen zeitlichen Auflösung (1 Bild pro 5 Minuten) beobachten könnte. Die *in vivo* Zwei-Photon-Mikroskopie erlaubt zwar Bildgebungen an lebenden Tieren, ist jedoch aufgrund der damit verbundenen Phototoxizität sowie der nötigen wiederholten Betäubung der Tiere nur alle zwei Tage anwendbar [88]. Darüber hinaus können bei der Zwei-Photon-Mikroskopie *in vivo* lediglich die oberflächlich lokalisierten Zellen visualisiert und untersucht werden. Die

in situ Bildgebung von präparierten Hirnschnitten ist auf insgesamt ca. 6-12 Stunden begrenzt [153], sodass für eine so genaue Beschreibung der Proliferation von reaktiven Astrozyten aktuell keine lebenschere Methode existiert.

Als Verletzungsmodell wurde in dieser Arbeit eine kortikale Stichverletzung benutzt, die sich pathophysiologisch jedoch von den häufigsten Formen traumatischer Hirnverletzungen beim Patienten oder ischämischen Schlaganfällen unterscheidet. Allerdings gibt es bei den drei akuten Verletzungsarten essenzielle Parallelen: es kommt in allen Fällen zu einem massiven, undifferenzierten Absterben aller kortikaler Zellarten, zur signifikanten Beeinträchtigung der Blut-Hirn-Schranke sowie zur Zerstörung eines Großteils der Gewebestrukturen. Zudem ist die Ähnlichkeit dieser invasiven Hirnverletzungen auf zellulärer, molekularer und ultrastruktureller Ebene durch funktionelle und genetische Untersuchungen bestätigt [86, 91]. Dennoch können die hier gewonnenen Erkenntnisse nur in gewissem Maße auf andere Verletzungsarten, Hirnregionen und Spezies übertragen werden.

9. Ausblick

In dieser Arbeit konnte ich eine reproduzierbare Methode zur Untersuchung der Reaktion von kortikalen Astrozyten auf invasive Verletzungen mittels Time-Lapse-Imaging etablieren. Dies ermöglicht weitere Untersuchungen, die genaueren Aufschluss über die hier beschriebenen Veränderungen dieser Reaktion mit zunehmendem Alter geben könnten. So könnten wie hier für den SHH-Signalweg gezeigt, zahlreiche weitere neurotrophische und pleiotrope Faktoren (wie z.B. die TGF- β -Familie, Neurotrophine, Neurotransmitter) auf deren Einfluss auf die intrinsische Plastizität und Stammzeleigenschaften reaktiver Astrozyten untersucht werden. Wie aus meiner Arbeit hervorgeht, sind es vor allem im höheren Alter auftretende Veränderungen der reaktiven Astrozyten, die die Proliferation dieser potenten, lokalen Zellen schwächen, und damit deren Potenzial in der Schadensbegrenzung und der Neuroregeneration nach traumatischer Gehirnverletzung begrenzen. Somit ist die weitere Suche nach biologisch aktiven Substanzen, die die altersbedingten Veränderungen in der astroglialen Proliferation positiv beeinflussen, kompensieren oder gar rückgängig machen können auch hinsichtlich der Entwicklung möglicher Therapiestrategien von äußerster Relevanz. Hier sei noch erwähnt, dass die ersten Inhibitoren des Hedgehog-Signalweges (z.B. Vismodegib, Sonidegib) in der Behandlung metastasierter oder anders nicht therapierbarer Krebserkrankungen genutzt werden [154].

Selbst wenn ich mich in dieser Arbeit vor allem mit intrinsischen Veränderungen der Astrozyten beschäftigte, sind es mit Sicherheit auch extrinsische Einflüsse, die in der Limitierung des Stammzellpotenzials von Astrozyten eine entscheidende Rolle spielen können. Die enge Zusammenarbeit von reaktiven Mikroglia und Astrozyten ist ein vielversprechendes, aber bisher wenig erforschtes Gebiet. Auch die altersbedingten Veränderungen der extrazellulären Matrix und Zytokinsekretion bergen ein theoretisches therapeutisches Potenzial. Diese Aspekte sind bereits jetzt Gegenstand wissenschaftlicher Studien und werden es auch sicherlich in Zukunft bleiben.

10. Publikationen

Gábor Heimann, Luisa L. Canhos, Jesica Frik, Gabriele Jäger, Tjasa Lepko, Jovica Ninkovic, Magdalena Götz, Swetlana Sirko. Changes in the Proliferative Program Limit Astrocyte Homeostasis in the Aged Post-Traumatic Murine Cerebral Cortex, *Cerebral Cortex*, Volume 27, Issue 8, August 2017, Pages 4213–4228, <https://doi.org/10.1093/cercor/bhx112>

Gábor Heimann and Swetlana Sirko. Investigating Age-Related Changes in Proliferation and the Cell Division Repertoire of Parenchymal Reactive Astrocytes. *Astrocytes. Methods in Molecular Biology*, vol 1938, January 2019, Di Benedetto B. (eds), Humana Press, New York, NY, https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9068-9_20

11. Danksagung

Ich möchte meiner Betreuerin PD Dr. Swetlana Sirko für die Möglichkeit dieser interessanten Dissertation, für ihre unendliche Geduld, ihre wertvolle und lehrreiche Unterstützung sowie die exzellente Betreuung danken.

Ich danke meiner Ehefrau Dr. Christiane Gasperi für ihren Beistand, für ihre uneingeschränkte Unterstützung und ihre Ruhe, Geduld und Ausdauer, mit der sie mir zu Seite stand.

Ebenfalls danke ich meinen Eltern Ágnes und Zoltán Heimann Sr. sowie meinem Bruder Zoltán Heimann Jr. für ihre anhaltende Unterstützung und Hilfe.

