

Aus dem
Physiologischen Institut
Institut der Universität München
Lehrstuhl für Physiologische Genomik
Lehrstuhlinhaberin: Prof. Dr. Magdalena



Hirnregionsspezifische Reaktion von Gliazellen auf invasive und nicht-penetrierende Verletzungen des Rückenmarks

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

vorgelegt von

Jonas Kraska

aus
Göttingen
Jahr
2023

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Berichterstatter:	PD Dr. Swetlana Sirko
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. Rainer Glaß Prof. Dr. Thomas Misgeld
Dekan:	Prof. Dr. med. Thomas Gudermann
Tag der mündlichen Prüfung:	09.11.2023

Inhaltsverzeichnis

Widmung	III
Abbildungsverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis	V
1. Einleitung	1
1.1 Gliazellen des zentralen Nervensystems	2
1.1.1 Astroglia	4
1.1.2 Oligodendroglia	6
1.1.3 Mikroglia	7
1.2 Reaktive Gliose als universelle jedoch nicht stereotype Reaktion glialer Zellen....	8
1.2.1 Pathologiespezifische Formen reaktiver Gliose.....	10
1.3 Fragestellung dieser Arbeit.....	13
2. Material & Methoden.....	15
2.1 Material	15
2.1.1 Geräte	15
2.1.2 Software.....	15
2.1.3 Verbrauchsmaterialien	16
2.1.4 Medikamente.....	16
2.1.5 Chemikalien	17
2.1.6 Antikörper, Fluoreszenzen und Tracer	17
2.1.7 Puffer und Lösungen.....	18
2.2 Methoden	21
2.2.1 Mausmodell.....	21
2.2.1.1 Anästhesie.....	21
2.2.1.2 Dorsale Hemisektion	22
2.2.1.3 Kontrolloperation.....	22
2.2.1.4 Hautschnitt.....	23
2.2.1.5 Stichwunde.....	23
2.2.1.6 Perfusion und Gewebeproben.....	24
2.2.1.7 Permeabilitätsanalyse der Blut-Hirn-Schranke	24
2.2.2 Immunhistochemische Färbung	25

2.2.3 Mikroskopische Analyse	26
2.2.4 Quantifizierung und statistische Auswertung	27
3. Ergebnisse	29
3.1 Reaktive Gliose im zerebralen Kortex nach invasiver Rückenmarksverletzung....	32
3.2 Vergrößerter Pool proliferierender Zellen im zerebralen Hirnparenchym	36
3.3 Charakterisierung proliferierender Zellen im zerebralen Kortex.....	39
3.4 Verschiedene funktionelle und histologische Kompartimente im Vergleich	42
3.5 Veränderungen innerhalb des Nucleus ventralis posterior des Thalamus.....	46
3.6 Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke nach Rückenmarksverletzung	48
3.7 Einflussfaktoren auf die beobachteten reaktiven Gliaveränderungen.....	50
4. Diskussion	55
4.1 Reaktiven Gliose im zerebralen Kortex nach Rückenmarksverletzung.....	56
4.2 Konsequenzen zellulärer Gliareaktionen nach Rückenmarksverletzungen.....	57
4.2.1 Rolle reaktiver Astrozyten im Kontext pathologischer Veränderungen	59
4.2.2 Konsequenzen reaktiver Mikrogliose und Neuroinflammation	62
4.2.3 Neuronale Plastizität im Rahmen einer reaktiven Gliose	65
4.3 Mögliche neurale und extraneurale Signalkaskaden.....	68
4.3.1 Hämatogenen Signalvermittlung.....	68
4.3.2 Signalvermittlung über das Liquorsystem	70
4.3.3 Anpassung an neuronale Dysfunktion als Auslöser glialer Reaktionen.....	70
4.3.4 Potenzielle Beteiligung zellulärer Signalwege	74
4.4 Bedeutung einer reaktive Gliose nach Rückenmarksverletzung	76
4.5 Limitationen und Ausblick	77
5. Zusammenfassung	79
6. Literaturverzeichnis	80
Danksagung	V
Erklärung an Eides statt	VI
Lebenslauf.....	VII
Wissenschaftliche Veröffentlichungen	VIII
Anhang.....	IX
ImageJ-Plugin.....	IX

Widmung

Für meine Eltern

Andrea Barnieck, geb. Sterr

Dirk Rolf Kraska

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Gliazellen	2
Abb. 2	Schematische Darstellung einer reaktiven Astroglieose	11
Abb. 3	Analysierte Hirnregionen	26
Tabelle 1	Einstellungen Zeiss LSM 710 Mikroskop	27
Abb. 4	Übersicht experimenteller Gruppen	30
Abb. 5	Experimentelles Paradigma	31
Abb. 6	Induktion einer reaktiven Gliose des zerebralen Kortex nach invasiver Rückenmarksverletzung	33
Abb. 7	Quantifizierung der veränderten Expression glialer Marker im zerebralen Kortex	34
Abb. 8	Exemplarische Quantifizierung von Iba1 ⁺ Zellen in der kortikalen grauen Substanz	35
Abb. 9	Veränderungen in der proliferativen Kapazität von ZNS-Parenchymzellen nach invasiver Rückenmarksverletzung	37
Abb. 10	Quantifizierung kortikaler Ki67 ⁺ Zellen nach Intervention	38
Abb. 11	Charakterisierung von kortikal proliferierenden Zellen nach invasiver Rückenmarksverletzung und Kontrolloperation	40
Abb. 12	Vergleich intrakortikaler histologischer Kompartimente	43
Abb. 13	Vergleich interkortikaler funktioneller Kompartimente	45
Abb. 14	Reaktive Veränderungen im Nucleus ventralis posterior des Thalamus	47
Abb. 15	Untersuchung der Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke als möglicher Weg einer systemischen Signaltransduktion	49
Abb. 16	Vergleichbare zelluläre Reaktion in der Kontrollgruppe mir nicht ZNS-penetrierender Wirbelsäulenoperation	51
Abb. 17	Untersuchung der Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke als möglicher Weg einer systemischen Signaltransduktion	53
Abb. 18	Zelluläre Phasen und Verlauf der multizellulären Reaktion nach lokalem ZNS Trauma	58
Abb. 19	Durch GFAP beeinflusste physiologische Funktionen von Astrozyten	60
Abb. 20	Mikroglia im Verlauf einer Neuroinflammation	63
Abb. 21	Beitrag von Astrozyten und Mikroglia zur neuronalen Plastizität	66
Abb. 22	Systematische Darstellung von Verläufen relevanter Nervenbahnen beim Menschen	71

Abkürzungsverzeichnis

µm	Mikrometer
Abb	Abbildung
ADAMTS	a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin-1-like domains
ANA	Kontrollgruppe: Anästhesie
ATP	Adenosintriphosphat
BHS	Blut-Hirn-Schranke
Ca	Calcium
CC	corpus calosum (Commissura magna, Balken)
Cl	Chlorid
CNTF	ciliary neurotrophic factor
CSPG	chondroitin sulfate proteoglycan
DAMP	damage-associated molecular pattern
dpi	days post intervention/injury
GABA	gamma-aminobutyric acid
GFAP	glial fibrillary acidic protein
GM	grey matter (graue Substanz des Hirnparenchyms)
GP	glycoprotein
HC	Hippocampus
HEMI	Interventionsgruppe: dorsale Hemisektion
Iba1	ionized calcium-binding adapter molecule 1
IL	Interleukin
JAK	Januskinase
K	Kalium
Ki67	Kiel-67 Protein
LIF	leukemia inhibitory factor
MC	motor cortex (motorisches Kortexareal)
NAIV	Kontrollgruppe: unverletzte Tiere
NG2	neural/glial antigen 2
OPC	oligodendrocyte progenitor cells
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
RNS	reactive nitrogen species
ROS	reactive oxygen species
SASP	senescence-associated secretory phenotype
SC	somatosensory cortex (somatosensorisches Kortexareal)
SH2	src-homology 2
SHAM	Kontrollgruppe: Scheinoperation
SKIN	Kontrollgruppe: Hautschnitt
STAT	signal transducers and activators of transcription
TH	Thalamus
TNF-α	Tumornekrosefaktor-α
vs	versus
VT	Ventrikel
WM	white matter (weiße Substanz des Hirnparenchyms)
ZNS	zentrales Nervensystem

1. Einleitung

Aufgrund fehlender kurativer Therapieoptionen können die Mehrheit von Erkrankungen des zentralen Nervensystems (ZNS) bislang lediglich symptomatisch behandelt werden und führen daher häufig zu einer nachhaltigen Reduktion von Lebensqualität und Lebenserwartung für betroffene Patienten (Kassebaum *et al.*, 2016). Ohne spezifische Biomarker und effektive Screening-Methoden ist ein individuelles Assessment sowohl im akuten Geschehen als auch im Rahmen einer möglichen Vorsorge nach wie vor ineffizient oder gar nicht realisierbar.

Obwohl in den letzten Jahren intensiver Forschung viele neue Erkenntnisse bezüglich des ZNS gewonnen wurden, ist die Wiederherstellung der funktionellen als auch strukturellen Organisation des Gewebes nach traumatischen ZNS-Verletzungen oder neurodegenerativen Erkrankungen bisher nicht möglich. Mittlerweile ist zwar sehr viel mehr über die physiologischen Gegebenheiten neuronaler Netzwerke und facettenreichen Interaktionen verschiedener Zellpopulationen innerhalb des intakten ZNS bekannt (Jäkel and Dimou, 2017), jedoch erschwert die enorme Komplexität und Heterogenität eindeutige Rückschlüsse auf Einflussfaktoren pathologischer Prozesse.

Um diese Lücke in der Patientenversorgung zukünftig schließen zu können, sind deshalb zum aktuellen Forschungsstand vor allem zusätzliche Daten zu konkreten pathophysiologischen Prozessen des ZNS im Kontext verschiedener Pathologien dringend erforderlich. Durch ihren für die übergeordnete Funktionalität des ZNS essenziellen Beitrag (Allen and Lyons, 2018) bieten dabei vor allem Gliazellen das Potenzial das Zusammenspiel reaktiver Veränderungen nachzuvollziehen und in der Zukunft neue pathologiespezifische Therapieansätze erarbeiten zu können. Da insbesondere über die zellulären Reaktionen innerhalb des gesamten ZNS in Folge primär lokaler Pathologien bisher wenig bekannt ist, beschäftige ich mich in dieser Studie mit reaktiven Veränderungen von zerebralen Gliazellen nach Rückenmarksverletzungen.

1.1 Gliazellen des zentralen Nervensystems

Gliazellen wurden erstmalig 1858 von Rudolf Virchow als „Nervenkitt“ beschrieben und galten lange Zeit als die Stützzellen des ZNS, die in dieser Funktion als Bindegewebe die Anzahl der Neuronen um das bis zu 10-fache übertreffen würden (Abb. 1A) (Virchow, 1856; Retzius, Gustaf, Fürst and Stach, 1921). Zu Beginn des 20. Jahrhunderts wurden bereits diverse Theorien zu spezifischeren Funktionen und Interaktionsmöglichkeiten dieser Zellen postuliert, die allerdings erst durch die Forschungsergebnisse der letzten 40 Jahre aufgearbeitet werden konnten. So wissen wir heute, dass es sich bei Gliazellen um eine sehr heterogene Zellpopulation mit verschiedenen Subtypen handelt (Abb. 1B) (Anderson, Ao and Sofroniew, 2014; Seifert and Steinhäuser, 2018; Verkhratsky and Nedergaard, 2018; Masuda *et al.*, 2020). Diese erfüllen spezifische Aufgaben, die übergeordnete Funktionen des ZNS ermöglichen, sodass die Bezeichnung als Stützzellen mittlerweile überholt ist. Unter Berücksichtigung regionsspezifischer Unterschiede zeigen aktuelle Untersuchungen, dass es zahlenmäßig wahrscheinlich etwa ähnlich viele Gliazellen wie Neurone im ZNS gibt (von Bartheld, Bahney and Herculano-Houzel, 2016). Makrogliale Zellen, im Gegensatz zu Mikroglia, sind ektodermalen Ursprungs und unterteilen sich übergeordnet in Astroglia und Oligodendroglia (Murabe and Sano, 1982; Ginhoux *et al.*, 2010; Verkhratsky, Ho and Parpura, 2019). Im Unterschied zu Neuronen

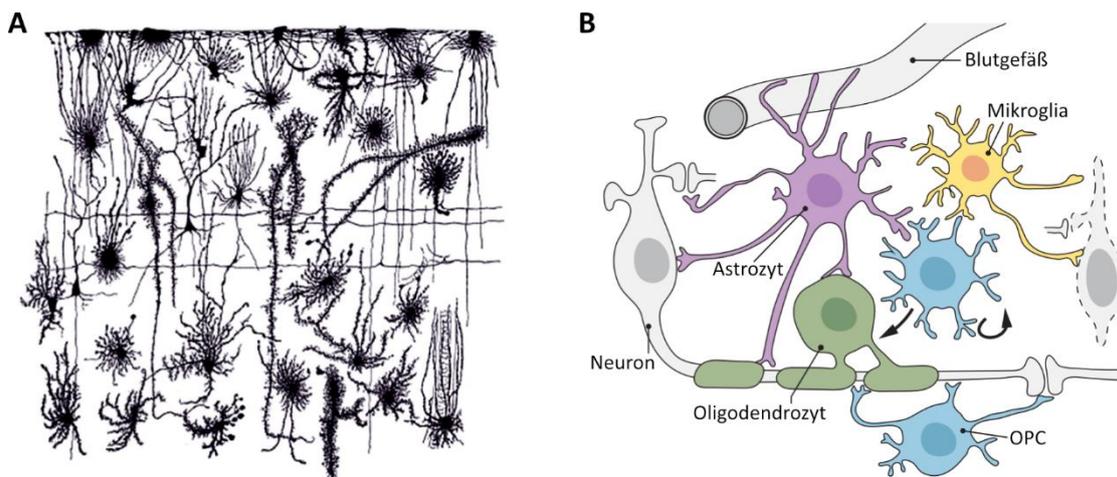


Abb. 1 Gliazellen

A Histologische Darstellung der neuroglialen Diversität innerhalb des Kortexgewebes eines Fötus.

Quelle : Retzius *et al.* „*Biologische Untersuchungen*“ (Retzius, Fürst and Stach, 1921)

B Schematische Übersicht der verschiedenen glialen Subpopulationen des ZNS und ihrer intrazellulären Interaktionen.

Quelle: *In abgeänderter Form übernommen von Allen et al. „Glia as architects of central nervous system formation and function“ (Allen and Lyons, 2018)*

sind Glia nicht zur elektrischen Signalweiterleitung durch Aktionspotenziale fähig. Allerdings ist ohne den Beitrag von Gliazellen wiederum auch keine Neurotransmission möglich (Allen and Lyons, 2018). Astrozyten beispielsweise nehmen sowohl durch ihren Metabolismus als auch durch intrazellulären Ca^{2+} -Anstieg getriggerte Exozytose von Neurotransmittern modulierenden Einfluss auf die neuronale Aktivität (Bazargani and Attwell, 2016). Weiterhin bleibt Gliazellen im adulten ZNS nach aktuellem Forschungsstand das Potenzial zur Zellteilung erhalten (Colodner *et al.*, 2005), wohingegen ausdifferenzierte Neurone als final post-mitotisch angesehen werden (Marlier *et al.*, 2020). Die mitotische Aktivität von Gliazellen ist dabei stark populationsabhängig. So proliferieren Vorläuferzellen der Oligodendroglia regelmäßig zur Selbsterneuerung und Steuerung der eigenen Populationshomöostase (Allen and Lyons, 2018). Ausdifferenzierte Astrozyten sowie Oligodendrozyten hingegen können nur unter pathologischen Einflüssen mit einem Wiedereintritt in einen aktiven Zellzyklus reagieren (Bardehle *et al.*, 2013). Eine Ausnahme stellt hierbei eine spezialisierte Population astroglialer Zellen dar, die regionspezifisch limitiert als adulte Stammzellen fungieren.

1.1.1 Astroglia

Astrozyten sind eine sehr heterogene Population von Gliazellen sowohl im Hinblick auf ihre spezifischen Funktionen als auch morphologisch-strukturelle Organisation (Oberheim, Goldman and Nedergaard, 2012). Protoplasmatische Astrozyten der grauen Substanz kennzeichnen sich als Zellen mit sternförmigen Zellfortsätzen und bilden durch diese territoriale Organisation sogenannte Domänen aus. Fibrilläre Astrozyten der weißen Substanz sind hingegen zu den Axonen parallel angeordnet und zeigen in der Regel deutlich weniger Zellfortsätze als protoplasmatische Astrozyten. Weitere regionsspezifische Subpopulationen sind darüber hinaus auch Radiaglia, perivaskuläre Astrozyten sowie velate und interlaminare Astrozyten.

Innerhalb ihrer direkten Mikroumgebung kommen Astrozyten ihren sehr spezifischen Aufgaben nach. Mit Ihren Ausläufern umhüllen sie den Großteil aller neuronalen Synapsen und bilden neurogliale Einheiten, auch triparte Synapsen genannt (Verkhratsky, 2009) – bestehend aus prä- und postsynaptischen neuronalen Strukturen sowie Astrozytenfortsätzen. Hier eliminieren Astrozyten Neurotransmitter und deren Metabolite aus dem synaptischen Spalt, was zu einer präzisen Signalübertragung führt und ein Abdiffundieren von neuroaktiven Substanzen unterbindet. Aufgenommene Neurotransmitter (Glutamat, GABA) werden von Astrozyten weiter metabolisiert (Bak, Schousboe and Waagepetersen, 2006), wodurch auf der einen Seite unerwünschte Nebenwirkungen wie beispielsweise die von Glutamat ausgehende Neurotoxizität verhindert werden (Lau and Tymianski, 2010). Auf der anderen Seite werden dadurch essenzielle Ausgangsprodukte für die Synthese von Transmittern für benachbarte Neuronen bereitgestellt (Bak, Schousboe and Waagepetersen, 2006). Allerdings scheinen sowohl Ausmaß als auch Potenz dieser astroglialen Beteiligung an der Signalübertragung im ZNS umfangreicher zu sein als zuerst angenommen, sodass man mittlerweile von einer Gliotransmission spricht (Verkhratsky and Nedergaard, 2018). Zudem hat man festgestellt, dass einige neuroaktive Substanzen (z.B. ATP) ebenfalls den Aktivitätszustand von Astrozyten beeinflussen (Hamilton *et al.*, 2008).

Astrozyten sind darüber hinaus an zahlreichen homöostatischen Funktionen aktiv beteiligt. Diese umfassen sowohl Ionen (K^+ , Cl^- , Ca^{2+}), den Säure-Basen-Haushalt, das interstitielle Flüssigkeitsvolumen sowie Substrate (Glukose) und potenziell toxische Nebenprodukte (Ammonium) des ZNS-Metabolismus (Verkhatsky and Nedergaard, 2018; Rasmussen *et al.*, 2020). Um dies zu ermöglichen, bilden Astrozyten regionsspezifisch durch interzelluläre Connexin-Verbindungen ein funktionelles Synzytium aus (Giaume and McCarthy, 1996), in dem angesprochene Stoffe entsprechend ihrer Konzentration passiv verschoben werden. Als funktionelle Komponente der Blut-Hirn-Schranke (BHS) können Astrozyten außerdem aktiv Stoffe aus der Peripherie aufnehmen und ins Blut abgeben (Castro Dias *et al.*, 2019). Die neurovaskuläre Kopplung führt hierbei dazu, dass Astrozyten mittels vasoaktiver Substanzen die lokale Durchblutung bedarfsgerecht an die Aktivität des ZNS-Gewebes anpassen können (Mulligan and MacVicar, 2004).

Über diese vielfältigen Funktionen hinaus sind Astrozyten sowohl an der Synaptogenese (Mauch *et al.*, 2001) als auch an der Reifung und Stabilisation neuer Synapsen innerhalb bestehender neuronaler Netze beteiligt (Chung *et al.*, 2015). Auf diese Weise nehmen Astrozyten umfassenden Einfluss auf die synaptische Plastizität und somit auch auf die Funktionalität übergeordneter neuronaler Netzwerke verantwortlich für integrative Leistungen des Gehirns.