Außerdem danke ich herzlichst allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Forschungsgruppe von Professorin Magdalena Götz, die als Beraterinnen und Berater immer für mich da waren.

Diese Arbeit wäre ohne euch nicht möglich gewesen. Danke!

12. Referenzen

1. Dewan, M.C., A. Rattani, S. Gupta, R.E. Baticulon, Y.C. Hung, M. Punchak, A. Agrawal, A.O. Adeleye, M.G. Shrivastava, A.M. Rubiano, J.V. Rosenfeld, and K.B. Park, *Estimating the global incidence of traumatic brain injury*. J Neurosurg, 2018. **130** (4) p. 1039-1408.
2. Peeters, W., R. van den Brande, S. Polinder, A. Brazinova, E.W. Steyerberg, H.F. Lingsma, and A.I. Maas, *Epidemiology of traumatic brain injury in Europe*. Acta Neurochir (Wien), 2015. **157**(10): p. 1683-96.
3. Plass, D., T. Vos, C. Hornberg, C. Scheidt-Nave, H. Zeeb, and A. Kramer, *Trends in disease burden in Germany: results, implications and limitations of the Global Burden of Disease study*. Dtsch Arztebl Int, 2014. **111**(38): p. 629-38.
4. DALYs, G.B.D. and H. Collaborators, *Global, regional, and national disability-adjusted life-years (DALYs) for 315 diseases and injuries and healthy life expectancy (HALE), 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015*. Lancet, 2016. **388**(10053): p. 1603-1658.
5. McKee, A.C. and D.H. Daneshvar, *The neuropathology of traumatic brain injury*. Handb Clin Neurol, 2015. **127**: p. 45-66.
6. Cekanaviciute, E. and M.S. Buckwalter, *Astrocytes: Integrative Regulators of Neuroinflammation in Stroke and Other Neurological Diseases*. Neurotherapeutics, 2016. **13**(4): p. 685-701.
7. Grefkes, C. and G.R. Fink, *Connectivity-based approaches in stroke and recovery of function*. Lancet Neurol, 2014. **13**(2): p. 206-16.
8. Zhang, Z.G. and M. Chopp, *Promoting brain remodeling to aid in stroke recovery*. Trends Mol Med, 2015. **21**(9): p. 543-8.
9. Ginsberg, M.D., *Neuroprotection for ischemic stroke: past, present and future*. Neuropharmacology, 2008. **55**(3): p. 363-89.
10. Brotfain, E., S.E. Gruenbaum, M. Boyko, R. Kutz, A. Zlotnik, and M. Klein, *Neuroprotection by Estrogen and Progesterone in Traumatic Brain Injury and Spinal Cord Injury*. Curr Neuropharmacol, 2016. **14**(6): p. 641-53.
11. Liu, X., R. Ye, T. Yan, S.P. Yu, L. Wei, G. Xu, X. Fan, Y. Jiang, R.A. Stetler, G. Liu, and J. Chen, *Cell based therapies for ischemic stroke: from basic science to bedside*. Prog Neurobiol, 2014. **115**: p. 92-115.
12. Corps, K.N., T.L. Roth, and D.B. McGavern, *Inflammation and neuroprotection in traumatic brain injury*. JAMA Neurol, 2015. **72**(3): p. 355-62.
13. O'Collins, V.E., M.R. Macleod, G.A. Donnan, L.L. Horky, B.H. van der Worp, and D.W. Howells, *1,026 experimental treatments in acute stroke*. Ann Neurol, 2006. **59**(3): p. 467-77.
14. Gruenbaum, S.E., A. Zlotnik, B.F. Gruenbaum, D. Hersey, and F. Bilotta, *Pharmacologic Neuroprotection for Functional Outcomes After Traumatic Brain Injury: A Systematic Review of the Clinical Literature*. CNS Drugs, 2016. **30**(9): p. 791-806.
15. Koh, S.H. and H.H. Park, *Neurogenesis in Stroke Recovery*. Transl Stroke Res, 2017. **8**(1): p. 3-13.
16. Gonzalez, R., M.H. Hamblin, and J.P. Lee, *Neural Stem Cell Transplantation and CNS Diseases*. CNS Neurol Disord Drug Targets, 2016. **15**(8): p. 881-886.
17. Virchow, R., *Gesammelte Abhandlungen zur Wissenschaftlichen Medicin*. Vol. 1. 1856: Hamm, Frankfurt a.M., p. 890.