Eine spezialisierte Subpopulation der Astroglia ist darüber hinaus als neurale Stammzellen (NSC) in den neurogenen Nischen – der Subventrikulären Zone und der Subgranulären Zone des Hippocampus – direkt an der adulten Neurogenese beteiligt (Falk and Götz, 2017; Schneider, Karpf and Beckervordersandforth, 2019). Diese dient der kontinuierlichen Erneuerung von regionsspezifischen Neuronen des Bulbus olfactorius sowie des Hippocampus. Aber auch parenchymale Astrozyten nach invasiver Kortexläsion teilen sich diverse Merkmale mit den NSC und besitzen *in vitro* das Potenzial multipotente Neurosphären bilden zu können (Robel, Berninger and Götz, 2011; Sirko *et al.*, 2013; Götz *et al.*, 2015). Das Ausmaß und die Umstände unter denen reaktiv proliferierende Gliazellen *in vivo* wieder zu einer Zellteilung fähig sind und welche Zelltypen daraus schließlich hervorgehen können ist nicht geklärt.

1.1.2 Oligodendroglia

Oligodendrozyten stellen neben Astrozyten die zweite Subpopulation der Makrogliazellen dar, die hauptsächlich mit der Aufgabe der Axonmyelinisierung assoziiert ist. Dabei können Oligodendrozyten Myelinscheiden für einzelne Axonabschnitte vieler verschiedener Neuronen in direkter Nachbarschaft bilden. Oligodendrozyten ermöglichen dadurch eine deutlich höhere Leitungsgeschwindigkeiten entlang einzelner Axone (Salzer and Zalc, 2016). Auch die Dichte an Axonen im ZNS-Gewebe kann durch die verminderte ephaptische Erregungsübertragung auf benachbarte Neurone effektiv gesteigert werden. Nicht zu vergessen ist dabei, dass der verminderte Ladungsverlust und die nur punktuell benötigte Verschiebung von Ionenkonzentrationen zu einer signifikanten Energieeinsparung im Rahmen der neuronalen Transmission führt (Morell and Quarles, 1999). Die Summe dieser Effizienzsteigerungen bildet die Grundlage für die übergeordneten Funktionen des ZNS inklusive komplexer kognitiver, motorischer und sensorischer Leistungen. Besonders deutlich wird dies in Anbetracht der Auswirkungen degenerativer Erkrankungen wie zum Beispiel der Multiplen Sklerose, bei denen primär die Myelinisierung im ZNS betroffen ist (Lassmann, 2018). Da der Myelinisierungsprozess bei Säugetieren zum Zeitpunkt der Geburt noch nicht abgeschlossen ist, sind Oligodendrozyten ebenso wie andere Gliazellen an plastischen Prozessen während der adaptiven Ausreifung des ZNS beteiligt (Barateiro, Brites and Fernandes, 2016).

Im Gegensatz zu Astrozyten und Mikroglia wird die Population der Oligodendrozyten lebenslang nachgebildet. NG2-Glia, auch OPCs (oligodendrocyte progenitor cells) genannt, sind Vorläuferzellen und werden zu undifferenzierten nicht-myelinisierenden Oligodendrozyten gezählt. Sie sind hauptsächlich als regeneratives Reservoir für ihre Zelllinie beispielsweise nach invasiven ZNS-Verletzungen bekannt (Trotter, Karram and Nishiyama, 2010). Durch ihr erhaltenes Proliferationspotential und die Fähigkeit zur Migration können ausgehend von diesen Vorläufern Oligodendroglia lokal gezielt vermehrt werden. Ob aus NG2-Glia auch weitere Zelltypen im ZNS hervorgehen können, ist Gegenstand aktueller Forschung (Richardson *et al.*, 2011; Dimou and Götz, 2014). Auch neuronale Modulationsmöglichkeiten und ein Beitrag zur Neurogenese werden

aktuell diskutiert (Trotter, Karram and Nishiyama, 2010).

1.1.3 Mikroglia

Mikroglia werden allgemein als Gewebsmakrophagen des ZNS bezeichnet und sind wie andere gliale Zellen in allen Regionen des Gehirns zu finden (Kettenmann *et al.*, 2011). Obwohl die Abstammung vermuten lässt, dass es sich funktionell um nicht an der neuronalen Signalvermittlung beteiligte Zellen handelt, gibt es mittlerweile zahlreiche Erkenntnisse, die eine Zuordnung zu Gliazellen weitaus zutreffender erscheinen lassen. So konnte nachgewiesen werden, dass Mikroglia direkt und indirekt synaptische Verbindungen beeinflussen und sowohl bei der Stabilisierung von bestehenden Synapsen als auch deren Abbau beteiligt sind (Casano and Peri, 2015). Darüber hinaus können Mikroglia während der ZNS-Reifung auch regionsspezifisch auf die Angio- sowie Neurogenese Einfluss nehmen (Casano and Peri, 2015). Mit diesen Mechanismen spielt auch diese gliale Zellpopulation eine wichtige Rolle für die Entwicklung und Plastizität des ZNS.

Als Immuneffektorzellen des ZNS besteht die Hauptaufgabe von Mikroglia in der fortlaufenden Überwachung ihrer Mikroumgebung und der adäquaten Reaktion auf pathologische Veränderungen. Entsprechend ihrer Aktivität kann man Mikroglia in zwei ineinander übergehende Zustände unterteilt, die durch spezifische Veränderungen auf morphologischer, struktureller, transkriptioneller und funktioneller Ebene charakterisiert sind (Lynch, 2009). So zeigen ruhende Mikroglia kleine Somata und verzweigte filigrane Zellfortsätze, die sehr agil sind und kontinuierlich die Umgebung abtasten (Nimmerjahn, Kirchhoff and Helmchen, 2005). Dabei bewegen sich diese Zellanteile auch gezielt auf neuronale Synapsen zu und interagieren mit der neuronalen Signalvermittlung und tragen zur synaptischen Plastizität bei.

Unter dem Einfluss von pathologischen Prozessen gehen Mikroglia in einen aktivierten Zustand über, der mit Zellhypertrophie einhergeht (Hanisch and Kettenmann, 2007). Die Zellen werden mobiler und bewegen sich zytokingesteuert mit ramifizierten Zellfortsätzen präzise auf auslösende Prozesse zu und phagozytieren Pathogene,

Ablagerungen und Zelltrümmer. Im Rahmen der Immunantwort sind Mikroglia antigenpräsentierende Zellen und nutzen Apoptoseinduktion sowie zytotoxischen oxidativen Stress, um beispielsweise infizierte Zellen zu eliminieren (Kettenmann *et al.*, 2011). Mittels Zyto- und Interleukinen (TNF- α , IL-1, IL-18) kommunizieren sie dabei mit anderen Zellen, um die Immunreaktion gezielt zu koordinieren und falls notwendig die Rekrutierung weiterer Mikroglia bis hin zum Einwandern peripherer Monozyten aus dem Blut zu initiieren (Shechter *et al.*, 2009).

1.2 Reaktive Gliose als universelle jedoch nicht stereotype Reaktion glialer Zellen

Im Rahmen einer reaktiven Gliose reagieren Gliazellen mit einer erhöhten Aktivität auf pathologische Prozesse innerhalb des ZNS. Da jede Art von Pathologie wie neurodegenerative oder neoplastische Prozesse sowie auch ZNS-invasive Gewebsschäden im Rahmen von Traumata, zerebralen Blutungen, Hypoxie oder Infektionen eine gliale Reaktion auslösen (Pekny *et al.*, 2016), äußert sich diese in enorm heterogenen und multifaktoriellen Veränderungen. Abhängig von der Art, Intensität und Ausprägung der Pathologie sowie regionsspezifischen Milieus in einzelnen histologischen Kompartimenten sind daher bereits unterschiedliche Ausprägungsformen einer reaktiven Gliose beschrieben worden (Burda and Sofroniew, 2014). Beispielsweise zeigen adulte Astrozyten im Rahmen einer durch Lipopolysacchariden getriggerten reaktiven Gliose eine eher inflammatorische Reaktion mit Expression von Chemokinen (Hamby *et al.*, 2012). Im Gegensatz dazu führen invasive ZNS-Verletzungen in ihrer Umgebung neben einer Neuroinflammation zusätzlich zur Proliferation von Astrozyten, die sich durch eine Barrierefunktion und eine vermehrte Sekretion spezifischer Bestandteile der Extrazellulärmatrix auszeichnen (Anderson, Ao and Sofroniew, 2014). Bekannt ist im Zusammenhang heterogener Gliareaktionen auch, dass die Beobachtung von einzelnen Reaktionen auf isolierte Prozesse wenig Rückschlüsse auf synergistische Effekte einer Kombination aus mehreren Stimuli zulassen, da es in diesen Fällen zu zusätzlichen unvorhergesehenen Auswirkungen kommen kann (Hamby *et al.*, 2012).

Mittlerweile ist sehr deutlich geworden, dass es sich ungeachtet der verwendeten Begrifflichkeit der „Aktivierung“ keinesfalls um ein strikt binäres Zellprogramm handelt (Escartin *et al.*, 2021). Im Gegenteil ist davon auszugehen, dass bestimmte Stadien einer zwischenzeitlich beobachtbaren reaktiven Gliose mit bisherigen Erkenntnissen möglicherweise nicht erfasst und berücksichtigt werden können (Burda and Sofroniew, 2014). Hierzu zählt vor allem die Frühphase, deren latenzlose Identifikation und Klassifikation von hoher Relevanz für den weiteren Verlauf reaktiver Veränderungen angesehen werden muss. Auch wenn mittlerweile sämtliche gliale Subpopulationen und darüber hinaus auch nicht-gliale Zelllinien aufgrund der Vielseitigkeit dieser multizellulären Reaktion mit einbezogen werden müssen, zeichnet sich eine reaktive Gliose grundlegend vor allem durch die Aktivitätszunahme von Astrozyten (Astrogliose) und Mikroglia (Mikrogliose) aus. Anzeichen für diese Reaktivität sind populationsspezifisch sowohl transkriptionelle als auch morphologische Veränderungen. In Astrozyten ist die vermehrte Expression von Intermediärfilamenten wie GFAP und Vimentin eines der prominentesten Merkmale für die vermehrte Aktivität im Kontext einer reaktiven Gliose (Pekny and Nilsson, 2005). In Mikroglia konnte mit Iba1 ebenfalls ein makrophagenspezifischer Marker isoliert werden, der in Folge einer Aktivierungszunahme vermehrt exprimiert wird (Singh-Bains *et al.*, 2019). Aussagen zu ausschließlich Mikroglia auf Basis von Iba1 folgen der Annahme, dass die histologische Trennung von Mikroglia und peripheren Gewebsmakrophagen durch die BHS bestand hat. Es gilt zu berücksichtigen, dass durch pathologische Vorgänge innerhalb des ZNS oder der BHS Makrophagen von intravasal in das ZNS-Parenchym einwandern und mit der Iba1⁺ Zellpopulation erfasst werden können. In jedem Fall wird dennoch ein deutlich überwiegender Anteil des Iba1-Signals auf Mikroglia zurückzuführen sein, was den Marker für diese Arbeit qualifiziert. Da diese Marker auch unter physiologischen Bedingungen in den jeweiligen Zellpopulationen vorhanden sind, wurden diese in der vorliegenden Studie sowohl zur Zuordnung als auch zur Einschätzung der relativen Aktivitätsveränderungen eingesetzt.

1.2.1 Pathologiespezifische Formen reaktiver Gliose

Sowohl die traumatische ZNS-Verletzung (Dewan *et al.*, 2019) als auch der zerebrale ischämische Insult (Plass *et al.*, 2014) gehören nicht zuletzt aufgrund einer großen klinischen Relevanz zu den am weitest verbreiteten Modellen zur Untersuchung von akuten pathologischen Auswirkungen auf das ZNS und dessen intrinsische Möglichkeiten zur Regeneration. Das pathologische Ereignis zeichnet sich in beiden Fällen durch einen akuten Untergang von ZNS-Gewebe mit Unterbrechung BHS aus. Zusätzlich zu den freigesetzten intrazellulären Molekülen und Zellfragmenten können auch zuvor exklusiv intravaskuläre Bestandteile ungehindert in das ZNS-Parenchym diffundieren und gegebenenfalls entsprechende Effekte hervorrufen. Beispielsweise die interstitiell stattfindende Hämostase mit Beteiligung von Fibrin und Kollagenen aber auch von Molekülen wie ATP, Thrombin, Albumin oder Sonic Hedgehog zeigen Effekte auf Gliazellen (Neary *et al.*, 2003; Shirakawa *et al.*, 2010; Sirko *et al.*, 2013). Vor allem NG2-Glia und Mikroglia werden in der Folge aktiv und migrieren auf die Läsion zu (Nimmerjahn, Kirchhoff and Helmchen, 2005; Hughes *et al.*, 2013). Lokal residente Astrozyten verweilen hingegen in ihrer ursprünglichen Domäne, schwellen initial osmotisch an und reagieren im Verlauf mit Hypertrophie ihrer Somata und Zellfortsätze (Mckee and Daneshvar, 2015). Mikroglia sowie einwandernde Immunzellen aus der Peripherie phagozytieren vorhandene Pathogene und Zelltrümmer. Darüber hinaus führt deren Immunantwort auf freigesetzte Neurotransmitter, Chemokine, Cytokine und DAMPs (danger-associated molecular patterns) zur Entstehung und Ausweitung einer Neuroinflammation (Yang and Zhou, 2019). Aus Vorläuferzellen entstehen durch Zellteilung neue Astrozyten, die mit verlängerten und ineinander verwobenen Ausläufern eine dichte Abgrenzung zum ursprünglichen Trauma bilden (Sofroniew and Vinters, 2010). Zum Beispiel auf Rückenmarksebene füllt sich der abgegrenzte Verletzungsbereich ähnlich wie bei peripheren Wundheilungsprozessen mit proliferierenden Fibroblasten und Perizyten und stellt bis zum Abschluss einer kompletten Reorganisation des Gewebes ein potenziell neurotoxisches Milieu dar (Wanner *et al.*, 2013). Experimentell konnte nachvollzogen werden, dass Astrozyten mit dieser Barrierefunktion die Ausbreitung der Läsion signifikant einschränken und zum

Erhalt von vitalem ZNS-Gewebe beitragen können (Faulkner, 2004; Wanner *et al.*, 2013). In der periläsionalen Zone kommt es zur Ausbildung einer reaktiven Gliose (Pekny and Nilsson, 2005; Wanner *et al.*, 2013). Die genauen Ursachen und Auswirkungen der reaktiven Gliazellen auf das angrenzende intakte ZNS-Parenchym sind nicht abschließend geklärt. Möglicherweise ist die reaktive Gliose hier als Bestandteil der umfassenden adaptiven funktionellen Reorganisationsprozesse anzusehen, die auch über den Zeitraum der eigentlichen Gewebsreparation hinaus stattfinden (Zhang and Chopp, 2015). Sowohl Astrozyten als auch Mikroglia und Oligodendrozyten spielen mit ihren Einflussmöglichkeiten auf die synaptische Plastizität potenziell wichtige Rollen in Anpassungsprozessen von der Verletzung betroffener neuronaler Netzwerke (Stephan, Barres and Stevens, 2012).

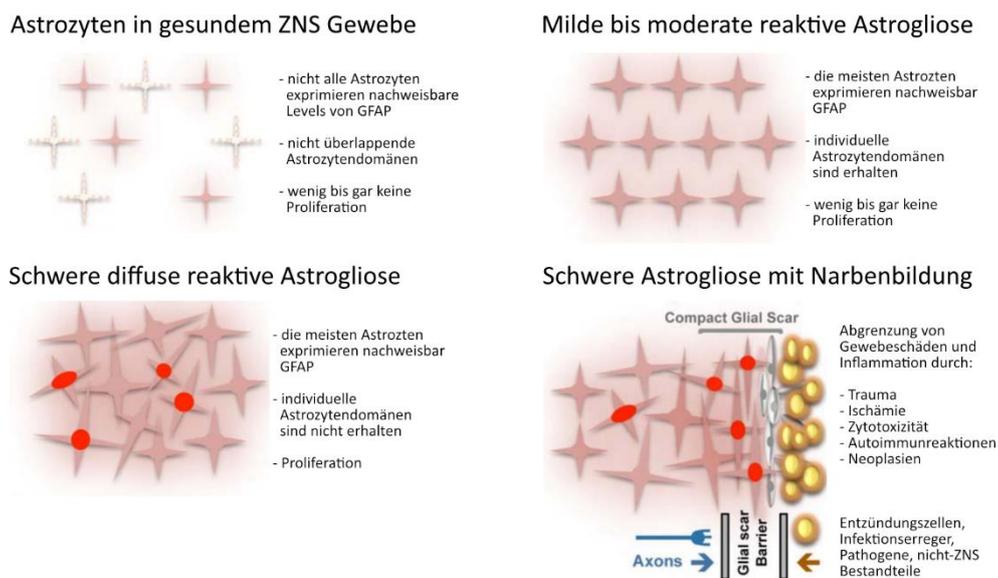


Abb. 2 Schematische Darstellung einer reaktiven Astroglie

Verschiedene Grade und Ausprägungsformen einer reaktiven Astroglie in Folge unterschiedlicher Pathologien innerhalb des ZNS.

Quelle: In abgeänderter Form übernommen von Sofroniew *et al.* „Astrocytes: biology and pathology“ (Sofroniew and Vinters, 2010)

Abseits akuter Traumata sind reaktive Gliosen auch im Kontext chronisch pathologischer Einflüsse beschrieben worden. Hierzu gehören beispielsweise fokale infektiöse Geschehen, primäre neoplastische Erkrankungen des ZNS und auch sekundär angesiedelte Metastasen (Burda and Sofroniew, 2014). Dabei wurde sowohl bei lokal definierten Infektionsherden wie beispielsweise Abszessen als auch nicht-invasiven Neoplasien ebenfalls eine Begrenzung durch eine dichte gliale Narbe beobachtet (Wang *et al.*, 2018). Diese hat nicht nur große Ähnlichkeit mit den beschriebenen Prozessen im Rahmen traumatischer ZNS-Verletzungen (Sofroniew and Vinters, 2010), sondern wird in ihrer Umgebung ebenfalls von einer reaktiven Gliose begleitet. Diffuse pathologische Prozesse und invasive Neoplasien werden hingegen – wahrscheinlich aufgrund ihrer Eigendynamik – nicht von einer gut abgrenzbaren Narbe umgeben. Allerdings werden auch in Folge dieser Pathologien spezifische Formen einer reaktiven Gliose ausgelöst, was die Abgrenzung der primären Pathologie deutlich erschwert (Rivera-Zengotita and Yachnis, 2012).

Auch neurodegenerative Erkrankungen konnten mit dem Auftreten reaktiver Gliazellen in Verbindung gebracht werden (Pekny and Nilsson, 2005). Die zu beobachtende gliale Reaktion fällt auch hier der Pathologie entsprechend meist eher diffus aus. Da viele Erkrankungen aus dem neurodegenerativen Formenkreis bis heute selbst Gegenstand nicht abgeschlossener Forschungen sind, werden je nach aktuellem Verständnis der grundlegenden Pathologie unterschiedliche Auslöser für eine reaktive Gliose diskutiert. Beispielsweise werden intraneuronale Veränderungen im Rahmen der amyotrophen Lateralsklerose und deren Auswirkungen auf die Zelle, Synapsen sowie interzelluläre Interaktionen als Auslöser für gliale Reaktivität verantwortlich gemacht (Boillée, Vande Velde and Cleveland, 2006; Maragakis and Rothstein, 2006). Chronische Epilepsien zeigen im Verlauf ebenfalls eine reaktive Gliose, die mit Neuroinflammation und vorübergehenden Veränderungen der BHS-Permeabilität einhergeht (Devinsky *et al.*, 2013). Aber auch pathologische extrazelluläre Aggregate wie das β -Amyloid im Rahmen der Alzheimer Erkrankung können zu einer Gliaaktivierung führen (Zlokovic, 2011; Prokop, Miller and Heppner, 2013).

Interessant ist hierbei, dass bei chronischen Gliosen bisher nicht zwischen einer sekundären Reaktion von Gliazellen in Folge der assoziierten Pathologie und einem primären Beitrag zu pathologischen Veränderungen ausgehend von einer glialen Dysfunktion differenziert werden kann. So beteiligen sich sowohl Astrozyten als auch Mikroglia physiologisch an der Beseitigung und Prozessierung von β -Amyloid-Plaques (Prokop, Miller and Heppner, 2013), sodass eine experimentelle Abschwächung der reaktiven Gliose in einem Mausmodell für Alzheimer zu vermehrten extrazellulären Proteinaggregaten führt (Kraft *et al.*, 2013). Bei der amyotrophen Lateralsklerose wird eine solche gliale Dysfunktion sogar direkt mit für den neuronalen Untergang verantwortlich gemacht (Yamanaka *et al.*, 2008). Neuroinflammation und das Entstehen einer reaktiven Gliose können den Krankheitsverlauf darüber hinaus aber auch negativ beeinflussen (Maragakis and Rothstein, 2006).

1.3 Fragestellung dieser Arbeit

Wie dargestellt ist die universelle Reaktion auf pathologische Zustände innerhalb des ZNS in Form einer reaktiven Gliose ein sehr grundlegendes physiologisches Verhalten von Gliazellen. Aufgrund der ausgeprägten Heterogenität dieser komplexen multizellulären Reaktion ist mit bisherigen Erkenntnissen sowohl das mögliche Ausmaß sowie die Dauer potenzieller Konsequenzen nicht absehbar.

Fakt ist, dass die reaktive Gliose eine Bandbreite von Effekten mit sich bringt, die je nach Ausprägung und Zeitpunkt im Verlauf der jeweiligen Pathologie sowohl potenziell vorteilhafte oder unvorteilhafte Folgen für das ZNS hat. So verhindern reaktive Glia potenziell neurotoxische Auswirkungen und damit einen ausgedehnten Sekundärverlust von Neuronen in direkter Nachbarschaft von pathologischen Einflüssen. Gleichzeitig wirkt sich die gliale Narbe hemmend auf das Axonwachstum und somit auch auf die funktionelle Regeneration des geschädigten Gewebes aus. Es steht außer Frage, dass eine ausgeprägte reaktive Gliose unter anderem an der Entstehung neuronaler und daraus resultierender kognitiver Dysfunktionen beteiligt sein kann und im Falle einer chronischen Gliose für das Auftreten regions-übergreifender glialer Dysfunktionen verantwortlich ist. Diese können wiederum potenziell eigene pathologische Effekte auf

die Funktionalität des ZNS mit sich bringen und primär vorhandene Pathologien verstärken.

Daher ist es von essenzieller Bedeutung die verletzungsbedingte Reaktion glialer Zellen nicht nur in der unmittelbaren Umgebung der Läsion, sondern auch abseits der primär verletzten Region zu verstehen. Allerdings lag der bisherige Fokus vieler neuropathologischer Studien, darunter auch im Kontext von Rückenmarksverletzungen, hauptsächlich auf der Charakterisierung residenter Gliazellen in der Penumbra. Vor diesem Hintergrund war das primäre Ziel dieser Arbeit einen Einblick in die regionspezifische Reaktion kortikaler Astrozyten und Mikroglia auf eine invasive inkomplette Rückenmarksverletzung zu gewinnen. Die Studienbedingungen und der Ablauf wurden konzipiert, um folgende Fragen zu beantworten:

1. Ob und in welchem Ausmaß reagieren Gliazellen auf invasive und nicht-penetrierenden Verletzungen des Rückenmarks?
2. Gibt es hirnregionsspezifische Unterschiede in der Reaktion glialer Zellen nach invasiven Rückenmarksverletzungen im Vergleich zu nicht ZNS-penetrierenden Rückenverletzungen?
3. Welchen Einfluss hat die Invasivität des operativen Eingriffs auf die Reaktion parenchymaler Gliazellen im Gehirn?
4. Hat die systemisch angewandte Allgemeinanästhesie einen Einfluss auf die Ausprägung der glialen Reaktion innerhalb des zerebralen Kortex?
5. Haben Verletzungen des Rückenmarks eine Auswirkung auf die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke?

2. Material & Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Eismaschine	Scotsman (Vernon Hills, US)
Gefrierschrank (-20 °C)	Liebherr (Bulle, CH)
Kaltlichtquelle KL 1500 LCD	Leica (Wetzlar, D)
Kühlschrank (+4 °C)	Liebherr (Bulle, CH)
Laborwaage	Mettler Toledo (Giessen, D)
Magnetrührer IKA COMBIMAG RET	Jahnke und Kunkel (Staufen, DE)
Mausgehege	Techniplast (Buguggiate, I)
Mikroskop LSM 710	Zeiss (Oberkochen, DE)
Mikroskop Zeiss AX10	Zeiss (Oberkochen, DE)
Mikroskop Leica MZ6	Leica (Wetzlar, DE)
Mikrotom HM650	Thermo Fischer (Waltham, US)
Mikrowelle 900 & Grill	Severin (Sundern, DE)
pH-Meter pH720	WTW inoLab (Weilheim, DE)
Perfusionspumpen	Gilson (Middelton, US)
Pipetten (2µl, 20µl, 100µl, 200µl, 1000µl)	Gilson (Middelton, US)
Schüttler Duomax 1030	Heidolph (Schwabach, D)
Schüttler IKA-Vibrax VXR	Jahnke und Kunkel (Staufen, DE)
Stereotaktische Mausfixierung	Stoelting (Wood Dale, USA)
Taschenrechner	Casio (Tokyo, JPN)
Thermomixer comfort	Eppendorf (Hamburg, D)
Vibratom VT1000S	Leica (Wetzlar, D)
Vortex-Genie 2	Bender & Hobein (Bruchsal, D)
Wasserbad	Memmert (Schwabach, D)
Zentrifuge Minispin	Eppendorf (Hamburg, D)

2.1.2 Software

Fiji/ImageJ 1.51	National Institutes of Health (USA)
Graphpad Prism 5	GraphPad Software (San Diego, USA)
Microsoft Excel (2008)	Microsoft (Redmond, USA)
Zen 2.3 (2011)	Zeiss (Oberkochen, DE)

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Abwurfbehälter Euromatic Multisafe	Sarstedt (Nürnberg, D)
Augen- und Nasensalbe	Bepanthen (Leverkusen, D)
Deckgläser (24 x 50 mm)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, DE)
Einmal-Einbett-Schalen	Polyscience (Warrington, US)
Einmal-Skalpell #22	Braun (Aschaffenburg, DE)
Einmal-Tücher	Kimtech (Irving, TX, USA)
Filterpapier	BIO-RAD (Hercules, USA)
Glaskolben	Schott (Mainz, D)
Insulinnadeln (U-100, 1 ml)	BD Biosc. (Franklin Lakes, USA)
Multiwell Platten 24	Sarstedt (Nürnberg, DE)
Multiwell Platten Falcon 24 & 12	Thermo Fischer (Waltham, US)
Nadeln Monoject (0.5 x 24 mm; 25G)	Medtronic (Minneapolis, US)
Nahtmaterial (Vicryl)	Ethicon (Norderstedt, D)
Objektträger (76 x 26 mm)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, DE)
Handschuhe	Meditrade (Kiefersfelden, DE)
Parafilm	Peckiney Plastic P. (Chicago, USA)
Pasteurpipetten	VWR International (Darmstadt, D)
Pipettenspitzen (20µl, 200µl, 1000µl)	Sarstedt (Nürnberg, DE)
Petrischalen	Greiner Bio One (Kremsmünster, AT)
Reagiergefäße (0.5ml, 1.5ml, 2ml, 5ml)	Eppendorf (Hamburg, DE)
Röhrchen (15ml, 50ml)	Greiner Bio One (Kremsmünster, AT)

2.1.4 Medikamente

Atipamezol	Vetoquinol (Ismaning, DE)
Fentanyl	Hexal (Holzkirchen, D)
Flumazenil	Hexal (Holzkirchen, DE)
Ketaminhydrochlorid (Ketavet®)	Pfizer (New York City, USA)
Medetomidin	Pfizer (New York City, USA)
Midazolam	Ratiopharm (Ulm, D)
Naloxon	Chemos (Altdorf, DE)
Natriumchlorid-Lösung 0,9%	Braun (Melsungen, DE)
Xylazinhydrochlorid (Rompun®)	Bayer (Leverkusen, DE)

2.1.5 Chemikalien

Aceton	Carl Roth (Karlsruhe, D)
Agarose	Serva (Heidelberg, D)
Chlorwasserstoff (HCl)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Di-Natriumphosphat	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Ethanol 99,8%	Carl Roth (Karlsruhe, D)
Ethanol 70%	Carl Roth (Karlsruhe, D)
Ethylenglykol	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Glycerol	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Glycine	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Einbettungs-Medium (Aqua Polymount®)	Polysciences (Warrington, USA)
Isopropanol	Carl Roth (Karlsruhe, D)
Kaliumchlorid (KCl)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Monokaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck (Darmstadt, D)
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Natriumdihydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck (Darmstadt, D)
Natriumhydroxid (NaOH)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Normales Ziegen Serum (NGS)	Life Technologies (Carlsbad, USA)
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Saccharose	Merck (Darmstadt, D)
Triton X-100 (Tx)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)

2.1.6 Antikörper, Fluoreszenzen und Tracer

<i>Tracer</i>	<i>Spezies</i>	<i>Anwendung</i>	<i>Hersteller</i>
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)		1:1000	Sigma Aldrich (St. Louis, US)
Cadaverin (Alexa Fluor 555)		1.25:1	Thermo Fischer (Waltham, US)
<u>Primäre Antikörper:</u>			
Anti Ki67	rabbit	1:100	Thermo Fischer (Waltham, US)
Anti GFAP	mouse IgG1	1:400	Sigma Aldrich (St. Louis, US)
Anti Iba1	rabbit	1:500	Wako GmbH (Neuss, DE)
<u>Sekundäre Antikörper:</u>			
Anti rabbit (Cy3)	donkey affi	1:500	Dianova (Hamburg, DE)
Anti mouse IgG1 (A647)	goat	1:500	Invitrogen (Waltham, US)
Anti rabbit (A488)	donkey affi	1:500	Invitrogen (Waltham, US)

2.1.7 Puffer und Lösungen

Anästhesie-Lösung (Interventionen):

- 12.5 µg Fentanyl-Citrat
- 2.5 µg Midazolam
- 250 µg Medetomidin
- 4.0 ml Natriumchlorid-Lösung 0,9%

Lagerung: gekühlt bei 4 °C

Anästhesie-Antidot (Interventionen):

- 1.25 µg Atipamezol
- 250 µg Flumazenil
- 50 µg Buprenorphin
- 0.75 ml Natriumchlorid-Lösung 0,9%

Lagerung: gekühlt bei 4 °C

Anästhesie-Lösung (Analysezeitpunkt):

- 1.0 ml Ketaminhydrochlorid (Ketavet®)
- 0.25 ml Xylazinhydrochlorid (Rompun®)
- 2.5 ml Natriumchlorid-Lösung 0,9%

Lagerung: gekühlt bei 4 °C

Antikörper-Lösung für 10 Wells à 500µl:

- 4500 µl PBS-Tx 0,5%
- 500 µl NGS
- + Antikörper im unter 0 angegebenen Verhältnis

Lagerung: lichtgeschützt und gekühlt bei 4 °C

Lagerungslösung:

- 150 ml Ethylenglykol
- 150 ml Glycerin
- 150 ml H₂O
- 50 ml 10x PO₄-Puffer

Lagerung: gekühlt bei -20 °C

Paraformaldehyd (PFA) 20%:

134 g Di-Natriumhydrogenphosphat
400 g Paraformaldehyd
10 ml Natriumhydroxid
auf 2 L H₂Odd; gefiltert; pH 7.4

Lagerung: gefroren bei -20 °C

Paraformaldehyd (PFA) 4%:

100 ml 20% PFA
400 ml H₂Odd; pH 7.4

Lagerung: gefroren bei -20 °C

10x Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS):

58.75 g Di-Natriumhydrogenphosphat
10 g Kaliumchlorid
10 g Monokaliumdihydrogenphosphat
400 g Natriumchlorid
auf 5 L H₂Odd; pH 7.4

Lagerung: bei Raumtemperatur

1x Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS):

100 ml 10x PBS
900 ml H₂Odd; pH 7.4

Lagerung: bei Raumtemperatur

10x PO₄-Puffer:

2 ml Chlorwasserstoff (5N)
65 g Natriumdihydrogenphosphat
15 g Natriumhydroxid
auf 400 ml H₂Odd; pH 7.4

Lagerung: bei Raumtemperatur

Saccharose-Lösung 30% (Kryoprotektion):

30 g Saccharose
auf 100 ml 1x PBS

Lagerung: gekühlt bei 4 °C

Triton X-100 0,5% (Tx 0,5%):

1 ml Triton X-100
auf 200 ml 1x PBS

Lagerung: gekühlt bei 4 °C

2.2 Methoden

2.2.1 Mausmodell

Die Tierversuche zu dieser Arbeit wurden in Übereinstimmung mit „Policies on the Use of Animals and Humans in Research“ der Gesellschaft für Neurowissenschaften sowie mit der Genehmigung durch die Regierung Oberbayern durchgeführt. Alle Tierexperimente in dieser Studie wurden ausschließlich durch geprüfte und von der Regierung Oberbayern zugelassene wissenschaftliche Mitarbeiter des Lehrstuhls für Physiologische Genomik oder des Instituts für Klinische Neuroimmunologie der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt. Die Gewebeentnahme fand erst mit dem unwiderruflichen Versterben der Mäuse im Anschluss an die transkardiale Perfusion zum Analysezeitpunkt statt. Es wurde darauf geachtet, das Leiden der Tiere und die benötigte Anzahl möglichst gering zu halten. Die Experimente wurden ausschließlich mit weiblichen C57BL/6-Mäusen im Alter von 2-3 Monaten durchgeführt. Im Verlauf wurden verschiedene Tiere sowohl naiv als auch 5 und 14 Tagen nach verschiedenen Interventionen analysiert.

2.2.1.1 Anästhesie

Die einzelnen Eingriffe wurden ausschließlich unter Vollnarkose mit Medetomidin, Midazolam und Fentanyl (MMF) durchgeführt. Die Applikation der entsprechenden Vollnarkose erfolgte intraperitoneal in einer Dosis von 0.1 ml/1 g Körpergewicht. Nach Abschluss der Interventionsmaßnahmen wurde die Anästhesie mit einer Antidot-Lösung 0.1 ml/1 g Körpergewicht antagonisiert. Zum Analysezeitpunkt bestand die Anästhesie abweichend davon aus der intraperitoneal applizierten Überdosis von 0.4 ml/1 g Körpergewicht einer Ketamin-Rompun-Lösung. Nach Verabreichung wurde das Erreichen einer suffizienten Anästhesietiefe durch das vollständige Erlöschen signifikanter Reflexe (z.B. Augenlidreflex und Plantarreflex) evaluiert und die Anästhesie gegebenenfalls bis zum Ausbleiben dieser vertieft.

2.2.1.2 Dorsale Hemisektion

Das Mausmodell einer invasiven Rückenmarksverletzung durch dorsale Hemisektion auf Ebene T8/9 (Bareyre *et al.*, 2004) wurde uns durch Mitarbeiter des Instituts für Klinische Neuroimmunologie (AG Bareyre) zur Verfügung gestellt. Nach Induktion der Vollnarkose (2.2.1.1) wurde das Operationsgebiet am Rücken der Mäuse rasiert und das Tier in Bauchlage an allen Extremitäten ohne Zug fixiert. Der Zugang erfolgte über einen etwa 1 – 1.5 cm langen Hautschnitt über der thorakalen Wirbelsäule. Im Anschluss an die Mobilisation der Rückenmuskulatur konnte die Wirbelsäule präpariert werden. Nach einer partiellen Laminektomie wurde der 8. Brustwirbels angehoben und unter mikroskopischer Sicht eine dorsale Hemisektion des Rückenmarks mit Hilfe einer Iridektomie-Schere durchgeführt. Die Operationswunde wurde mehrfach mit Klammern verschlossen und die Mäuse bis zum vollständigen Erwachen unter geringer Wärmezufuhr beobachtet. Das postoperative Management beinhaltete ausreichenden Zugang zu Wasser und Nahrung, vermehrte Kontrollen in den ersten 24 Stunden nach dem Eingriff, Gewichtskontrollen im Verlauf und intraperitoneale Analgesie direkt im Anschluss sowie 24 Stunden nach der Operation.

2.2.1.3 Kontrolloperation

Die Kontrolloperationen (SHAM) wurden ebenfalls durch Mitarbeiter des Instituts für Klinische Neuroimmunologie (AG Bareyre) durchgeführt und verliefen nach exakt demselben Protokoll der Hemisektion (2.2.1.2) mit der Abweichung, dass nach Präparation der Wirbelsäule und Anheben des thorakalen 8. Wirbelkörpers keine ZNS-invasive Verletzung erfolgte. Die Versorgung der Operationswunde und das postoperative Management waren ebenfalls identisch. Somit kann diese Kontrolloperation als wirbelsäulennahe Rückenoperation ohne ZNS-penetrierendes Trauma angesehen werden.

2.2.1.4 Hautschnitt

Für die Kontrollgruppe mit lediglich einem Hautschnitt wurde der erste Teil des Prozederes der durchgeführten Hemisektion (2.2.1.2) herangezogen. Nach erfolgreicher Einleitung einer tiefen Anästhesie (2.2.1.1) und Rasur des Operationsgebietes wurde ein etwa 1 – 1.5 cm langer Hautschnitt über der thorakalen Wirbelsäule gesetzt. Ohne weitere Präparation wurde dieser analog zum Vorgehen bei den anderen Rückeninterventionen anschließend geklammert und die Mäuse postoperativ überwacht.

2.2.1.5 Stichwunde

Das etablierte Modell einer invasiven ZNS-Verletzung durch Stichverletzung diente in dieser Arbeit als Positivkontrolle für die Permeabilitätsanalyse der Blut-Hirn-Schranke. Im Anschluss an die in 2.2.1.1 beschriebene Anästhesie durch MMF sowie negativer Reflextestung wurde das Operationsgebiet der Schädelkalotte rasiert und die Augen der Mäuse mit einer Augen-Nasen-Salbe geschützt. Nach Fixierung des Kopfes in einer stereotaktischen Schädelklemme wurde die Cutis nach einem Hautschnitt vom Schädel mobilisiert und der Schädelknochen freigelegt. Über dem somatosensorischen Kortex wurde eine kleine unilaterale Kraniotomie (2 mm Durchmesser) durchgeführt, ohne dabei bereits ZNS-invasive Verletzungen zuzufügen. Durch die stereotaktische Vorrichtung konnte danach ein präziser Einschnitt von 1,5 mm Länge und 0,6 mm Tiefe in die kortikale graue Substanz des somatosensorischen Kortex erfolgen. Im Anschluss wurde die Operations-Wunde ohne knöcherne Deckelung genäht, um eine Beeinträchtigung der folgenden Analysen durch Verklebungen zu minimieren. Nach Antagonisierung der Anästhesie wurden die Tiere bis zum vollständigen Erwachen unter mäßiger Wärmezufuhr kontinuierlich beobachtet. Das weitere postoperative Management ist 2.2.1.2 zu entnehmen.