18. Kandel, E.R., *Principles of Neural Science, Fifth Edition*. 2013: McGraw-Hill Education.
19. J. Gordon Betts, K.A.Y., James A. Wise, Eddie Johnson, Brandon Poe, Dean H. Kruse, Oksana Korol, Jody E. Johnson, Mark Womble, Peter DeSaix, *Anatomy and Physiology* 2013: OpenStax
20. Verkhratsky, A., *Neuronismo y reticulismo: neuronal-glia circuits unify the reticular and neuronal theories of brain organization*. *Acta Physiol (Oxf)*, 2009. **195**(1): p. 111-22.
21. Davalos, D., J. Grutzendler, G. Yang, J.V. Kim, Y. Zuo, S. Jung, D.R. Littman, M.L. Dustin, and W.B. Gan, *ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo*. *Nat Neurosci*, 2005. **8**(6): p. 752-8.
22. Nimmerjahn, A., F. Kirchhoff, and F. Helmchen, *Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo*. *Science*, 2005. **308**(5726): p. 1314-8.
23. Casano, A.M. and F. Peri, *Microglia: multitasking specialists of the brain*. *Dev Cell*, 2015. **32**(4): p. 469-77.
24. Sierra, A., J.M. Encinas, J.J. Deudero, J.H. Chancey, G. Enikolopov, L.S. Overstreet-Wadiche, S.E. Tsirka, and M. Maletic-Savatic, *Microglia shape adult hippocampal neurogenesis through apoptosis-coupled phagocytosis*. *Cell Stem Cell*, 2010. **7**(4): p. 483-95.
25. Tremblay, M.E., R.L. Lowery, and A.K. Majewska, *Microglial interactions with synapses are modulated by visual experience*. *PLoS Biol*, 2010. **8**(11): p. e1000527.
26. Trotter, J., K. Karram, and A. Nishiyama, *NG2 cells: Properties, progeny and origin*. *Brain Res Rev*, 2010. **63**(1-2): p. 72-82.
27. Nishiyama, A., M. Komitova, R. Suzuki, and X. Zhu, *Polydendrocytes (NG2 cells): multifunctional cells with lineage plasticity*. *Nat Rev Neurosci*, 2009. **10**(1): p. 9-22.
28. Wang, D.D. and A. Bordey, *The astrocyte odyssey*. *Prog Neurobiol*, 2008. **86**(4): p. 342-67.
29. Richardson, W.D., K.M. Young, R.B. Tripathi, and I. McKenzie, *NG2-glia as multipotent neural stem cells: fact or fantasy?* *Neuron*, 2011. **70**(4): p. 661-73.
30. Kettenmann, H. and B.R. Ransom, *Neuroglia*. 2013: OUP USA. 930.
31. Oberheim, N.A., S.A. Goldman, and M. Nedergaard, *Heterogeneity of astrocytic form and function*. *Methods Mol Biol*, 2012. **814**: p. 23-45.
32. Zhang, Y. and B.A. Barres, *Astrocyte heterogeneity: an underappreciated topic in neurobiology*. *Curr Opin Neurobiol*, 2010. **20**(5): p. 588-94.
33. Verkhratsky, A. and M. Nedergaard, *Physiology of Astroglia*. *Physiol Rev*, 2018. **98**(1): p. 239-389.
34. Bayraktar, O.A., L.C. Fuentealba, A. Alvarez-Buylla, and D.H. Rowitch, *Astrocyte development and heterogeneity*. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2014. **7**(1): p. a020362.
35. Emsley, J.G. and J.D. Macklis, *Astroglial heterogeneity closely reflects the neuronal-defined anatomy of the adult murine CNS*. *Neuron Glia Biol*, 2006. **2**(3): p. 175-86.
36. Kettenmann, H. and A. Verkhratsky, *[Neuroglia--living nerve glue]*. *Fortschr Neurol Psychiatr*, 2011. **79**(10): p. 588-97.
37. Pannasch, U., M. Derangeon, O. Chever, and N. Rouach, *Astroglial gap junctions shape neuronal network activity*. *Commun Integr Biol*, 2012. **5**(3): p. 248-54.
38. Verkhratsky, A., R. Zorec, and V. Parpura, *Stratification of astrocytes in healthy and diseased brain*. *Brain Pathol*, 2017. **27**(5): p. 629-644.

39. Liddelow, S. and B. Barres, *SnapShot: Astrocytes in Health and Disease*. Cell, 2015. **162**(5): p. 1170-1170 e1.
40. Barres, B.A., *The mystery and magic of glia: a perspective on their roles in health and disease*. Neuron, 2008. **60**(3): p. 430-40.
41. Chever, O., E. Dossi, U. Pannasch, M. Derangeon, and N. Rouach, *Astroglial networks promote neuronal coordination*. Sci Signal, 2016. **9**(410): p. ra6.
42. Vella, J., C. Zammit, G. Di Giovanni, R. Muscat, and M. Valentino, *The central role of aquaporins in the pathophysiology of ischemic stroke*. Front Cell Neurosci, 2015. **9**: p. 108.
43. Hansson, E. and L. Ronnback, *Astroglial modulation of synaptic transmission*. Perspect Dev Neurobiol, 1994. **2**(3): p. 217-23.
44. Iliff, J.J., M. Wang, Y. Liao, B.A. Plogg, W. Peng, G.A. Gundersen, H. Benveniste, G.E. Vates, R. Deane, S.A. Goldman, E.A. Nagelhus, and M. Nedergaard, *A paravascular pathway facilitates CSF flow through the brain parenchyma and the clearance of interstitial solutes, including amyloid beta*. Sci Transl Med, 2012. **4**(147): p. 147ra111.
45. Jessen, N.A., A.S. Munk, I. Lundgaard, and M. Nedergaard, *The Glymphatic System: A Beginner's Guide*. Neurochem Res, 2015. **40**(12): p. 2583-99.
46. Parpura, V. and A. Verkhratsky, *Astrocytes revisited: concise historic outlook on glutamate homeostasis and signaling*. Croat Med J, 2012. **53**(6): p. 518-28.
47. Robel, S., B. Berninger, and M. Gotz, *The stem cell potential of glia: lessons from reactive gliosis*. Nat Rev Neurosci, 2011. **12**(2): p. 88-104.
48. Lundgaard, I., M.J. Osorio, B.T. Kress, S. Sanggaard, and M. Nedergaard, *White matter astrocytes in health and disease*. Neuroscience, 2014. **276**: p. 161-73.
49. Ledford, H., *Language: Disputed definitions*. Nature, 2008. **455**(7216): p. 1023-8.
50. Tang, Y., P. Yu, and L. Cheng, *Current progress in the derivation and therapeutic application of neural stem cells*. Cell Death Dis, 2017. **8**(10): p. e3108.
51. Gotz, M., S. Sirko, J. Beckers, and M. Irmeler, *Reactive astrocytes as neural stem or progenitor cells: In vivo lineage, In vitro potential, and Genome-wide expression analysis*. Glia, 2015. **63**(8): p. 1452-68.
52. Neumuller, R.A. and J.A. Knoblich, *Dividing cellular asymmetry: asymmetric cell division and its implications for stem cells and cancer*. Genes Dev, 2009. **23**(23): p. 2675-99.
53. Pekny, M., M. Pekna, A. Messing, C. Steinhauser, J.M. Lee, V. Parpura, E.M. Hol, M.V. Sofroniew, and A. Verkhratsky, *Astrocytes: a central element in neurological diseases*. Acta Neuropathol, 2016. **131**(3): p. 323-45.
54. Kriegstein, A.R. and M. Gotz, *Radial glia diversity: a matter of cell fate*. Glia, 2003. **43**(1): p. 37-43.
55. Malatesta, P., E. Hartfuss, and M. Gotz, *Isolation of radial glial cells by fluorescent-activated cell sorting reveals a neuronal lineage*. Development, 2000. **127**(24): p. 5253-63.
56. Kriegstein, A. and A. Alvarez-Buylla, *The glial nature of embryonic and adult neural stem cells*. Annu Rev Neurosci, 2009. **32**(1): p. 149-84.
57. Gotz, M., *Revising concepts about adult stem cells*. Science, 2018. **359**(6376): p. 639-640.
58. Molofsky, A.V. and B. Deneen, *Astrocyte development: A Guide for the Perplexed*. Glia, 2015. **63**(8): p. 1320-9.