2.2.1.6 Perfusion und Gewebeproben

Zum Analysezeitpunkt wurden die Mäuse nach dem in 2.2.1.1 beschriebenen Protokoll anästhesiert. Nach Sicherstellung einer suffizienten Vollnarkose wurden die Tiere fixiert und die Bauchdecke durch einen Medianschnitt geöffnet. Der Brustraum und das Herz wurden anschließend durch das Durchtrennen der Rippen freigelegt. Zur Vorbereitung der transkardialen Perfusion wurde der linke Ventrikel des Herzens mit einer Kanüle punktiert und der rechte Vorhof zum Ablauf des infundierten Flüssigkeitsvolumens perforiert. Mit Hilfe einer Perfusionspumpe wurden die Tiere zuerst mit 50ml 1x PBS und anschließend mit weiteren 50ml Fixativ bestehend aus 4% Paraformaldehyd (PFA) perfundiert. Nach Entnahme der Hirne und des Rückenmarks wurde das Gewebe zum Nachfixieren für 2 Stunden bis maximal über Nacht bei 4 °C in PFA 4% sowie anschließend zur Kryoprotektion weitere 4-6 Tage bei 4 °C in Saccharose 30% inkubiert. Zum Anfertigen von Gewebeschnitten wurden die Proben in Agarose 3% eingebettet und mit dem Vibratom in etwa 40µm starke Koronarschnitte unterteilt. Aufbewahrt wurden die Proben bis zur Weiterverarbeitung bei -20 °C in einer frostgeschützten Lagerungslösung.

2.2.1.7 Permeabilitätsanalyse der Blut-Hirn-Schranke

Für diese Untersuchung wurde das Protokoll zur Verwendung des Tracers Cadaverin im Rahmen immunhistochemischer Permeabilitätsanalysen der Blut-Hirn-Schranke auf Grundlage bereits publizierter Anwendungen (Watkins *et al.*, 2014; Muramatsu *et al.*, 2015; Yanagida *et al.*, 2017) etabliert. Auf Basis einer Testreihe von Positivkontrollen (2.2.1.5) mit unterschiedlichen Tracer-Konzentrationen konnte eine suffiziente Penetration des Tracers in das Hirnparenchym für eine Dosierung von 250 µg in 200 µl Natriumchlorid-Lösung 0,9% (1.25:1) immunhistochemische nachgewiesen werden. Diese Dosis wurde in den jeweiligen experimentellen Gruppen über die Schwanzvenen appliziert und die Mäuse 3 Stunden nach Injektion in Vollnarkose wie in 2.2.1.6 beschrieben transkardial perfundiert. Um ein Auswaschen des Tracers zu reduzieren, wurde die Perfusion auf etwa 50 ml eisgekühltem PBS limitiert und die Fixierung des

Gewebes ausschließlich durch eine prolongierte Inkubation der seziierten Hirne für 48 Stunden in PFA 4% erreicht. Die darauffolgende Kryoprotektion, Lagerung und immunhistochemische Auswertung glich dem beschriebenen Prozedere (2.2.1.6).

2.2.2 Immunhistochemische Färbung

Die Gewebeschnitte wurden aus der Lagerungslösung in PBS übertragen und passiv auf Raumtemperatur gebracht. Nach einer 30-minütigen Permeabilisierung in Triton-X 0,5% wurden diese in einer Lösung mit den primären Antikörpern (siehe 2.1.6) 2 Stunden auf einem Schüttler bei Raumtemperatur und anschließend über Nacht auf einem Schüttler bei 4°C inkubiert. Parallel zu der Applikation sämtlicher Antikörper wurde jeweils NGS 10% zum Blocken unspezifischer, nicht durch Zielantigene verursachter Bindungen der Immunglobuline eingesetzt. Für die folgenden Waschzyklen wurden die Gewebeproben auf neuen Wellplatten 3-mal für 10 Minuten in frischem 1x PBS auf einem Schüttler bei Raumtemperatur von ungebundenen Überhängen sämtlicher verwendeter Lösungsbestandteile befreit. In Folge des auf diese Weise gestalteten initialen Waschzyklus nach Abschluss der Inkubation primärer Antikörper wurden die sekundären Antikörper aufgrund der Verwendung zweier primärer Antikörper aus Hasenserum sequenziell appliziert. Die Inkubation mit sekundären Antikörpern erfolgte ebenfalls unter der Verwendung von NGS 10% für 2 Stunden auf einem Schüttler bei Raumtemperatur. Ab diesem Schritt wurden die Schnitte ausschließlich lichtgeschützt verarbeitet und gelagert. Zuerst wurden die Proben in den sekundären Anti-Maus-Antikörpern sowie Anti-Hasen-Antikörpern gegen die kernnahen Anti-Ki67-Antikörper inkubiert. Darauf folgte eine 10-minütige Zwischenfixierung in PFA 4%, gefolgt von einem weiteren Waschzyklus, bevor die Schnitte mit den verbleibenden sekundären Anti-Hasen-Antikörper in Kontakt gebracht wurden. Für die letzten 10 Minuten dieser finalen Inkubationsphase wurde DAPI im Verhältnis 1:1000 in die Wells hinzugegeben. Danach wurden die Gewebeproben einem letzten Waschzyklus unterzogen. Abschließend wurden die Schnitte mit einem Pinsel auf Objektträger aufgebracht, an der Luft getrocknet und nach Einbetten in Aqua Polymount® mit einem Deckglas versiegelt. Die fertigen Objektträger wurden beschriftet und in einer lichtgeschützten Box aufbewahrt.

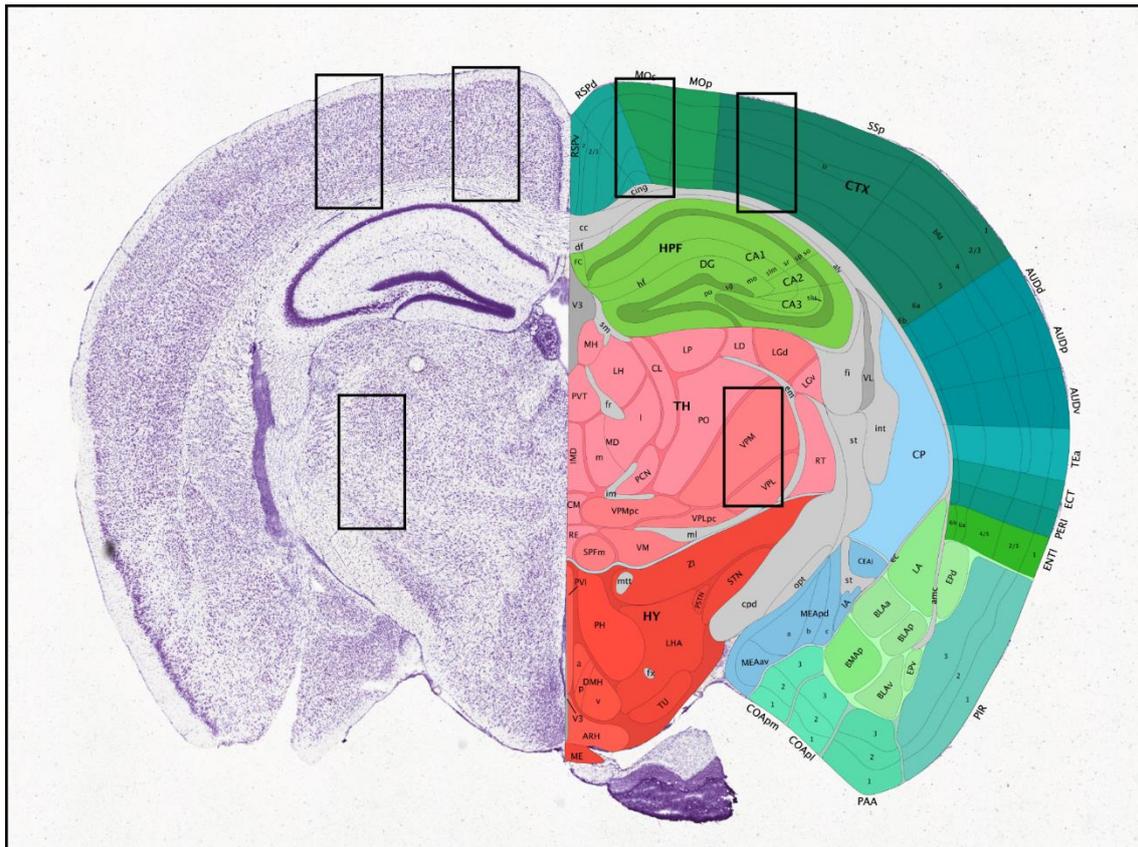


Abb. 3 Analysierte Hirnregionen

Schematische Übersicht der mikroskopisch aufgenommenen und im Anschluss analysierten Hirnregionen im Bereich des motorischen und somatosensorischen Kortex sowie des Nucleus ventralis posterior des Thalamus.

Quelle: © 2015 Allen Institute for Brain Science. Allen Brain Atlas APL. - Mouse, P56, Coronal (Web).

2.2.3 Mikroskopische Analyse

Vor der Analyse wurde der Erfolg der immunhistochemischen Färbung mit Hilfe eines Leica MZ6 Mikroskops überprüft. Alle Aufnahmen für die eigentliche Quantifizierung wurden mit demselben Zeiss LSM 710 Mikroskop akquiriert. Diese Aufnahmen umfassten von jedem Gewebeschnitt unilateral jeweils 2 vertikal übereinanderliegende Aufnahmen ($567 \mu\text{m} \times 1134 \mu\text{m}$) zur Abbildung des motorischen und somatosensorischen Kortex sowie des Nucleus ventralis posterior des Thalamus in 25-facher Vergrößerung (Abb. 3). Erfasst wurden die Kanäle 405nm (blau), 488nm (grün), 561nm (rot) und 633nm (grau/weiß) mit über alle Aufnahmen konstanten Einstellungen (Tabelle 1) und einem z-Stack-Intervall von $1,50 \mu\text{m}$.

Kanal	Laser	Pinhole	Gain	Dig Offset	Dig Gain
561nm	5.0	36.6	730	-5	1.0
488nm	14.0	32.3	700	0	1.0
633nm	15.0	41.3	680	0	1.0
488nm	12.0	27.6	730	-5	1.0

Tabelle 1 Einstellungen Zeiss LSM 710 Mikroskop

Alle relevanten Parameter, die bei allen Aufnahmen durch das Zeiss LSM 710 Mikroskop im Verlauf dieser Arbeit angewandt und konstant gehalten wurden

Zum Ende dieser Arbeit fand der reparaturbedingte Wechsel des Lasers für das grüne Frequenzspektrum statt. Der betreffende Kanal, der nach diesem Zeitpunkt akquirierten Aufnahmen (siehe 3.7), wurde entsprechend von den Auswertungen ausgeschlossen. Einzelnen Zellen wurden in 40-fach vergrößerten Detailaufnahmen abgebildet und für Übersichtsdarstellungen wurden zusätzlich gekachelte Aufnahmen eines Zeiss AX10 Mikroskops hinzugezogen.

2.2.4 Quantifizierung und statistische Auswertung

Für die Auswertung habe ich ein extra Plugin für ImageJ (siehe Anhang) implementiert. Dieses fordert als Eingabe eine zweidimensionale Abgrenzung einzelner histologischer Kompartimente (ImageJ Flächen-Plugin) innerhalb der Aufnahme. Auf dieser Basis werden Flächenanteile, Signalstärke- und -verteilungen sowie ein vorläufiges Ergebnis zur Anzahl Signal⁺ Zellen (ImageJ Partikel-Plugin) ausgegeben. Dadurch wird die Auswertung bei konstanten Voreinstellungen so weit möglich standardisiert. Die einzelnen Signal⁺ Zellen wurden in der Folge zusätzlich manuell durch das Vorhandensein DAPI⁺ Zellkerne validiert sowie doppelt Signal⁺ Zellen durch einen Vergleich aller aufgenommenen Kanäle erfasst. Da es durch die verschiedenen Weiterverarbeitungsschritte zu geringfügigen Abweichungen in der Stärke der untersuchten Gewebeschnitte kam, wurden alle Messwerte auf das untersuchte Volumen in mm³ normalisiert. Die in dieser Arbeit ausgewertete Signalstärke der untersuchten Marker wurde anhand sowohl des Flächenanteils als auch der Intensität auf sogenannten „maximum intensity projections“ der gewonnenen z-Stack-Aufnahmen berechnet. Für die Intensität wurde dabei der Signalkanal in eine Grauskala konvertiert

und die Luminanz der einzelnen Pixel digital auf einer Skala von 0 – 255 bestimmt. Der Durchschnittswert für alle Pixel des betrachteten Hirnausschnitt wurde danach ebenfalls in Prozent zur maximalen Intensität (255) angegeben und gleichwertig zum Flächenanteil behandelt. Zuletzt wurde die Signalstärke ebenfalls auf Stärke des Gewebeschnitts normalisiert, sodass sich folgende Formel ergibt:

$$\text{Signalstärke } \mu\text{m}^{-1} = \frac{\text{Flächenanteil } \% * \text{Intensitätsanteil } \%}{z\text{Stack } \mu\text{m}}$$

Um ein größeres und somit repräsentativeres Volumen untersuchen zu können, wurden von jedem Tier jeweils 3 randomisierte Gewebsschnitte untersucht, welche alle gewünschten Zielstrukturen enthielten (Abb. 3). Alle Ergebnisse dieser 3 Einzelschnitte wurden im Anschluss für das jeweilige Tier aggregiert. Insgesamt wurden pro Gruppe mindestens 3 Tiere analysiert, was einer üblichen Anzahl in diesem Bereich publizierter Arbeiten entspricht. Da in diesem Umfang eine Normalverteilung nicht seriös nachzuweisen ist, sind ausschließlich nicht parametrische Tests (one-way ANOVA = Kruskal-Wallis; Mann-Whitney-U) zum Einsatz gekommen und wurden mit Graphpad Prism 5 durchgeführt. Alle angefertigten Darstellungen beziehen sich dementsprechend auf den Median \pm Interquartilsabstand. Für signifikante Unterschiede wurden folgende Schwellen angesetzt: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

3. Ergebnisse

Das Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Reaktion von Gliazellen des motorischen und somatosensorischen zerebralen Kortex sowie des Nucleus ventralis posterior des Thalamus in Folge von Rückenmarkstraumata im Mausmodell. Als universelle gliale Reaktion auf pathologische Prozesse im zentralen Nervensystem (ZNS) ist dabei die reaktive Gliose (1.2) von besonderer Bedeutung. Da diese obligat von einer Astro- sowie Mikroglia gekennzeichnet ist, wurden regionsspezifische Veränderungen in der Expression der glialen Aktivitätsmarker GFAP für Astrozyten und Iba1 für Mikroglia immunhistochemisch untersucht. Zusätzlich wurde das Ausmaß der endogenen Induktion proliferativer Kapazitäten in diesen Bereichen analysiert. Hierzu wurde der Nachweis des nukleären Ki67-Proteins verwendet, welches in allen Zellen ubiquitär im Rahmen eines aktiven Zellzyklus exprimiert wird. Durch lediglich den Nachweis des Ki67-Proteins kann keine effektive Aussage über tatsächlich stattfindende Zellteilung getroffen werden, sodass sich die Verwendung des Begriffs „Proliferation“ in dieser Arbeit auf den nachgewiesenen mitotisch aktiven Zellzyklus beschränkt. Im physiologischen Zustand ist die mitotische Aktivität des gesamten Hirnparenchyms außerhalb der Stammzellnischen auf hauptsächlich eine geringe Anzahl NG2⁺ Glia beschränkt. Daher sind Auswirkungen auf die zelluläre proliferative Aktivität bei einer Bewertung des Umfangs und der Konsequenzen reaktiver Veränderungen von großem Interesse.

Für die Umsetzung wurden insgesamt 7 experimentelle Gruppen aus erwachsenen Mäusen im Alter von 2-3 Monaten untersucht (Abb. 4). Die invasiven Rückenmarkverletzungen (HEMI) und auch die Kontrolloperationen (SHAM) wurde dabei in Kooperation durch ein bereits implementiertes Mausmodell von Bareyre et al. (Bareyre *et al.*, 2004) umgesetzt. Die invasive Rückenmarksverletzung bestand dabei aus einer operativen Durchtrennung der spinalen Hinterstrangbahnen auf Höhe des 8. Brustwirbelkörpers. Diese Interventionsgruppe sowie die Kontrolloperationen wurden zusätzlichen Kontrollgruppen gegenübergestellt, um den effektiven Beitrag einer (nicht) invasiven Rückenmarksverletzung zu neu aufgetretenen zellulären Veränderungen explizit zuordnen beziehungsweise ausschließen zu können.

<p>unverletzte Kontrollgruppe (NAIV)</p> <p>Anzahl: n = 3</p>	<p>✗ Anästhesie</p> <p>✗ Hautschnitt</p> <p>✗ Präparation der Wirbelsäule</p> <p>✗ thorakale dorsale Hemisektion</p> <p>✗ intravenöse Cadaverininjektion</p>
<p>Kontrollgruppe: Anästhesie (ANA)</p> <p>Anzahl: n = 3</p> <p>Analyse: 5. Tag nach Intervention</p>	<p>✓ Anästhesie</p> <p>✗ Hautschnitt</p> <p>✗ Präparation der Wirbelsäule</p> <p>✗ thorakale dorsale Hemisektion</p> <p>✗ intravenöse Cadaverininjektion</p>
<p>Kontrollgruppe: Hautschnitt (SKIN)</p> <p>Anzahl: n = 3</p> <p>Analyse: 5. Tag nach Intervention</p>	<p>✓ Anästhesie</p> <p>✓ Hautschnitt</p> <p>✗ Präparation der Wirbelsäule</p> <p>✗ thorakale dorsale Hemisektion</p> <p>✗ intravenöse Cadaverininjektion</p>
<p>Kontrolloperation (SHAM)</p> <p>Anzahl: n = 3</p> <p>Analyse: 5. Tag nach Intervention</p> <p>14. Tag nach Intervention</p>	<p>✓ Anästhesie</p> <p>✓ Hautschnitt</p> <p>✓ Präparation der Wirbelsäule</p> <p>✗ thorakale dorsale Hemisektion</p> <p>✗ intravenöse Cadaverininjektion</p>
<p>invasive Rückenmarksverletzung (HEMI)</p> <p>Anzahl: n = 3</p> <p>Analyse: 5. Tag nach Intervention</p> <p>14. Tag nach Intervention</p>	<p>✓ Anästhesie</p> <p>✓ Hautschnitt</p> <p>✓ Präparation der Wirbelsäule</p> <p>✓ thorakale dorsale Hemisektion</p> <p>✗ intravenöse Cadaverininjektion</p>
<p>Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke: NAIV</p> <p>Anzahl: n = 3</p>	<p>✗ Anästhesie</p> <p>✗ Hautschnitt</p> <p>✗ Präparation der Wirbelsäule</p> <p>✗ thorakale dorsale Hemisektion</p> <p>✓ intravenöse Cadaverininjektion</p>
<p>Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke: HEMI</p> <p>Anzahl: n = 3</p> <p>Analyse: 5. Tag nach Intervention</p>	<p>✓ Anästhesie</p> <p>✓ Hautschnitt</p> <p>✓ Präparation der Wirbelsäule</p> <p>✓ thorakale dorsale Hemisektion</p> <p>✓ intravenöse Cadaverininjektion</p>

Abb. 4 Übersicht experimenteller Gruppen

Übersicht aller experimenteller Tiergruppen und der jeweilig durchgeführten Interventionen. Alle Versuche wurden mit erwachsenen Mäusen im Alter von 2-3 Monaten durchgeführt. Die angegebenen Abkürzungen der einzelnen Versuchsgruppen finden im Folgenden Verwendung.

Weiteres Interesse galt dem zeitlichen Verlauf, da akut vorteilhafte Effekte potenziellen chronischen Langzeitfolgen gegenübergestellt und diskutiert werden müssen. Zur Untersuchung der Dynamik wurden Analysezeitpunkte gewählt, die auf Grundlage bereits bestehender Erkenntnisse in Mäusen sowohl das akute als auch das subakute Stadium invasiver ZNS-Verletzungen widerspiegeln (Abb. 5) (Burda and Sofroniew, 2014).

Im Verlauf der Experimente wurden die Tiere jeweils nach Gruppen getrennt in separaten Käfigen gehalten, täglich visitiert und postoperativ zusätzlich engmaschig überwacht. Dabei konnten weder Komplikationen bezüglich der Wundheilung noch unerwartete Verhaltensauffälligkeiten festgestellt werden. Alle Tiere überlebten bis zum jeweilig geplanten Analysezeitpunkt.

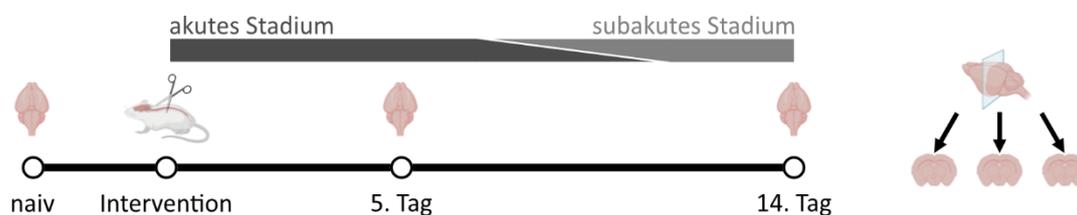


Abb. 5 Experimentelles Paradigma

Übersicht über die verschiedenen Analysezeitpunkte der einzelnen experimentellen Gruppen. Die sezernierten Hirne wurden in etwa 40 µm starke koronare Gewebeschnitte unterteilt. Von diesen wurden 3 randomisierte Schnitte analysiert, die jeweils alle Zielstrukturen (motorischer/somatosensorischer Kortex, Nucleus ventralis posterior des Thalamus) enthielten.

Quelle: In abgeänderter Form erstellt mit [BioRender.com](https://www.biorender.com).

3.1 Reaktive Gliose im zerebralen Kortex nach invasiver Rückenmarksverletzung

Motorische sowie sensorische Defizite sind häufig beschriebene Konsequenz schwerer Rückenmarkstraumata und können neurophysiologisch sowie neuroanatomisch nachvollzogen werden. Daher ist die Frage nach möglichen Veränderungen in den für diese Funktionen verantwortlichen primären Kortexarealen des Großhirns naheliegend. Untersucht wurden koronare Querschnitte des gesamten Kortexparenchyms inklusive der in der Tiefe angrenzenden weißen Substanz. Hierfür wurden Mäuse nach invasiver Rückenmarksverletzung (HEMI) unverletzten Tieren (NAIV) als physiologische Grundannahme gegenübergestellt.

Bereits anhand der Übersichtsaufnahmen (Abb. 6A) der immunhistochemisch aufgearbeiteten Hirnschnittpräparate nach Rückenmarksverletzungen war eine hochregulierte Expression der glialen Marker GFAP und Iba1 zu vermuten. Auch die morphologischen Charakteristika von GFAP⁺ sowie Iba1⁺ Zellen wichen nach einem Trauma teilweise deutlich vom physiologischen Zustand ab (Abb. 6B). Die beobachteten Zellen zeigten insbesondere am 5. Tag nach Intervention überwiegend eine deutliche Hypertrophie von Soma und Zellfortsätzen. Die morphologischen Veränderungen konnten in einem ähnlichen Umfang ebenfalls 14 Tage nach Intervention beschrieben werden und sprechen daher für eine länger anhaltende Aktivierung glialer Zellen, die über das Akutstadium der ZNS-Verletzung hinaus bestand.

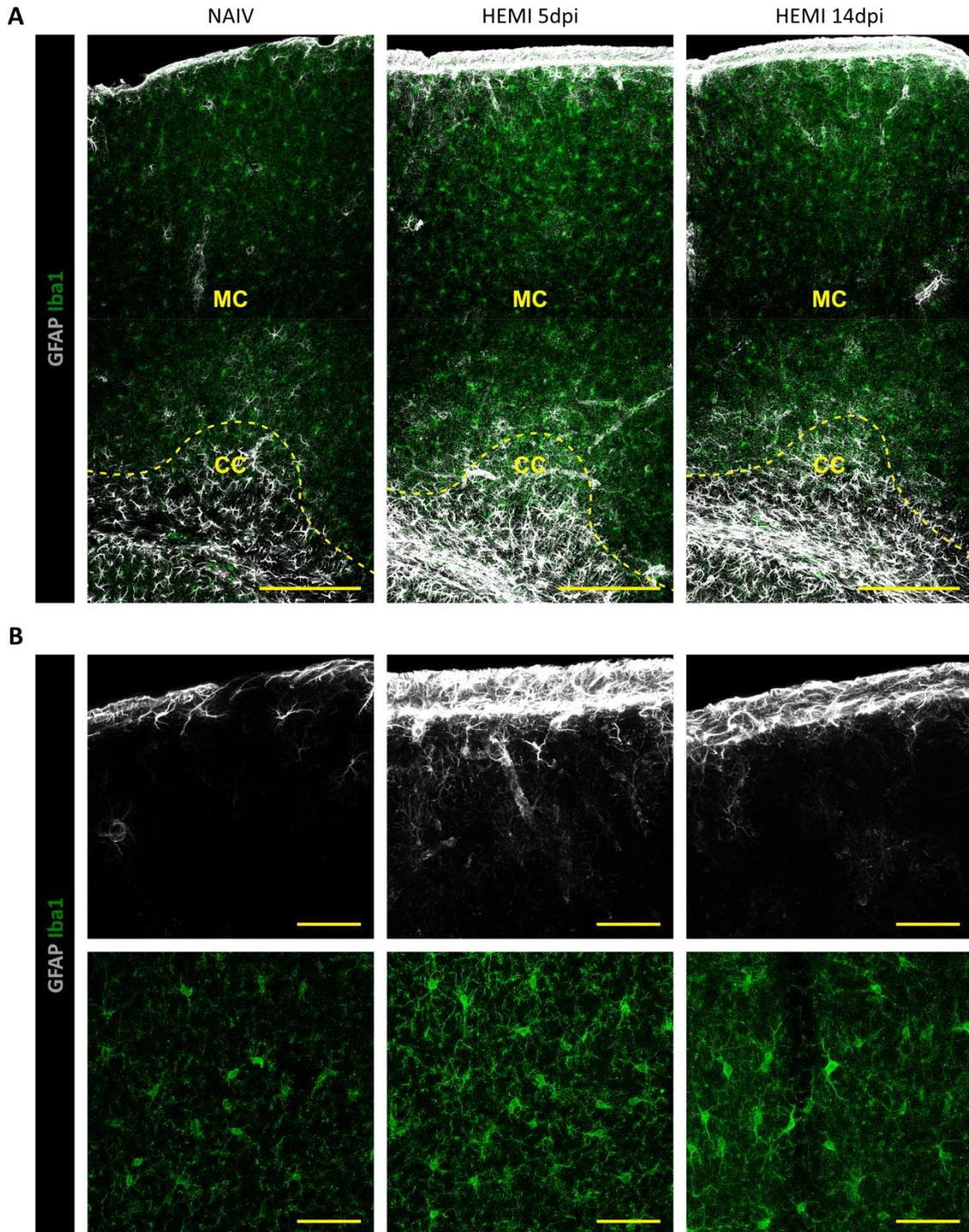


Abb. 6 Induktion einer reaktiven Gliose des zerebralen Kortex nach invasiver Rückenmarksverletzung

A Übersicht des Motorkortex zur Darstellung der veränderten Expressionslevel von GFAP/Iba1.

B Repräsentative Ausschnitte des Motorkortex mit morphologisch veränderten Astrozyten (GFAP) und Mikroglia (Iba1).

Zur Identifizierung einzelner Zellen wurden die Zellkerne zusätzlich mit DAPI gegengefärbt. Maßstabsbalken: 200 µm (A); 50 µm (B)
 CC: Corpus callosum; dpi: Tage nach Intervention; HEMI: thorakale dorsale Hemisektion; MC: Motorkortex; NAIV: unverletzte, gesunde Tiere

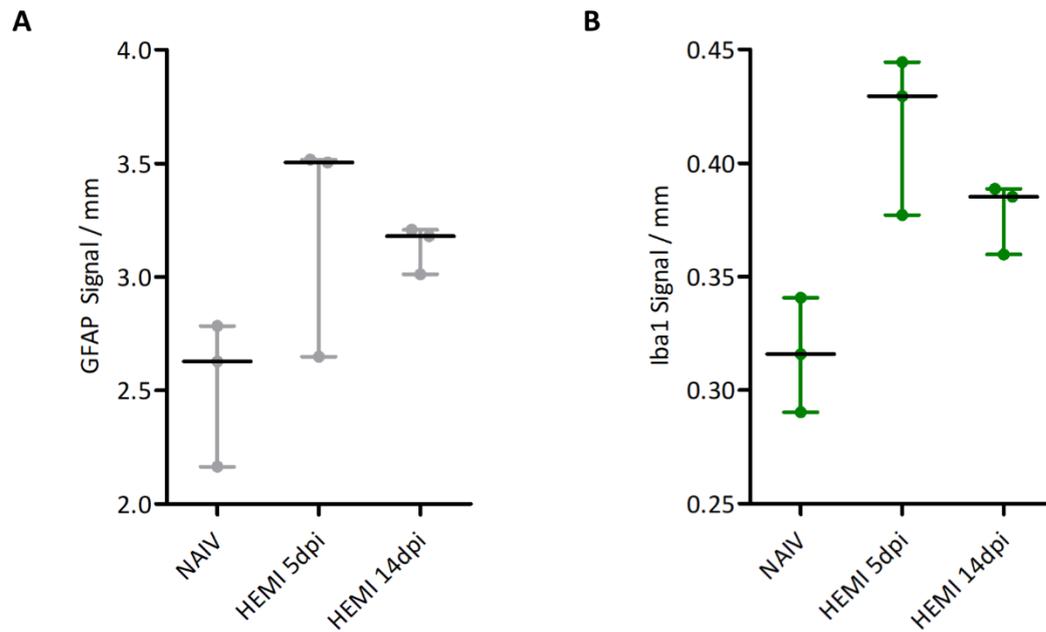


Abb. 7 Quantifizierung der veränderten Expression glialer Marker im zerebralen Kortex

A, B Quantifizierung der Signalveränderungen von GFAP (A) und Iba1 (B) jeweils unverletzt, 5 und 14 Tage nach Rückenmarksverletzung in der kortikalen grauen Substanz. Median \pm Interquartilsabstand; n = 3; Mann-Whitney-U; NAIV vs. HEMI $p \geq 0.1$; Kruskal-Wallis (GFAP: $p = 0.113$, Iba1: $p = 0.051$)

dpi: Tage nach Intervention; HEMI: thorakale dorsale Hemisektion; NAIV: unverletzte, gesunde Tiere

Die Quantifizierung der entsprechenden Signale von GFAP (Abb. 7A) sowie Iba1 (Abb. 7B) zeigte auch objektiv einen Gipfel 5 Tage nach der Verletzung, wobei das Signal für GFAP im Mittel um das 1.28-fache und für Iba1 um das 1.32-fache anstieg (n=3; Mann-Whitney-U; GFAP: $p=0.2$; Iba1: $p=0.1$). Auch 14 Tage nach invasivem Rückenmarkstrauma waren die gemessenen Signale noch im Verhältnis zur unverletzten Kontrollgruppe 1.24-fach (GFAP) beziehungsweise 1.20-fach (Iba1) erhöht (n=3; Mann-Whitney-U; GFAP: $p=0.1$; Iba1: $p=0.1$). Diese Auswertung zeigte somit eine reaktive Überexpression der glialen Marker GFAP und Iba1 in Folge der invasiven Rückenmarksverletzungen, die mit den beobachteten morphologischen Veränderungen korrelierte. Während die vermehrte GFAP-Expression im Verlauf auf keinen Analysezeitpunkt eindeutig beschränkt war, deutete die Varianzanalyse auf eine Iba1-Überexpression insbesondere am 5. Tag nach Rückenmarkstrauma hin (n=3; Kruskal-Wallis; GFAP: $p=0.113$; Iba1: $p=0.051$).

Mikroglia können im Rahmen ihrer Immunreaktion durch verschiedene Signale als Reaktionen auf pathologische Veränderungen rekrutiert werden und zeichnen sich durch ihr Migrationspotenzial aus (Nimmerjahn, Kirchhoff and Helmchen, 2005; Hughes *et al.*, 2013; Wicher *et al.*, 2017). Es stellte sich daher die Frage, ob die Erhöhung des gemessenen Iba1-Signals allein auf Aktivierung ortsansässiger oder auch auf die Rekrutierung zusätzlicher Makrophagen durch Zellteilung oder periphere Einwanderung zurückzuführen war. Die exemplarische Quantifizierung repräsentativer Bereiche des motorischen Kortex (Abb. 8) zeigten allerdings quantitativ stabile Iba1⁺ Zellpopulationen (n=3; Mann-Whitney-U; p=0.35). Somit kann davon ausgegangen werden, dass dem in dieser Arbeit vermehrt akquirierten Iba1-Signal eine zelluläre Überexpression zugrunde lag und eine Rekrutierung nicht maßgeblich dazu beigetragen hat.

Aus den Beobachtungen der erhöhter GFAP- sowie Iba1-Expression im Sinne einer Aktivitätszunahme der markierten Astrozyten und Mikroglia ergibt sich die Induktion einer kortikalen reaktiven Gliose, die sowohl in der Akutphase als auch in der subakuten Phase nach invasiver Rückenmarksverletzung nachgewiesen werden konnte.

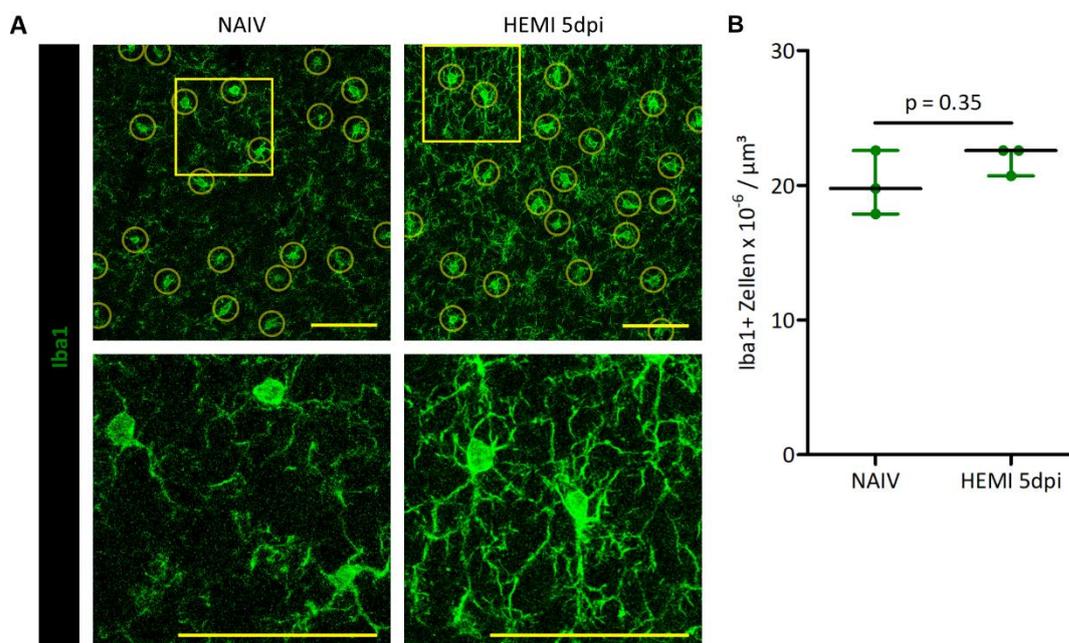


Abb. 8 Exemplarische Quantifizierung von Iba1⁺ Zellen in der kortikalen grauen Substanz

A Repräsentative Aufnahmen aus der grauen Substanz des Motorkortex von unverletzten Tieren im Vergleich zu 5 Tagen nach Rückenmarksverletzung.

B Quantifizierung der Anzahl von Iba1⁺ Zellen aus repräsentativen Kortexaufnahmen. Median ± Interquartilsabstand; n = 3; Mann-Whitney-U; NAIV vs. HEMI p = 0.35

Zur Identifizierung einzelner Zellen wurden die Zellkerne zusätzlich mit DAPI gegengefärbt. Maßstabsbalken: 50 μm (A) dpi: Tage nach Intervention; HEMI: thorakale dorsale Hemisektion; NAIV: unverletzte, gesunde Tiere

3.2 Vergrößerter Pool proliferierender Zellen im zerebralen Hirnparenchym

Funktionelle Untersuchungen nach Querschnittslähmungen zeigen eindrucksvoll, wie tiefgreifend kortikale Reaktionen und anschließende Anpassungsprozesse nach Rückenmarksverletzungen ausfallen können. Hierbei konnte dargestellt werden, dass sich regionale funktionelle Zuständigkeiten sowohl motorischer als auch somatosensorischer Kortexareale stark verändern und auch gänzlich vom physiologischen Zustand abweichen können (Nardone *et al.*, 2013). Eine solche Plastizität setzt eine Aktivierung mit Wiedereintritt der überwiegend ausdifferenzierten ZNS-Zellen in einen aktiven Zellzyklus voraus. Da dabei die Art und Intensität der zugrundeliegenden Pathologie eine tragende Rolle spielt, kann durch die Analyse der reaktiven Proliferation in dieser Arbeit eine Einschätzung zur potenziellen Relevanz der durchgeführten Eingriffe für das gesamte ZNS und dessen übergeordneten Funktionen abgeleitet werden.

In der Gegenüberstellung der HEMI- mit der NAIV-Gruppe war bereits in der Übersicht ein deutlicher Unterschied in der Anzahl Ki67⁺ Zellen zu erkennen (Abb. 9). Die in Abb. 9A mit abgebildeten und deutlich auffälligen neurogenen Nischen des Hippocampus und der subventrikulären Zone wurden im Rahmen dieses Projektes ebenfalls untersucht und wiesen signifikante Veränderungen auf (Li *et al.*, unveröffentlichte Daten). Die Quantifizierung Ki67⁺ Zellen in der kortikalen grauen Substanz (Abb. 10) 5 Tage nach invasiver Rückenmarksverletzung ergab einen Anstieg proliferierender Zellen im Mittel um das 3.95-fache pro mm³ gegenüber der unverletzten Kontrollgruppe (n=3; Mann-Whitney-U; p=0.1). Im weiteren Verlauf orientierte sich der Pool proliferativer Zellen wieder in Richtung des physiologischen Ausgangsniveaus und betrug 14 Tage nach der Verletzung im Mittel nur noch das 1.37-fache pro mm³.