59. Sofroniew, M.V. and H.V. Vinters, *Astrocytes: biology and pathology*. Acta Neuropathol, 2010. **119**(1): p. 7-35.
60. Götz, M.S., S. , *Potential of glial cells*, in *Stem cells handbook, 2nd ed*, S. Sell, Editor. 2013, Springer: New York. p. pp 347–361.
61. Ernst, A. and J. Frisen, *Adult neurogenesis in humans- common and unique traits in mammals*. PLoS Biol, 2015. **13**(1): p. e1002045.
62. Morrison, S.J. and A.C. Spradling, *Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life*. Cell, 2008. **132**(4): p. 598-611.
63. Copen, W.A., L.H. Schwamm, R.G. Gonzalez, O. Wu, C.B. Harmath, P.W. Schaefer, W.J. Koroshetz, and A.G. Sorensen, *Ischemic stroke: effects of etiology and patient age on the time course of the core apparent diffusion coefficient*. Radiology, 2001. **221**(1): p. 27-34.
64. Buga, A.M., R. Vintilescu, O.T. Pop, and A. Popa-Wagner, *Brain Aging and Regeneration after Injuries: an Organismal approach*. Aging Dis, 2011. **2**(1): p. 64-79.
65. Sousounis, K., J.A. Baddour, and P.A. Tsonis, *Aging and regeneration in vertebrates*. Curr Top Dev Biol, 2014. **108**: p. 217-46.
66. Porchet, R., A. Probst, C. Bouras, E. Draberova, P. Draber, and B.M. Riederer, *Analysis of glial acidic fibrillary protein in the human entorhinal cortex during aging and in Alzheimer's disease*. Proteomics, 2003. **3**(8): p. 1476-85.
67. Ferrer, I., *Diversity of astroglial responses across human neurodegenerative disorders and brain aging*. Brain Pathol, 2017. **27**(5): p. 645-674.
68. Rodriguez, J.J., C.Y. Yeh, S. Terzieva, M. Olabarria, M. Kulijewicz-Nawrot, and A. Verkhratsky, *Complex and region-specific changes in astroglial markers in the aging brain*. Neurobiol Aging, 2014. **35**(1): p. 15-23.
69. Salminen, A., J. Ojala, K. Kaarniranta, A. Haapasalo, M. Hiltunen, and H. Soininen, *Astrocytes in the aging brain express characteristics of senescence-associated secretory phenotype*. Eur J Neurosci, 2011. **34**(1): p. 3-11.
70. Orre, M., W. Kamphuis, L.M. Osborn, J. Melief, L. Kooijman, I. Huitinga, J. Klooster, K. Bossers, and E.M. Hol, *Acute isolation and transcriptome characterization of cortical astrocytes and microglia from young and aged mice*. Neurobiol Aging, 2014. **35**(1): p. 1-14.
71. Crowe, E.P., F. Tuzer, B.D. Gregory, G. Donahue, S.J. Gosai, J. Cohen, Y.Y. Leung, E. Yetkin, R. Nativio, L.S. Wang, C. Sell, N.M. Bonini, S.L. Berger, F.B. Johnson, and C. Torres, *Changes in the Transcriptome of Human Astrocytes Accompanying Oxidative Stress-Induced Senescence*. Front Aging Neurosci, 2016. **8**: p. 208.
72. Janota, C.S., D. Brites, C.A. Lemere, and M.A. Brito, *Glio-vascular changes during ageing in wild-type and Alzheimer's disease-like APP/PS1 mice*. Brain Res, 2015. **1620**: p. 153-68.
73. McLay, R.N., A.J. Kastin, and J.E. Zadina, *Passage of interleukin-1-beta across the blood-brain barrier is reduced in aged mice: a possible mechanism for diminished fever in aging*. Neuroimmunomodulation, 2000. **8**(3): p. 148-53.
74. Deiters, O., *Untersuchungen über Gehirn und Rückenmark des Menschen und der Säugethiere*. 1865: F. Veiweg.
75. y Cajal, S.R., *Algunas conjeturas sobre el mecanismo anatómico de la ideación, asociación y atención*. 1895.
76. Butzke, V., *Studien über den feineren Bau der Grosshirnrinde*. European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience, 1872. **3**(3): p. 575-598.