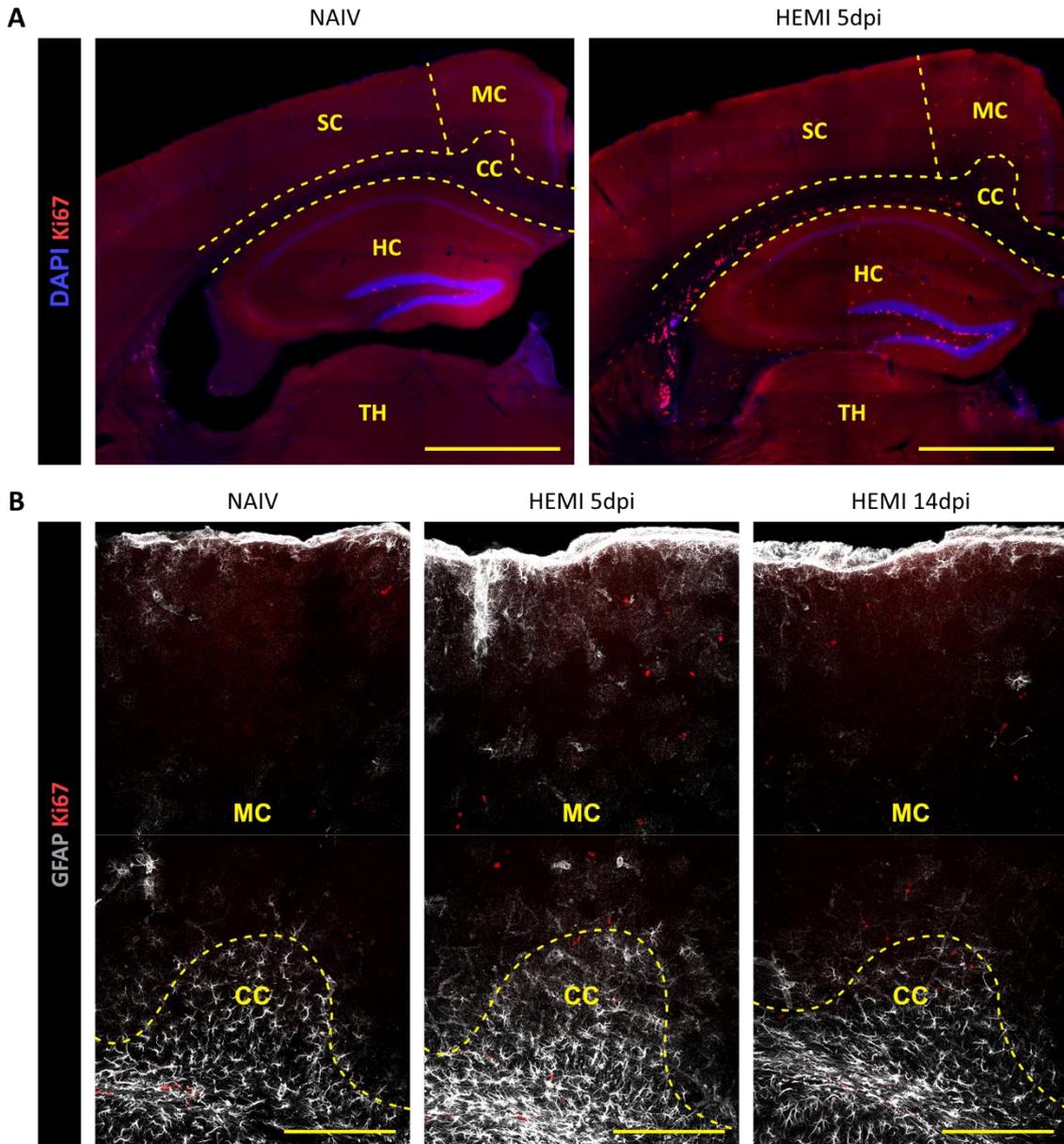


Abb. 9 Veränderungen in der proliferativen Kapazität von ZNS-Parenchymzellen nach invasiver Rückenmarksverletzung

A Übersichtsaufnahmen der analysierten Koronarschnitte aus dem Mausvorderhirn.

B Darstellung der Verteilung Ki67⁺ Zellen innerhalb des Motorkortex im Rahmen der reaktiven Veränderungen.

Zur Identifizierung einzelner Zellen wurden die Kerne zusätzlich mit DAPI gegengefärbt. Maßstabsbalken: 1000 μm (A), 200 μm (B)
 CC: Corpus Callosum; dpi: Tage nach Intervention; HEMI: thorakale dorsale Hemisektion; HC: Hippocampus; MC: motorischer Kortex; NAIV: unverletzte, gesunde Tiere; SC: somatosensorischer Kortex; TH: Thalamus

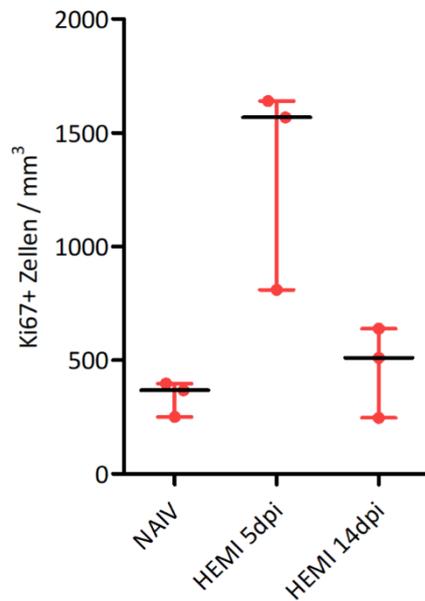


Abb. 10 Quantifizierung kortikaler Ki67+ Zellen nach Intervention

A Quantifizierung der Ki67+ Zellen der kortikalen grauen Substanz nach invasiver Rückenmarksverletzung. Median \pm Interquartilsabstand; n = 3; Mann-Whitney-U; NAIV vs. HEMI p \geq 0.1; Kruskal-Wallis p = 0.061

dpi: Tage nach Intervention; HEMI: thorakale dorsale Hemisektion; NAIV: unverletzte, gesunde Tiere

Dieser Verlauf zeigte somit eine deutliche Aktivierung der endogenen proliferativen Kapazität parenchymaler Zellpopulationen unmittelbar nach invasiven Rückenmarkstraumata. Während Merkmale einer Aktivierung glialer Zellen im zerebralen Kortex über das akute Stadium hinaus bestanden (Abb. 7), beschränkte sich die proliferative Reaktion hauptsächlich auf die Akutphase nach Rückenmarksverletzungen (n=3; Kruskal-Wallis; p=0.061).

3.3 Charakterisierung proliferierender Zellen im zerebralen Kortex

Um die mitotisch aktiven Zellen nach Rückenmarkstraumata zu charakterisieren, wurden die immunhistochemischen Markierungen von Ki67 und GFAP (Abb. 11A) beziehungsweise Iba1 (Abb. 11B) kombiniert und doppelt positive Zellen in verschiedenen Regionen des zerebralen Kortex quantifiziert. Dabei wurde neben dem Vergleich von invasiven Rückenmarkstraumata (HEMI) mit unverletzten Tieren (NAIV) auch die proliferierende Zellpopulation in Kontrolltieren mit nicht ZNS-penetrierender Rückenoperation (SHAM) berücksichtigt.

Die Auswertung der Fraktionen reaktiv proliferierender Zellen zeigte eine überdurchschnittliche Beteiligung GFAP⁺ sowie Iba1⁺ Zellen sowohl nach invasivem Rückenmarkstrauma (Abb. 11C) als auch der durchgeführten Kontrolloperation (Abb. 11D). Der Anteil der mitotisch aktiven GFAP⁺ an allen Ki67⁺ Zellen vergrößerte sich 5 Tage nach Intervention von durchschnittlich 4.0% auf 8.9% nach invasiver Rückenmarksverletzung sowie 8.8% nach Kontrolloperation (n=3; Mann-Whitney-U; HEMI: p=0.1; SHAM: p=1.0). Zum gleichen Zeitpunkt stieg der Anteil Ki67⁺Iba1⁺ Zellen ebenfalls im Mittel von 0.6% auf 4.5% nach ZNS-invasiver und 5.3% nach nicht ZNS-penetrierender Rückenoperation an (n=3; Mann-Whitney-U; HEMI: p=0.08; SHAM: p=0.18). Diese vermehrte proliferative Aktivität innerhalb der Fraktionen GFAP⁺ und Iba1⁺ Zellen konnte auch 14 Tage nach den Interventionen auf Rückenmarksebene noch nachgewiesen werden. Dabei war der Anteil der GFAP⁺ an allen Ki67⁺ Zellen nach invasiver Rückenmarksverletzung immer noch 1.80-mal und der Iba1⁺ Zellen 7.98-mal so hoch wie bei naiven Tieren (n=3; Mann-Whitney-U; GFAP: p=0.7; Iba1: p=0.18). Auch 14 Tage nach einer nicht ZNS-penetrierenden Kontrolloperation waren die Ki67⁺GFAP⁺ Zellen im Mittel 2.78-fach und die Ki67⁺Iba1⁺ Zellen 3.22-fach gegenüber dem Niveau naiver Tiere erhöht (n=3; Mann-Whitney-U; GFAP: p=0.1; Iba1: p=0.18).

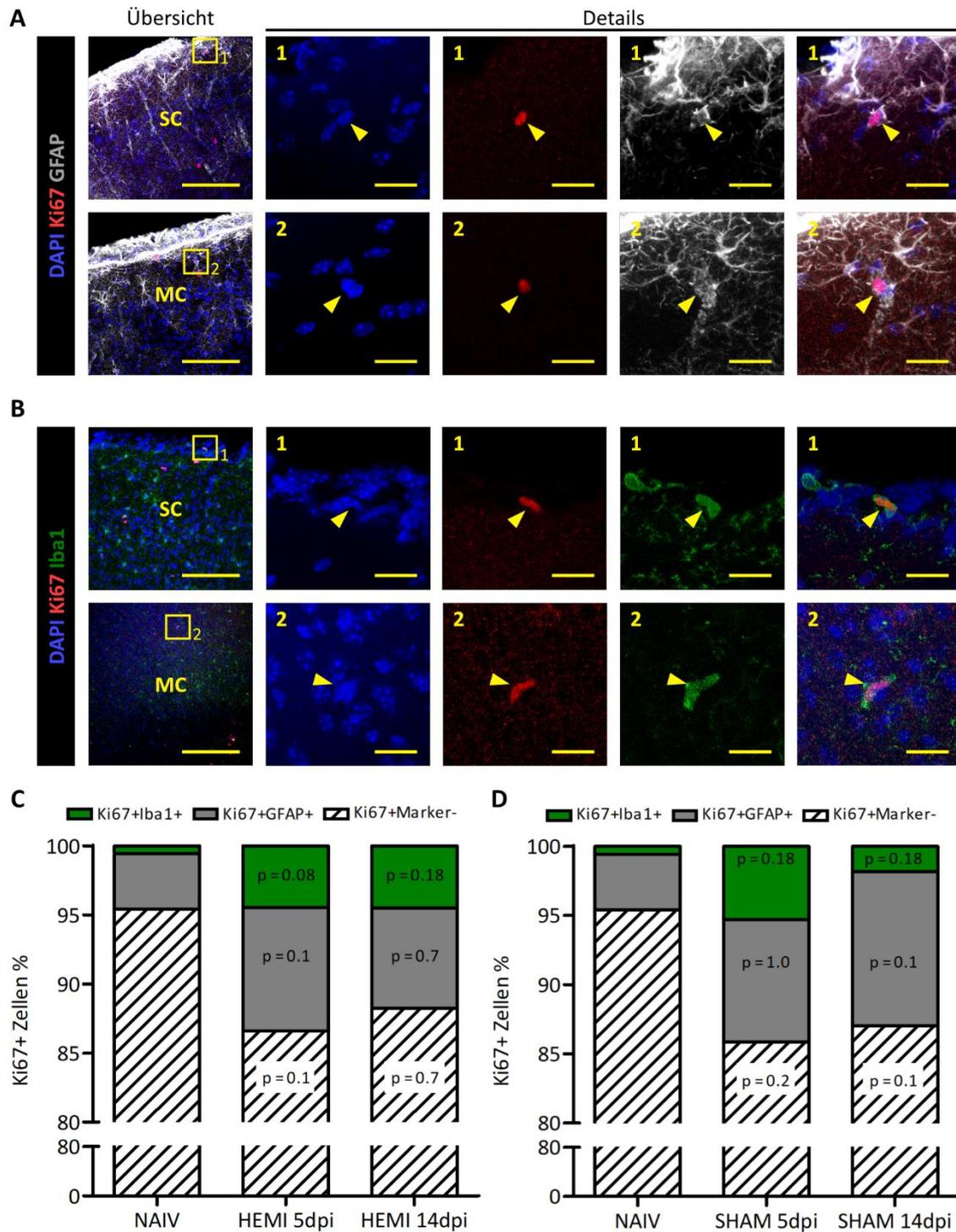


Abb. 11 Charakterisierung von kortikal proliferierenden Zellen nach invasiver Rückenmarksverletzung und Kontrolloperation

A, B Repräsentative Übersicht- und Detailaufnahmen von Ki67*GFAP* (A) sowie Ki67*Iba1* (B) doppelt positiv quantifizierten Zellen.

C, D Charakterisierung ausgewerteter Ki67* Zellen in der kortikalen grauen sowie weißen Substanz jeweils 5 und 14 Tage nach invasiver Rückenmarksverletzung (C) und nicht ZNS-penetrierender Kontrolloperation (D). Mittelwerte; n = 3; Mann-Whitney-U gegen die NAIV Gruppe siehe Diagramm; Kruskal-Wallis HEMI (Ki67*Iba1*: p = 0.113, Ki67*GFAP*: p = 0.288, Ki67*Marker: p = 0.288); Kruskal-Wallis SHAM (Ki67*Iba1*: p = 0.146, Ki67*GFAP*: p = 0.252, Ki67*Marker: p = 0.099)

Maßstabsbalken: 100 µm (Übersicht); 20 µm (Details); dpi: Tage nach Intervention; HEMI: thorakale dorsale Hemisektion; SHAM: Kontrolloperation ohne penetrierende ZNS-Verletzung

Obwohl es sich bei den dargestellten Veränderungen um eine jeweils über 2-fache Zunahme der Fraktion proliferierender Gliazellen handelt, konnten hierbei nicht zuletzt aufgrund der bisher geringen Anzahl ausgewerteter Individuen keine signifikanten Aussagen getroffen werden. Auch im Rahmen einer Varianzanalyse der verschiedenen Zeitpunkte wurde sowohl nach invasivem Rückenmarkstrauma (n=3; Kruskal-Wallis; Ki67⁺Iba1⁺: p=0.113, Ki67⁺GFAP⁺: p=0.288, Ki67⁺Marker⁻: p=0.288) als auch Kontrolloperation (n=3; Kruskal-Wallis; Ki67⁺Iba1⁺: p=0.146, Ki67⁺GFAP⁺: p=0.252, Ki67⁺Marker⁻: p=0.09) kein herausragender Zeitpunkt innerhalb des Reaktionsverlaufes einer der beobachteten Zellfraktionen gefunden.

Jedoch zeigen diese Ergebnisse, dass die untersuchten Gliazellpopulationen im Vergleich zum gesamten Pool proliferierender Zellen tendenziell überdurchschnittlich stark mit einem Wiedereintritt in einen aktiven Zellzyklus auf ein Rückenmarkstrauma reagieren. Anders als die Entwicklung der absoluten Anzahl Ki67⁺ Zellen im subakuten Stadium vermuten lässt (Abb. 10), stellt sich das physiologische Ausgangsniveau zumindest für diese Zellpopulationen nicht in gleichem Ausmaß wieder ein. Die Fraktionen der GFAP⁺ sowie Iba1⁺ Zellen haben hingegen auch 14 Tage nach dem Trauma immer noch einen größeren Anteil am Pool mitotisch aktiver Zellen als in gesunden Tieren. Neben den über das Akutstadium hinaus bestehenden Aktivierungsmerkmalen glialer Zellen (siehe 3.1) ist dies ein weiteres Anzeichen für längerfristige reaktive Veränderung von Astrozyten und Mikroglia nach Rückenmarkstrauma.

Im Vergleich zu bisher vorgestellten Auswertungen wurde in dieser Analyse auch ein vergleichbarer Effekt auf die kortikalen Gliazellen in der Kontrollgruppe mit nicht ZNS-penetrierenden Rückenoperationen (SHAM) dargestellt. Die daraus resultierenden Fragen nach dem generellen Ausmaß der reaktiven Veränderungen speziell in dieser experimentellen Gruppe sowie dem Einfluss der Invasivität und Rückenmarksnähe der induzierten Verletzung werden in den folgenden Kapiteln vertieft (siehe 3.7).

3.4 Verschiedene funktionelle und histologische Kompartimente im Vergleich

Um festzustellen ob und inwiefern die aufgezeigten reaktiven Veränderungen astro- und mikroglialer Zellen in ihrer Lokalisation mit regionsspezifischen Funktionen korrelieren, wurden diese sowohl in verschiedenen histologischen Kompartimenten (Abb. 12) als auch im intrakortikalen Vergleich zwischen motorischen und somatosensorischen Kortex (Abb. 13) gegenübergestellt. Folgenden Ergebnisse stellen erneut die reaktiven Veränderungen 5 Tage nach invasivem Rückenmarkstrauma (HEMI) der physiologischen Ausgangssituation (NAIV) gegenüber.

Zunächst wurde proliferierende Zellen der kortikalen grauen Substanz der angrenzenden weißen Substanz gegenübergestellt (Abb. 12). Dabei zeigten die Anzahl Ki67⁺ Zellen mit Anstiegen im Mittel um das 3.95-fache in der grauen gegenüber dem 3.03-fachen in der weißen Substanz nur geringfügige Unterschiede (n=3; Mann-Whitney-U; p=0.1). Die Expression von GFAP war auf Basis des immunhistochemischen Signals im selben Vergleich durchschnittlich 1.28-fach in der grauen und 1.34-fach in der weißen Substanz erhöht (Abb. 12C; n=3; Mann-Whitney-U; p=0.1). Und auch das Iba1-Signal zeigte im Mittel mit dem 1.32-fachen sowie 1.17-fachen naiver Tiere in grauer und weißer Substanz keine eindeutig differenzierbaren Unterschiede (Abb. 12D; n=3; Mann-Whitney-U; p=0.4).

Es folgte die Gegenüberstellung einzelner Schichten des Isokortex der grauen Substanz (Abb. 12), da hier nicht zuletzt durch die Präsenz verschiedener Subpopulationen kortikaler Neuronen jeweils spezifische histologische Verhältnisse vorliegen. Dabei wurden speziell die Kortexschicht I – III den darauf folgenden Schichten IV – VI gegenübergestellt (Vogt, 1919). Orientierend befinden sich in den ersten drei Schichten neuronale Ein- und Ausgänge zur intra- sowie interkortikalen Vernetzung. Die darauffolgenden Schichten enthalten im Gegensatz dazu spezifische thalamische Eingänge beziehungsweise kortikospinale Verbindungen, sodass sich neben den histologischen Unterschieden auch hier eine funktionelle Relevanz ergibt. Dieser Vergleich zeigte eine durchschnittlich um das 4.06-fache (Schicht I – III) im Vergleich zur 5.02-fachen Erhöhung (Schicht IV – VI) bezüglich der Anzahl Ki67⁺ Zellen (Abb. 12C; n=3; Mann-Whitney-U; p=1.0). Die Signale der glialen Marker waren hier im Mittel 1.29-mal

und 1.20-mal für GFAP sowie 1.38-mal und 1.20-mal für Iba1 relativ zu Messwerten aus unverletzten Tieren verändert (Abb. 12D; n=3;Mann-Whitney-U;GFAP:p=0.1;Iba1:p=0.1).

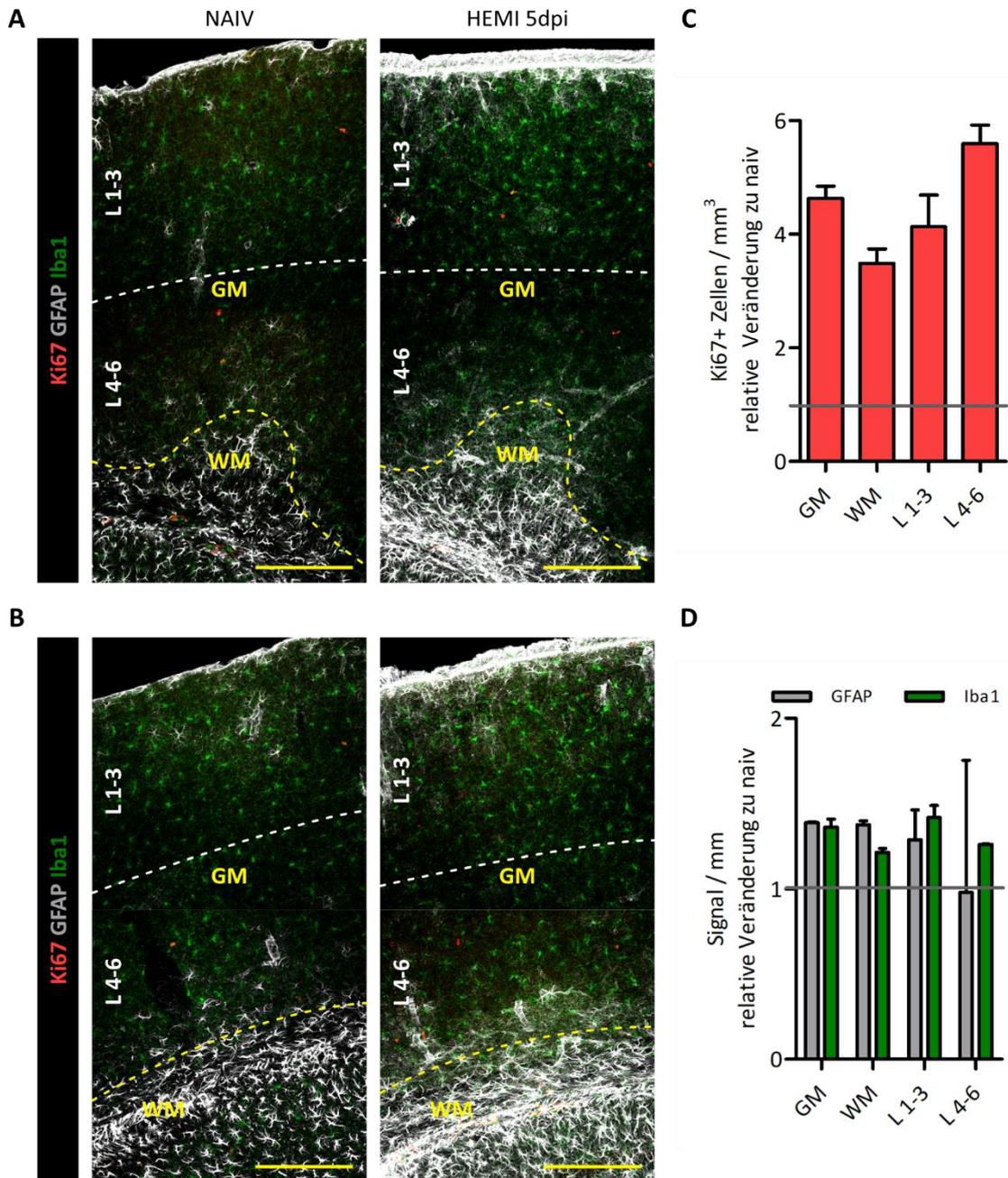


Abb. 12 Vergleich intrakortikaler histologischer Kompartimente

A, B Repräsentative Übersichtsaufnahmen des motorischen (A) und somatosensorischen (B) Kortex naiver Tiere und 5 Tage nach invasiver Rückenmarksverletzung.