77. Colombo, J., *Interlaminar glia and other glial themes revisited: Pending answers following three decades of glial research*. Neuroglia, 2018. **1**(1): p. 7-20.
78. Verkhratsky, A., N. Bush, M. Nedergaard, and A. Butt, *The special case of human astrocytes*. Neuroglia, 2018. **1**(1): p. 21-29.
79. Oberheim, N.A., X. Wang, S. Goldman, and M. Nedergaard, *Astrocytic complexity distinguishes the human brain*. Trends Neurosci, 2006. **29**(10): p. 547-53.
80. Tao, Y., M. Wang, E. Chen, and H. Tang, *Liver Regeneration: Analysis of the Main Relevant Signaling Molecules*. Mediators Inflamm, 2017. **2017**: p. 4256352.
81. Takeo, M., W. Lee, and M. Ito, *Wound healing and skin regeneration*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2015. **5**(1): p. a023267.
82. Sims, N.R. and W.P. Yew, *Reactive astrogliosis in stroke: Contributions of astrocytes to recovery of neurological function*. Neurochem Int, 2017. **107**: p. 88-103.
83. Robel, S., S.C. Buckingham, J.L. Boni, S.L. Campbell, N.C. Danbolt, T. Riedemann, B. Sutor, and H. Sontheimer, *Reactive astrogliosis causes the development of spontaneous seizures*. J Neurosci, 2015. **35**(8): p. 3330-45.
84. Faulkner, J.R., J.E. Herrmann, M.J. Woo, K.E. Tansey, N.B. Doan, and M.V. Sofroniew, *Reactive astrocytes protect tissue and preserve function after spinal cord injury*. J Neurosci, 2004. **24**(9): p. 2143-55.
85. Cordiglieri, C.F., C. , *Astrocytes Exert and Control Immune Responses in the Brain*. Current Immunology Reviews, 2010. **6**(3): p. 150-159.
86. Zamanian, J.L., L. Xu, L.C. Foo, N. Nouri, L. Zhou, R.G. Giffard, and B.A. Barres, *Genomic analysis of reactive astrogliosis*. J Neurosci, 2012. **32**(18): p. 6391-410.
87. Pekny, M. and M. Pekna, *Astrocyte reactivity and reactive astrogliosis: costs and benefits*. Physiol Rev, 2014. **94**(4): p. 1077-98.
88. Bardehle, S., M. Kruger, F. Buggenthin, J. Schwausch, J. Ninkovic, H. Clevers, H.J. Snippert, F.J. Theis, M. Meyer-Luehmann, I. Bechmann, L. Dimou, and M. Gotz, *Live imaging of astrocyte responses to acute injury reveals selective juxtavascular proliferation*. Nat Neurosci, 2013. **16**(5): p. 580-6.
89. Bush, T.G., N. Puvanachandra, C.H. Horner, A. Polito, T. Ostefeld, C.N. Svendsen, L. Mucke, M.H. Johnson, and M.V. Sofroniew, *Leukocyte infiltration, neuronal degeneration, and neurite outgrowth after ablation of scar-forming, reactive astrocytes in adult transgenic mice*. Neuron, 1999. **23**(2): p. 297-308.
90. Liddelow, S.A. and B.A. Barres, *Reactive Astrocytes: Production, Function, and Therapeutic Potential*. Immunity, 2017. **46**(6): p. 957-967.
91. Sirko, S., G. Behrendt, P.A. Johansson, P. Tripathi, M. Costa, S. Bek, C. Heinrich, S. Tiedt, D. Colak, M. Dichgans, I.R. Fischer, N. Plesnila, M. Staufenbiel, C. Haass, M. Snappyan, A. Saghatelian, L.H. Tsai, A. Fischer, K. Grobe, L. Dimou, and M. Gotz, *Reactive glia in the injured brain acquire stem cell properties in response to sonic hedgehog. [corrected]*. Cell Stem Cell, 2013. **12**(4): p. 426-39.
92. Reynolds, B.A. and S. Weiss, *Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system*. Science, 1992. **255**(5052): p. 1707-10.
93. Adams, K.L. and V. Gallo, *The diversity and disparity of the glial scar*. Nat Neurosci, 2018. **21**(1): p. 9-15.
94. Ingham, P.W., Y. Nakano, and C. Seger, *Mechanisms and functions of Hedgehog signalling across the metazoa*. Nat Rev Genet, 2011. **12**(6): p. 393-406.

95. Hooper, J.E. and M.P. Scott, *Communicating with Hedgehogs*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2005. **6**(4): p. 306-17.
96. Finco, I., C.R. LaPensee, K.T. Krill, and G.D. Hammer, *Hedgehog signaling and steroidogenesis*. Annu Rev Physiol, 2015. **77**: p. 105-29.
97. Riobo, N.A. and D.R. Manning, *Pathways of signal transduction employed by vertebrate Hedgehogs*. Biochem J, 2007. **403**(3): p. 369-79.
98. Saade, M., I. Gutierrez-Vallejo, G. Le Dreau, M.A. Rabadan, D.G. Miguez, J. Buceta, and E. Marti, *Sonic hedgehog signaling switches the mode of division in the developing nervous system*. Cell Rep, 2013. **4**(3): p. 492-503.
99. Chiang, C., Y. Litingtung, E. Lee, K.E. Young, J.L. Corden, H. Westphal, and P.A. Beachy, *Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function*. Nature, 1996. **383**(6599): p. 407-13.
100. Litingtung, Y., L. Lei, H. Westphal, and C. Chiang, *Sonic hedgehog is essential to foregut development*. Nat Genet, 1998. **20**(1): p. 58-61.
101. Yang, C., W. Chen, Y. Chen, and J. Jiang, *Smoothed transduces Hedgehog signal by forming a complex with Evc/Evc2*. Cell Res, 2012. **22**(11): p. 1593-604.
102. Amankulor, N.M., D. Hambardzumyan, S.M. Pyontek, O.J. Becher, J.A. Joyce, and E.C. Holland, *Sonic hedgehog pathway activation is induced by acute brain injury and regulated by injury-related inflammation*. J Neurosci, 2009. **29**(33): p. 10299-308.
103. Alvarez-Buylla, A. and R.A. Ihrie, *Sonic hedgehog signaling in the postnatal brain*. Semin Cell Dev Biol, 2014. **33**: p. 105-11.
104. Traiffort, E., E. Angot, and M. Ruat, *Sonic Hedgehog signaling in the mammalian brain*. J Neurochem, 2010. **113**(3): p. 576-90.
105. Chechneva, O.V., F. Mayrhofer, D.J. Daugherty, R.G. Krishnamurty, P. Bannerman, D.E. Pleasure, and W. Deng, *A Smoothed receptor agonist is neuroprotective and promotes regeneration after ischemic brain injury*. Cell Death Dis, 2014. **5**(10): p. e1481.
106. Jin, Y., N. Raviv, A. Barnett, N.C. Bambakidis, E. Filichia, and Y. Luo, *The shh signaling pathway is upregulated in multiple cell types in cortical ischemia and influences the outcome of stroke in an animal model*. PLoS One, 2015. **10**(4): p. e0124657.
107. M Bermúdez-Muñoz, O., *Sonic Hedgehog (SHH) pathway in the adult brain: key signaling for astrocyte reactivation and brain repair*. Actualidades Biológicas, 2016. **38** (105): p. 197-209.
108. Ohlig, S., U. Pickhinke, S. Sirko, S. Bandari, D. Hoffmann, R. Dreier, P. Farshi, M. Gotz, and K. Grobe, *An emerging role of Sonic hedgehog shedding as a modulator of heparan sulfate interactions*. J Biol Chem, 2012. **287**(52): p. 43708-19.
109. Ohlig, S., P. Farshi, U. Pickhinke, J. van den Boom, S. Hoing, S. Jakushev, D. Hoffmann, R. Dreier, H.R. Scholer, T. Dierker, C. Bordych, and K. Grobe, *Sonic hedgehog shedding results in functional activation of the solubilized protein*. Dev Cell, 2011. **20**(6): p. 764-74.
110. Lewis, C. and P.A. Krieg, *Reagents for developmental regulation of Hedgehog signaling*. Methods, 2014. **66**(3): p. 390-7.
111. Bryant, C.D., N.N. Zhang, G. Sokoloff, M.S. Fanselow, H.S. Ennes, A.A. Palmer, and J.A. McRoberts, *Behavioral differences among C57BL/6 substrains: implications for transgenic and knockout studies*. J Neurogenet, 2008. **22**(4): p. 315-31.

112. Hirrlinger, P.G., A. Scheller, C. Braun, M. Quintela-Schneider, B. Fuss, J. Hirrlinger, and F. Kirchhoff, *Expression of reef coral fluorescent proteins in the central nervous system of transgenic mice*. *Mol Cell Neurosci*, 2005. **30**(3): p. 291-303.
113. Sakaue-Sawano, A., H. Kurokawa, T. Morimura, A. Hanyu, H. Hama, H. Osawa, S. Kashiwagi, K. Fukami, T. Miyata, H. Miyoshi, T. Imamura, M. Ogawa, H. Masai, and A. Miyawaki, *Visualizing spatiotemporal dynamics of multicellular cell-cycle progression*. *Cell*, 2008. **132**(3): p. 487-98.
114. Sirko, S., M. Irmeler, S. Gascon, S. Bek, S. Schneider, L. Dimou, J. Obermann, D. De Souza Paiva, F. Poirier, J. Beckers, S.M. Hauck, Y.A. Barde, and M. Gotz, *Astrocyte reactivity after brain injury-: The role of galectins 1 and 3*. *Glia*, 2015. **63**(12): p. 2340-61.
115. Laird, P.W., A. Zijderveld, K. Linders, M.A. Rudnicki, R. Jaenisch, and A. Berns, *Simplified mammalian DNA isolation procedure*. *Nucleic Acids Res*, 1991. **19**(15): p. 4293.
116. Buffo, A., I. Rite, P. Tripathi, A. Lepier, D. Colak, A.P. Horn, T. Mori, and M. Gotz, *Origin and progeny of reactive gliosis: A source of multipotent cells in the injured brain*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(9): p. 3581-6.
117. Heimann, G., L.L. Canhos, J. Frik, G. Jager, T. Lepko, J. Ninkovic, M. Gotz, and S. Sirko, *Changes in the Proliferative Program Limit Astrocyte Homeostasis in the Aged Post-Traumatic Murine Cerebral Cortex*. *Cereb Cortex*, 2017. **27**(8): p. 4213-4228.
118. Frik, J., J. Merl-Pham, N. Plesnila, N. Mattugini, J. Kjell, J. Kraska, R.M. Gomez, S.M. Hauck, S. Sirko, and M. Gotz, *Cross-talk between monocyte invasion and astrocyte proliferation regulates scarring in brain injury*. *EMBO Rep*, 2018. **19**(5). e45294
119. Hilsenbeck, O., M. Schwarzfischer, S. Skylaki, B. Schauburger, P.S. Hoppe, D. Loeffler, K.D. Kokkaliaris, S. Hastreiter, E. Skylaki, A. Filipczyk, M. Strasser, F. Buggenthin, J.S. Feigelman, J. Krumsiek, A.J. van den Berg, M. Endelev, M. Etzrodt, C. Marr, F.J. Theis, and T. Schroeder, *Software tools for single-cell tracking and quantification of cellular and molecular properties*. *Nat Biotechnol*, 2016. **34**(7): p. 703-6.
120. Guesdon, J.-L., *In Vivo Labeling of DNA Probes with 5-BrdU*, in *Nonradioactive Labeling and Detection of Biomolecules*, K. C., Editor. 1992, Springer: Berlin, Heidelberg.
121. Gratzner, H.G., *Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: A new reagent for detection of DNA replication*. *Science*, 1982. **218**(4571): p. 474-5.
122. Simon, C., M. Gotz, and L. Dimou, *Progenitors in the adult cerebral cortex: cell cycle properties and regulation by physiological stimuli and injury*. *Glia*, 2011. **59**(6): p. 869-81.
123. Sofroniew, M.V., *Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation*. *Trends Neurosci*, 2009. **32**(12): p. 638-47.
124. Sirko, S., A. Neitz, T. Mittmann, A. Horvat-Brocker, A. von Holst, U.T. Eysel, and A. Faissner, *Focal laser-lesions activate an endogenous population of neural stem/progenitor cells in the adult visual cortex*. *Brain*, 2009. **132**(Pt 8): p. 2252-64.
125. Goss, J.R., C.E. Finch, and D.G. Morgan, *Age-related changes in glial fibrillary acidic protein mRNA in the mouse brain*. *Neurobiol Aging*, 1991. **12**(2): p. 165-70.
126. Stuesse, S.L., T. Crisp, D.L. McBurney, J.B. Schechter, J.A. Lovell, and W.L. Cruce, *Neuropathic pain in aged rats: behavioral responses and astrocytic activation*. *Exp Brain Res*, 2001. **137**(2): p. 219-27.
127. Wu, Y., A.Q. Zhang, and D.T. Yew, *Age related changes of various markers of astrocytes in senescence-accelerated mice hippocampus*. *Neurochem Int*, 2005. **46**(7): p. 565-74.