C, D Vergleich des quantifizierten proliferativen Pools (C) sowie glialer Marker (D) in unterschiedlichen histologischen Kompartimenten des Kortex 5 Tage nach Rückenmarksverletzung relativ zu der naiven Ausgangssituation. Median ± Interquartilsabstand; n = 3; Mann-Whitney-U; GM vs. WM (Ki67: p = 0.1, GFAP: p = 0.1, Iba1: p = 0.4); L1-3 vs. L4-6 (Ki67: p = 1.0, GFAP: p = 0.1, Iba1: p = 0.1)

Zur Identifizierung einzelner Zellen wurden die Zellkerne zusätzlich mit DAPI gegengefärbt. Maßstabsbalken: 200 μ m (A, B) dpi: Tage nach Intervention; GM: Graue Substanz; HEMI: thorakale dorsale Hemisektion; L: Kortexschicht; NAIV: unverletzte, gesunde Tiere; WM: weiße Substan

Insgesamt konnte mit den verwendeten Methoden keine eindeutige Tendenz in der histologischen Verteilung der reaktiven kortikalen Veränderungen nachgewiesen werden. Jedoch konnten die Erkenntnisse der vorangegangenen Ergebnisse bezüglich eines vermehrten Nachweises reaktiver Zellen erneut dargestellt und somit bestätigt werden.

Der intrakortikale Vergleich zeigte ubiquitär ebenfalls eine deutlich vermehrte Anzahl Ki67⁺ Zellen (Abb. 13C), die bei dieser Betrachtung im Mittel 2.40-fach im motorischen sowie 4.40-fach im somatosensorischen Kortex relativ zur gesunden Kontrollgruppe erhöht war. Somit wurde ein fast doppelt so starker Anstieg im somatosensorischen gegenüber dem motorischen Kortex bezüglich Ki67⁺ Zellen festgestellt (n=3; Mann-Whitney-U; p=0.7). Die Auswertung der glialen Marker zeichnete erneut das Bild einer vermehrten kortikalen Gliaaktivierung (Abb. 13D). Das Signal für GFAP war im Mittel 1.25-mal gegenüber 1.32-mal und für Iba1 1.21-mal gegenüber 1.33-mal im jeweiligen motorischen beziehungsweise somatosensorischen Kortexareal relativ zur unverletzten Kontrollgruppe erhöht (n=3; Mann-Whitney-U; GFAP: p=0.4; Iba1: p=0.7). Die vermehrte Expression von GFAP sowie Iba1 viel somit auch über die beobachteten Kortexareale hinweg vergleichbar aus.

Diese Gegenüberstellung des motorischen und somatosensorischen Kortex ist nicht rein funktionell, sondern auch aus neuroanatomischer Perspektive von Interesse, da die dem Motorkortex entspringenden Motorneurone direkt durch das Rückenmark ziehen, wohingegen die somatosensorischen Projektionen des Rückenmarks den Kortex erst indirekt mit dem dritten Neuron erreichen. Der Ort dieser neuronalen Integration sensibler Afferenzen innerhalb des Thalamus wird im folgenden Kapitel genauer analysiert.

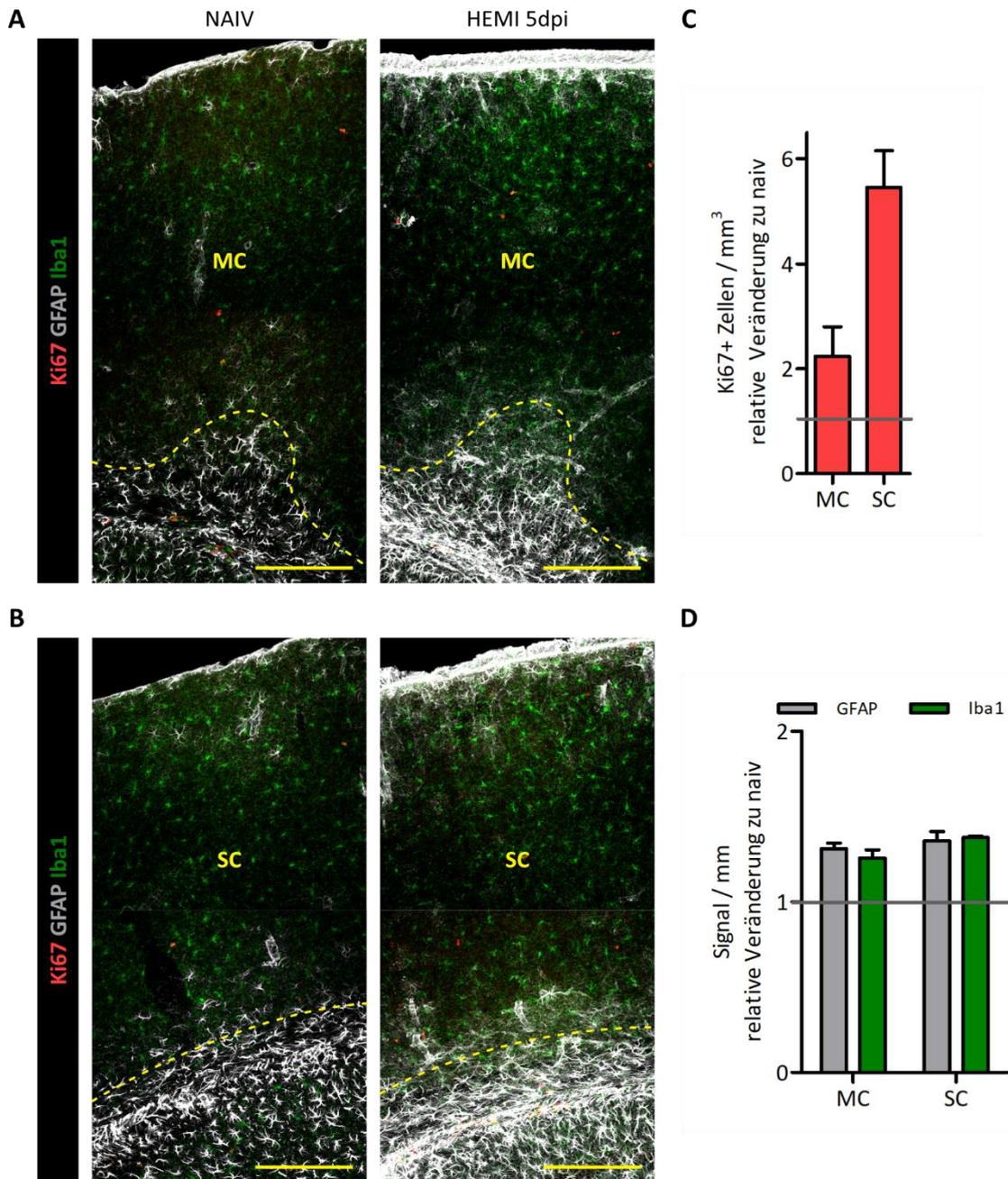


Abb. 13 Vergleich interkortikaler funktioneller Kompartimente

A, B Repräsentative Übersichtsaufnahmen des motorischen (A) und somatosensorischen (B) Kortex naiver Tiere und 5 Tage nach invasiver Rückenmarksverletzung.

C, D Vergleich des quantifizierten proliferativen Pools (C) sowie glialer Marker (D) in der grauen Substanz des motorischem und somatosensorischem Kortex 5 Tage nach Rückenmarksverletzung relativ zu der naiven Ausgangssituation. Median \pm Interquartilsabstand; n = 3; Mann-Whitney-U; MC vs. SC (Ki67: p = 0.7, GFAP: p = 0.4, Iba1: p = 0.7)

Zur Identifizierung einzelner Zellen wurden die Zellkerne zusätzlich mit DAPI gegengefärbt. Maßstabsbalken: 200 μ m (A, B) dpi: Tage nach Intervention; HEMI: thorakale dorsale Hemisektion; MC: Motorkortex; NAIV: unverletzte, gesunde Tiere; SC: somatosensorischer Kortex

3.5 Veränderungen innerhalb des Nucleus ventralis posterior des Thalamus

Neben den kortikalen Analysen wurde der Aktivierungszustand glialer Zellen auch im Nucleus ventralis posterior untersucht, wo die Integration der Informationen aus dorsalen Rückenmarksprojektionen stattfindet (Abb. 14). Ich erhoffte mir dadurch Hinweise darauf zu erhalten, ob es verletzungsbedingte Veränderungen der Signaltransduktion ausgehend vom Rückenmark über das entsprechende thalamische Kerngebiet in Richtung des somatosensorischen Kortex geben könnte. Auch hier wurden Tiere 5 Tage nach invasiver Rückenmarksverletzung (HEMI) mit der unverletzten Kontrollgruppe (NAIV) verglichen.

Interessanterweise konnte in dem untersuchten Thalamusgebiet analog zu den ausgewerteten Kortextbereichen ebenfalls ein deutlicher Anstieg Ki67⁺ Zellen 5 Tage nach dem Trauma beobachtet werden. Im Mittel wurden pro mm³ 5.26-mal mehr Ki67⁺ Zellen quantifiziert als in der naiven Kontrollgruppe (Abb. 14C; n=3; Mann-Whitney-U; p=0.1). Das ausgewertete Signal von GFAP und Iba1 war jedoch mit einer Veränderung um das 1.05-fache (GFAP) beziehungsweise um das 0.90-fache (Iba1) mit den Signal-Levels der unverletzten Tiere vergleichbar (Abb. 14D-E; n=3; Mann-Whitney-U; GFAP: p=1.0; Iba1: p=0.2).

Somit konnte im Bereich des Nucleus ventralis posterior im Gegensatz zum zerebralen Kortex kein spezifischer Anhalt für reaktive Gliazellen gefunden werden. Aber auch dieses Hirnareal reagierte auf invasive Rückenmarkstraumata mit einer sehr deutlichen endogenen Aktivierung proliferativer Kapazitäten. Diese Resultate legen nahe, dass es auf zellulärer Ebene regionsspezifisch durchaus unterschiedliche Ausprägungen der Reaktionen auf die zugrundeliegende Pathologie einer invasiven Rückenmarksverletzung gibt. Während kortikal die untersuchten Astrozyten und Mikroglia offensichtlich Teil der reaktiven Veränderungen sind, scheinen im Bereich des Thalamus andere Zellpopulationen primär durch die Auswirkungen betroffen zu sein. Aufgrund ihres physiologisch bekannten Potenzials zu mitotischer Aktivität liegt der Verdacht nahe, dass im Nucleus ventralis posterior vermehrt NG2⁺ Gliazellen an den beobachteten Veränderungen beteiligt sein könnten.

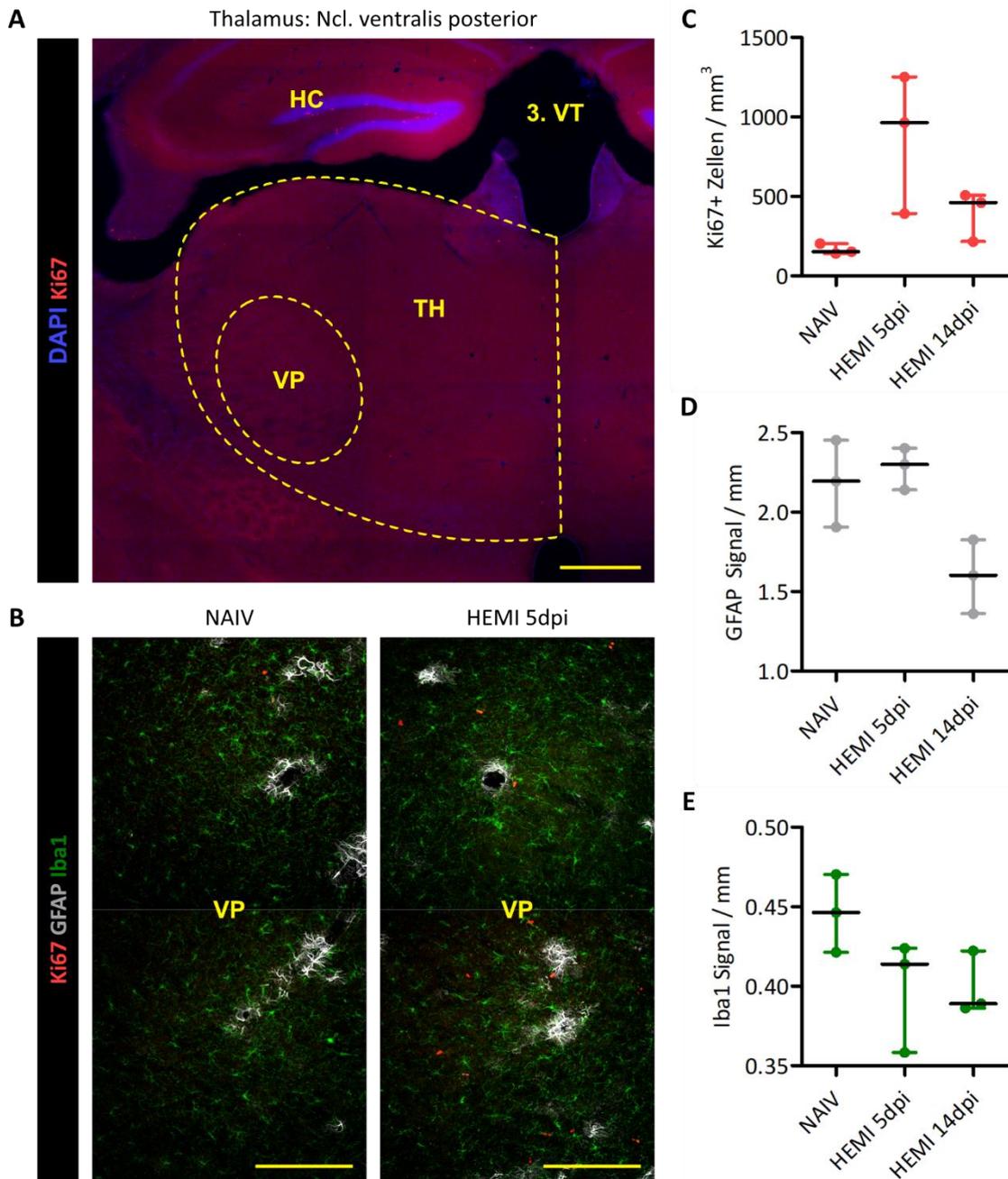


Abb. 14 Reaktive Veränderungen im Nucleus ventralis posterior des Thalamus

- A Übersichtsaufnahme des physiologischen Thalamus zur Darstellung der Lokalisation des Nucleus ventralis posterior.
 B Repräsentative Aufnahmen des Nucleus ventralis posterior ventralis aus gesunden Tieren und nach Intervention.
 C–E Vergleich des quantifizierten proliferativen Pools (C) sowie Signalsniveaus glialer Marker (D, E) im Bereich des Nucleus ventralis posterior des Thalamus nach invasiver Rückenmarksverletzung. Median \pm Interquartilsabstand; n = 3; Mann-Whitney-U; NAIV vs. HEMI p \geq 0.1

Zur Identifizierung einzelner Zellen wurden die Zellkerne zusätzlich mit DAPI gegengefärbt. Maßstabsbalken: 500 μ m (A), 200 μ m (B) dpi: Tage nach Intervention; HC: Hippocampus; HEMI: thorakale dorsale Hemisektion; NAIV: unverletzte, gesunde Tiere; TH: Thalamus; VT: Ventrikel; VP: Nucleus ventralis posterior

3.6 Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke nach Rückenmarksverletzung

Bei der Frage nach der Vermittlung der festgestellten glialen Aktivierungszustände wurde eine Beeinträchtigung der Blut-Hirn-Schranken-Permeabilität in Betracht gezogen. In diesem Fall wäre zu erwarten, dass durch einen zeitweisen Zusammenbruch dieser Barriere intravasale Bestandteile in das Hirnparenchym übertreten und dort die reaktiven Veränderungen in Gliazellen auslösen können. Für die Untersuchung wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Methode zur immunhistochemischen Darstellung der Blut-Hirn-Schranken-Permeabilität mittels einer intravasalen Cadaverin-Applikation von mir im Labor neu etabliert. Als positive Kontrolle für die erleichterte Diffusion des Tracers aus dem Blut in das Hirnparenchym wurde vorab ein Modell für invasive Traumata des somatosensorischen Kortex mittels Stichverletzung verwendet (Abb. 15A).

Die durchgeführte Analyse konnte bei Tieren 5 Tage nach Rückenmarksverletzung keinen vermehrten Austritt des verabreichten Tracers im Vergleich zu gesunden Tieren detektieren. Im Gegenteil war kortikal (Abb. 15B) durchschnittlich nur das 0.70-fache ($n=3$; Mann-Whitney-U; $p=0.2$) und im Nucleus ventralis posterior (Abb. 15C) das 0.67-fache ($n=3$; Mann-Whitney-U; $p=0.4$) des Cadaverinsignals gesunder Tiere messbar. Vermehrtes Tracer-Signal isoliert in Bereichen von Blutgefäßen konnte in keinem Fall beobachtet werden und bestätigte damit eine konstant suffiziente postmortale Perfusion der Mäuse. Dadurch konnten systemische Fehler durch Messdifferenzen in Folge unterschiedlicher Flächen angeschnittener Blutgefäße in dem jeweiligen Hirnschnittpräparaten ausgeschlossen werden.

Somit kann festgestellt werden, dass im Rahmen der Detektionsmöglichkeiten der verwendeten Methode keine Anzeichen für eine Erhöhung der Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke zum Analysezeitpunkt vorlag. Zu diskutieren bleibt die Tatsache, dass nach invasiver Rückenmarksverletzung konstant weniger Tracer-Signal gemessen wurde als bei unverletzten Tieren. Hierbei könnten Veränderungen bezüglich der ZNS-Durchblutung sowie der Liquorzirkulation durchaus zu systemischen Fehlern führen, die zum Beispiel durch vermehrtes Auswaschen zu einer nicht mit dem physiologischen Zustand vergleichbaren Verteilung des Tracers beitragen könnten.