128. Boisvert, M.M., G.A. Erikson, M.N. Shokhirev, and N.J. Allen, *The Aging Astrocyte Transcriptome from Multiple Regions of the Mouse Brain*. Cell Rep, 2018. **22**(1): p. 269-285.
129. Clarke, L.E., S.A. Liddelow, C. Chakraborty, A.E. Munch, M. Heiman, and B.A. Barres, *Normal aging induces A1-like astrocyte reactivity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2018. **115**(8): p. E1896-E1905.
130. Jiang, T. and E. Cadenas, *Astrocytic metabolic and inflammatory changes as a function of age*. Aging Cell, 2014. **13**(6): p. 1059-67.
131. Gottfried, C., F. Tramontina, D. Goncalves, C.A. Goncalves, E. Moriguchi, R.D. Dias, S.T. Wofchuk, and D.O. Souza, *Glutamate uptake in cultured astrocytes depends on age: a study about the effect of guanosine and the sensitivity to oxidative stress induced by H(2)O(2)*. Mech Ageing Dev, 2002. **123**(10): p. 1333-40.
132. Garcia-Matas, S., J. Gutierrez-Cuesta, A. Coto-Montes, R. Rubio-Acero, C. Diez-Vives, A. Camins, M. Pallas, C. Sanfeliu, and R. Cristofol, *Dysfunction of astrocytes in senescence-accelerated mice SAMP8 reduces their neuroprotective capacity*. Aging Cell, 2008. **7**(5): p. 630-40.
133. Buga, A.M., M. Sascau, C. Pisoschi, J.G. Herndon, C. Kessler, and A. Popa-Wagner, *The genomic response of the ipsilateral and contralateral cortex to stroke in aged rats*. J Cell Mol Med, 2008. **12**(6B): p. 2731-53.
134. Acaz-Fonseca, E., J.C. Duran, P. Carrero, L.M. Garcia-Segura, and M.A. Arevalo, *Sex differences in glia reactivity after cortical brain injury*. Glia, 2015. **63**(11): p. 1966-1981.
135. Bushong, E.A., M.E. Martone, Y.Z. Jones, and M.H. Ellisman, *Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains*. J Neurosci, 2002. **22**(1): p. 183-92.
136. Barres, B.A., *Designing and troubleshooting immunopanning protocols for purifying neural cells*. Cold Spring Harb Protoc, 2014. **2014**(12): p. 1342-7.
137. Barres, B.A., B.E. Silverstein, D.P. Corey, and L.L. Chun, *Immunological, morphological, and electrophysiological variation among retinal ganglion cells purified by panning*. Neuron, 1988. **1**(9): p. 791-803.
138. Beckervordersandforth, R., P. Tripathi, J. Ninkovic, E. Bayam, A. Lepier, B. Stempfhuber, F. Kirchhoff, J. Hirrlinger, A. Haslinger, D.C. Lie, J. Beckers, B. Yoder, M. Irmeler, and M. Gotz, *In vivo fate mapping and expression analysis reveals molecular hallmarks of prospectively isolated adult neural stem cells*. Cell Stem Cell, 2010. **7**(6): p. 744-58.
139. Foo, L.C., *Purification of rat and mouse astrocytes by immunopanning*. Cold Spring Harb Protoc, 2013. **2013**(5): p. 421-32.
140. Foo, L.C., *Purification and culture of astrocytes*. Cold Spring Harb Protoc, 2013. **2013**(6): p. 485-7.
141. Ferent, J., L. Cochard, H. Faure, M. Taddei, H. Hahn, M. Ruat, and E. Traiffort, *Genetic activation of Hedgehog signaling unbalances the rate of neural stem cell renewal by increasing symmetric divisions*. Stem Cell Reports, 2014. **3**(2): p. 312-23.
142. El-Zaatari, M., S. Daignault, A. Tessier, G. Kelsey, L.A. Travnikar, E.F. Cantu, J. Lee, C.M. Plonka, D.M. Simeone, M.A. Anderson, and J.L. Merchant, *Plasma Shh levels reduced in pancreatic cancer patients*. Pancreas, 2012. **41**(7): p. 1019-28.
143. Enwere, E., T. Shingo, C. Gregg, H. Fujikawa, S. Ohta, and S. Weiss, *Aging results in reduced epidermal growth factor receptor signaling, diminished olfactory*

- neurogenesis, and deficits in fine olfactory discrimination.* J Neurosci, 2004. **24**(38): p. 8354-65.
144. Encinas, J.M., T.V. Michurina, N. Peunova, J.H. Park, J. Tordo, D.A. Peterson, G. Fishell, A. Koulakov, and G. Enikolopov, *Division-coupled astrocytic differentiation and age-related depletion of neural stem cells in the adult hippocampus.* Cell Stem Cell, 2011. **8**(5): p. 566-79.
 145. Lee, S.W., G.D. Clemenson, and F.H. Gage, *New neurons in an aged brain.* Behav Brain Res, 2012. **227**(2): p. 497-507.
 146. Calzolari, F., J. Michel, E.V. Baumgart, F. Theis, M. Gotz, and J. Ninkovic, *Fast clonal expansion and limited neural stem cell self-renewal in the adult subependymal zone.* Nat Neurosci, 2015. **18**(4): p. 490-2.
 147. Rando, T.A., *Stem cells, ageing and the quest for immortality.* Nature, 2006. **441**(7097): p. 1080-6.
 148. Drummond-Barbosa, D., *Stem cells, their niches and the systemic environment: an aging network.* Genetics, 2008. **180**(4): p. 1787-97.
 149. Verkhratsky, A., R. Zorec, J.J. Rodriguez, and V. Parpura, *Astroglia dynamics in ageing and Alzheimer's disease.* Curr Opin Pharmacol, 2016. **26**: p. 74-9.
 150. Anderson, M.A., J.E. Burda, Y. Ren, Y. Ao, T.M. O'Shea, R. Kawaguchi, G. Coppola, B.S. Khakh, T.J. Deming, and M.V. Sofroniew, *Astrocyte scar formation aids central nervous system axon regeneration.* Nature, 2016. **532**(7598): p. 195-200.
 151. Marsh, S.E. and M. Blurton-Jones, *Neural stem cell therapy for neurodegenerative disorders: The role of neurotrophic support.* Neurochem Int, 2017. **106**: p. 94-100.
 152. Oberheim, N.A., T. Takano, X. Han, W. He, J.H. Lin, F. Wang, Q. Xu, J.D. Wyatt, W. Pilcher, J.G. Ojemann, B.R. Ransom, S.A. Goldman, and M. Nedergaard, *Uniquely hominid features of adult human astrocytes.* J Neurosci, 2009. **29**(10): p. 3276-87.
 153. Buskila, Y., P.P. Breen, J. Tapson, A. van Schaik, M. Barton, and J.W. Morley, *Extending the viability of acute brain slices.* Sci Rep, 2014. **4**(1): p. 5309.
 154. Skoda, A.M., D. Simovic, V. Karin, V. Kardum, S. Vranic, and L. Serman, *The role of the Hedgehog signaling pathway in cancer: A comprehensive review.* Bosn J Basic Med Sci, 2018. **18**(1): p. 8-20.

13. Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Schematische Darstellung der Zellen des zentralen Nervensystems	6
Tabelle 1. Etablierte astrogliale Marker-Proteine und deren Vorkommen in einer Auswahl von astroglialen Zellpopulationen.	8
Abbildung 2. Verschiedene Astrozyten-Unterformen	9
Abbildung 3. Schematische Darstellung der Selbsterneuerung und Tripotenz neuraler Stammzellen	10
Abbildung 4. Schematische Darstellung adulter neuraler Stammzellnischen in Gehirnen vom Nagetier und vom Menschen	11
Abbildung 5. Vergleich eines murinen und humanen parenchymatösen Astrozyten	13
Abbildung 6. Schematische Darstellung der Effekte des aktivierten SHH-Signalweges in reaktiven Astrozyten.	17
Tabelle 2. Benutzte Geräte mit Herstellerangabe	20
Tabelle 3. Benutzte Einwegartikel mit Herstellerangabe	22
Tabelle 4. Primäre Antikörper mit Hersteller- und Verdünnungsangabe	26
Abbildung 7. Schematische Darstellung des Teilungsverhaltens von Stammzellen	33
Abbildung 8. Altersbedingte Veränderungen der astroglialen Zellpopulation in der gesunden somatosensorischen grauen Substanz (Teil 1)	35
Abbildung 9. Altersbedingte Veränderungen der astroglialen Zellpopulation in der gesunden somatosensorischen grauen Substanz (Teil 2)	36
Abbildung 10. Altersbedingte Veränderung glialer Zellen in der kortikalen grauen Substanz	37
Abbildung 11. Altersbedingte Veränderungen der astroglialen Zellpopulation in der geschädigten somatosensorischen grauen Substanz (Teil 1)	39
Abbildung 12. Altersbedingte Veränderungen der astroglialen Zellpopulation in der geschädigten somatosensorischen grauen Substanz (Teil 2)	40
Abbildung 13. Proliferationsanalyse der somatosensorischen grauen Substanz nach Aktivierung des SHH-Signalweges	42
Abbildung 14. Time-Lapse-Videomikroskopie und Stammbaumanalyse von kortikalen Zellkulturen (Teil 1)	45
Abbildung 15. Time-Lapse-Videomikroskopie und Stammbaumanalyse von kortikalen Zellkulturen (Teil 2)	46
Abbildung 16. Veränderung der Proliferationsaktivität durch <i>in vitro</i> Aktivierung des SHH-Signalweges (Teil 1)	47
Abbildung 17. Veränderung der Proliferationsaktivität durch <i>in vitro</i> Aktivierung des SHH-Signalweges (Teil 2)	48