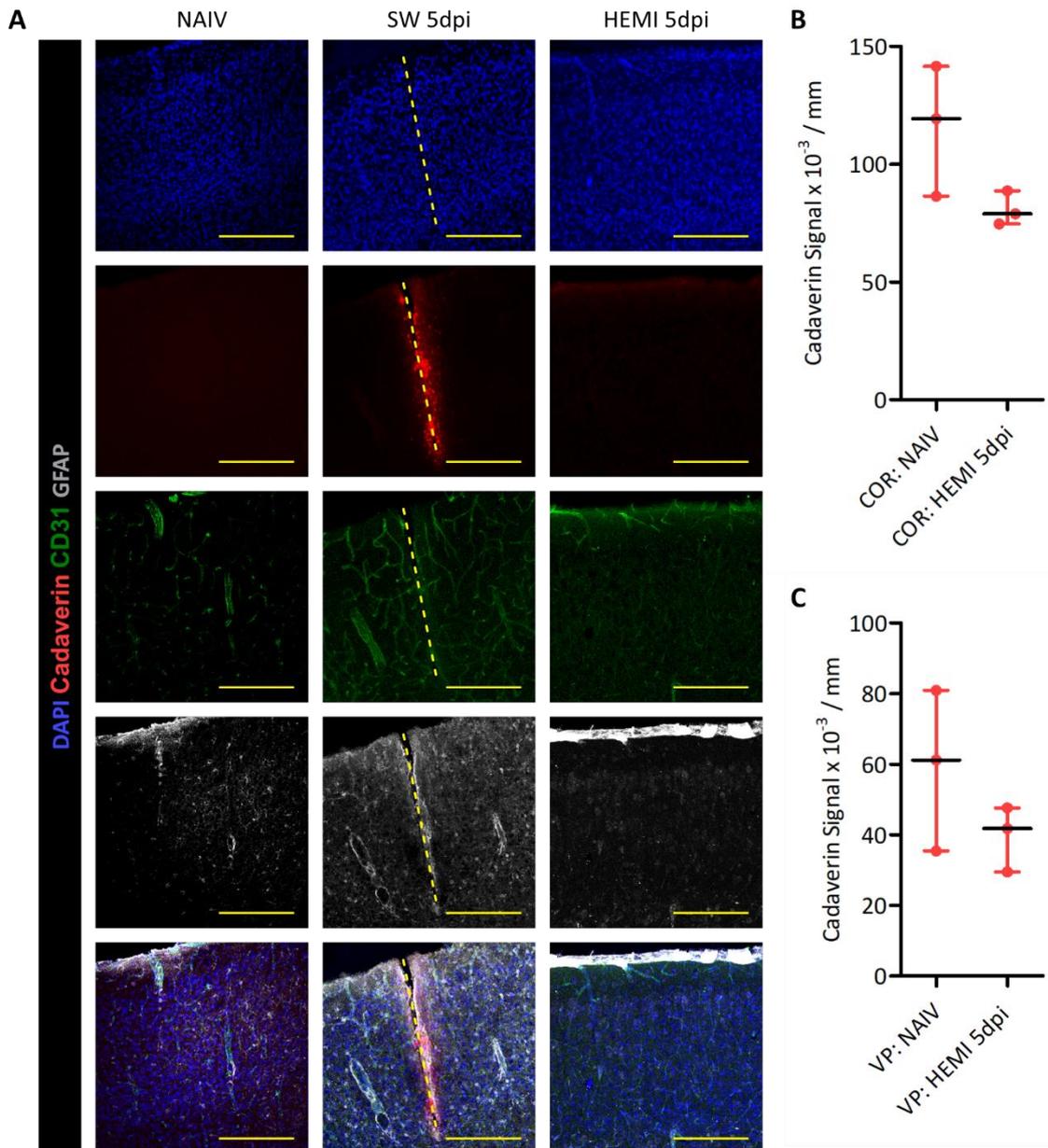


Abb. 15 Untersuchung der Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke als möglicher Weg einer systemischen Signaltransduktion

A Repräsentative Ausschnitte des somatosensorischen Kortex der naiven Kontrollgruppe, nach kortikaler Stichverletzung und nach dorsaler thorakaler Hemisektion jeweils mit intravenöser Injektion von Cadaverin 3 Stunden vor dem jeweiligen Analysezeitpunkt.

B, C, Quantifizierung des Cadaverinsignals in kortikaler grauer und weißer Substanz (B) sowie des Nucleus ventralis posterior (C). Median \pm Interquartilsabstand; n = 3; Mann-Whitney-U (COR: p = 0.2, TH: p = 0.4)

Maßstabsbalken: 200 μ m (A); COR: Kortex (graue + weiße Substanz); dpi: Tage nach Intervention; HEMI: thorakale dorsale Hemisektion; NAIV: unverletzte, gesunde Tiere; SW: kortikale Stichwunde; VP: Nucleus ventralis posterior

3.7 Einflussfaktoren auf die beobachteten reaktiven Gliaveränderungen

Im Mittelpunkt dieser Arbeit stand neben einer Zusammenfassung des Ausmaßes reaktiver Gliaveränderungen auch wesentliche Einflussfaktoren auf das verwendete tierexperimentelle Modell für Rückenmarksverletzungen zu untersuchen.

Um Auswirkungen einer spezifischen chirurgischen Intervention tatsächlich zuordnen zu können, wurden sogenannte Scheinoperationen (SHAM) durchgeführt. Hierbei kommt es bei gleichem Operationsverlauf lediglich zum Unterlassen der invasiven Verletzung dorsaler Teile des Rückenmarks. Daher wurde bei den in dieser Arbeit verwendeten SHAM-Tieren die Präparation der Wirbelsäule und das Anheben des Rückenwirbels identisch zur invasiven Rückenmarksverletzung durchgeführt. Jedoch wurde im letzten Schritt auf die Eröffnung der Hirnhäute mit operativer Durchtrennung der Hinterstrangbahnen auf Höhe des 8. Brustwirbelkörpers verzichtet.

Beobachtungen aus dieser SHAM-Gruppe als Kontroll-Kohorte nach nicht ZNS-penetrierender Rückenoperation (siehe 3.2) haben die Frage nach der Bedeutung von Invasivität und Rückenmarksnähe der Verletzungen für beobachtete gliale Reaktionen innerhalb des Kortex sowie des Thalamus aufgeworfen. Erstaunlicherweise konnten auch bei SHAM-operierten Tieren reaktive Veränderungen sowohl im Kortex (Abb. 16A-C) als auch im Thalamus (Abb. 16D-F) festgestellt werden. Vergleichbar mit den Ergebnissen nach invasiven Rückenmarksverletzungen konnten in beiden Hirnregionen eine erhöhte Anzahl proliferierender Zellen und ebenfalls hauptsächlich kortikal eine vermehrte Expression von GFAP sowie Iba1 als Hinweis auf eine gliaspezifische Reaktivität quantifiziert werden. Dabei betrug der Anstieg der Ki67⁺ Zellen innerhalb des zerebralen Kortex das 1.75-fache pro mm³ im Vergleich zu unverletzten Tieren (n=3; Mann-Whitney-U; p=0.1). Die Auswertung der glialen Expressionsmarker im Kortex ergaben gegenüber den physiologischen Ausgangswerten ein um das 1.23-fache erhöhte GFAP-Signal sowie ein um das 1.80-fache gesteigerte Iba1-Signal (n=3; Mann-Whitney-U; GFAP: p=0.1; Iba1: p=0.1). Diese Ergebnisse legen nahe, dass auch eine Verletzung der Wirbelsäule ohne invasives ZNS-Trauma eine Statusveränderung zerebraler Gliazellen auslösen kann.

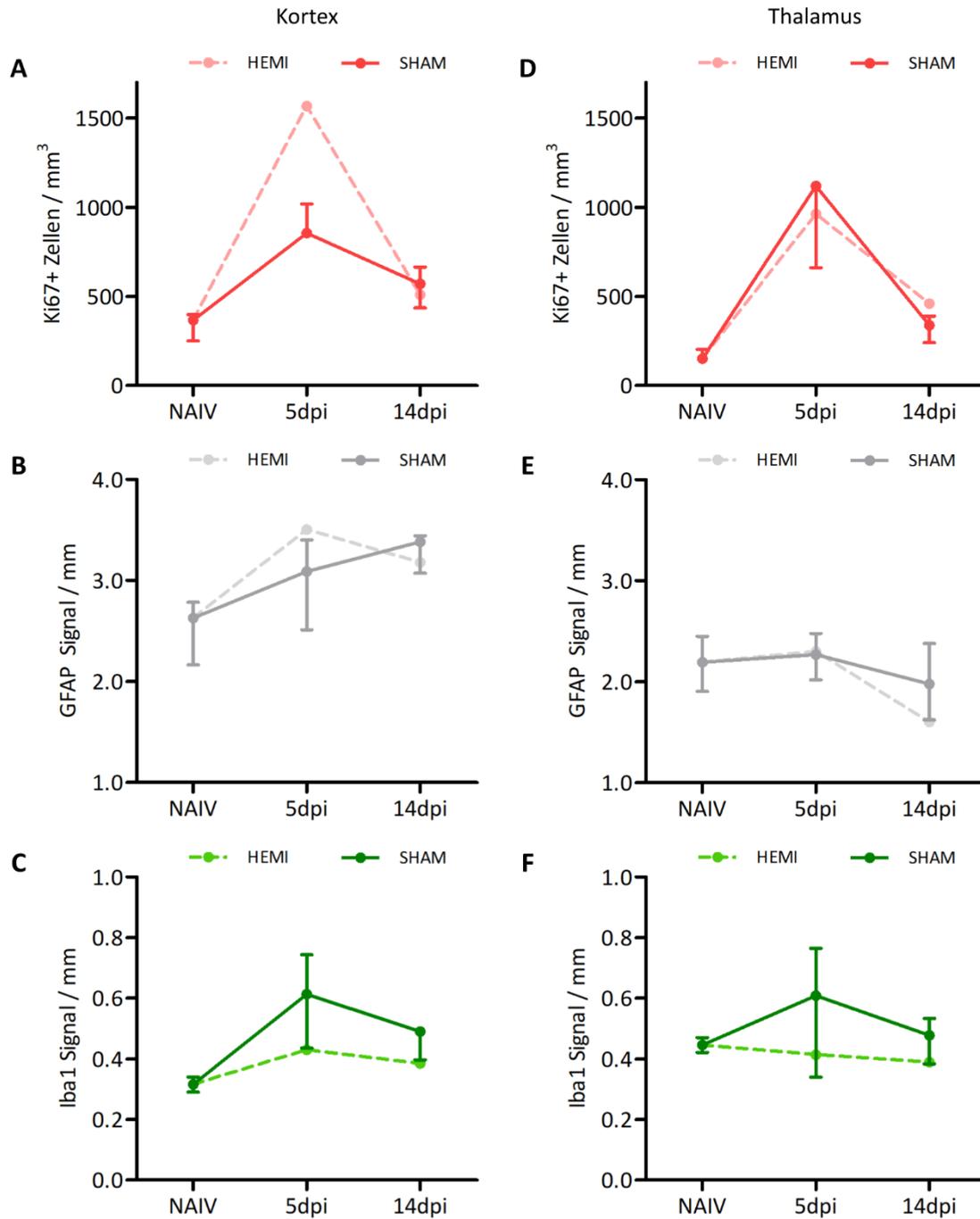


Abb. 16 Vergleichbare zelluläre Reaktion in der Kontrollgruppe mit nicht ZNS-penetrierender Wirbelsäulenoperation

A – C reaktive Veränderungen des Kortex nach Kontrolloperation und invasiver Rückenmarksverletzung; n=3; HEMI: Median; SHAM: Median ± Interquartilsabstand

D – F reaktive Veränderungen des Thalamus nach Kontrolloperation und invasiver Rückenmarksverletzung; n=3; HEMI: Median; SHAM: Median ± Interquartilsabstand

dpi: Tage nach Intervention; HEMI: thorakale dorsale Hemisektion; SHAM: Kontrolloperation ohne penetrierende ZNS-Verletzung

Es ist bekannt, dass verwendete Anästhesieverfahren potenziell den Verlauf zellulärer Reaktionen auf invasive ZNS-Verletzungen sowie einer postoperativen Inflammation beeinflussen können (Luh *et al.*, 2011). Daher wurde auch der Beitrag der in dieser Studie verwendeten Anästhesie (ANA) zur Aktivierung glialer Zellen im zerebralen Kortex untersucht und mit bereits generierten Kontrollgruppen verglichen. Die Anzahl Ki67⁺ Zellen lag im Mittel bei dem 0.92-fachen pro mm³ und die gemessenen Signal-Levels von GFAP sowie Iba1 beliefen sich auf das 1.11-fache (GFAP) beziehungsweise 1.15-fache (Iba1) der Werte von unverletzten Tieren (n=3; Mann-Whitney-U; Ki67⁺: p=0.4; GFAP: p=1.0; Iba1: p=0.1). Damit zeigte sich, dass die in dieser Studie angewendete Anästhesie sehr wahrscheinlich keinen Einfluss auf die Aktivierung kortikaler Astrozyten und Mikroglia hat.

Zusätzlich zu den bereits erwähnten experimentellen Gruppen wurde auch eine Kohorte mit einer geringfügigeren Verletzung der Dermis und Subkutis (SKIN) direkt über der Wirbelsäule zu der Analyse hinzugezogen. Aus der Gegenüberstellung der gemessenen Parameter in den Gruppen NAIV, SKIN, SHAM und HEMI ergab sich in Bezug auf die Verletzungsinvasivität eine deutlich positive Korrelation (n=3; Spearman; Ki67⁺: r=0.78 [0.35 – 0.94], p=0.003; GFAP: r=0.56 [-0.04 – 0.86], p=0.058) vor allem für Ki67⁺ Zellen (Abb. 17D) aber auch für das GFAP-Signal (Abb. 17E). Eine Auswertung der Varianz über diese Kohorten zeigte des Weiteren einen signifikanten Unterschied der Anzahl Ki67⁺ Zellen (Abb. 17B) nach Hautschnitt gegenüber invasiver Rückenmarksverletzung (n=3; Kruskal-Wallis; Ki67: p=0.023). Bei den Varianzanalysen des GFAP- sowie Iba1-Signals (Abb. 17C) innerhalb der angeführten Gruppen war hingegen der Iba1-Signalunterschied von naiven im Vergleich zu nicht-invasiv verletzten Tieren signifikant (n=3; Kruskal-Wallis; GFAP: p=0.27; Iba1: p=0.027). Die aufgenommenen Iba1-Signale aus der Hautschnittkohorte wichen nach einem Laserwechsels im Konfokalmikroskop deutlich von den Messungen der anderen vorher akquirierten Gruppen ab, sodass diese von der Auswertung ausgeschlossen wurden.

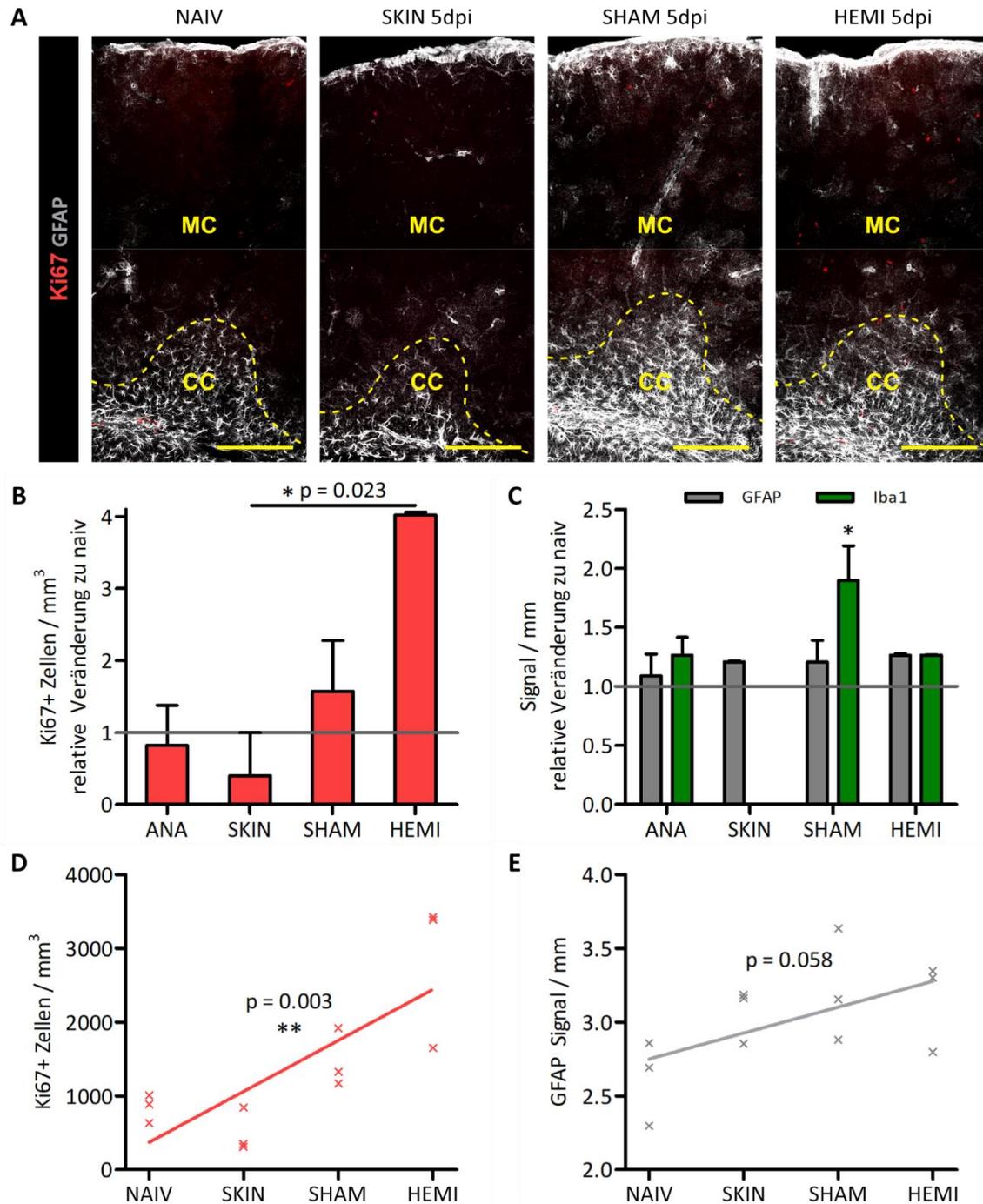


Abb. 17 Untersuchung der Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke als möglicher Weg einer systemischen Signaltransduktion

- A Repräsentative Übersichtsdarstellungen des Motorkortex 5 Tage nach den unterschiedlichen Interventionen.
 B, C Quantifizierung reaktiver Veränderungen der jeweiligen Interventionsgruppen nach 5 Tagen in der kortikalen grauen sowie weißen Substanz. Median \pm Interquartilsabstand; n = 3; Kruskal-Wallis siehe Diagramm; Mann-Whitney-U SHAM (Ki67: p = 0.1, GFAP: p = 0.1, Iba1: p = 0.1), Mann-Whitney-U HEMI (Ki67: p = 0.1, GFAP: p = 0.2, Iba1: p = 0.1)
 D, E Analyse des Einflusses von Invasivität bzw. Rückenmarksnähe der Verletzung auf die Ausprägung einer reaktiven Gliose nach 5 Tagen in grauer und weißer Substanz des zerebralen Cortex. n = 3; Ki67⁺: Spearman r = 0.777 [0.35 – 0.94], p = 0.003 (**); Lineare Regression r² = 0.594; GFAP: Spearman r = 0.561 [-0.04 – 0.86], p = 0.058; Lineare Regression r² = 0.335

Zur Identifizierung einzelner Zellen wurden die Zellkerne zusätzlich mit DAPI gegengefärbt. Maßstabsbalken: 200 μ m (A)

ANA: Anästhesie; CC: Corpus callosum; dpi: Tage nach Intervention; HEMI: thorakale dorsale Hemisektion; MC: Motorkortex; NAIV: unverletzte, gesunde Tiere; SHAM: Kontrolloperation ohne penetrierende ZNS-Verletzung; SKIN: Hautschnitt

Somit konnten deutliche Wechselbeziehung zwischen dem Grad der Verletzungsinvasivität und den in der Folge beobachteten reaktiven Gliaveränderungen des zerebralen ZNS aufgezeigt werden. Diese stellten sich in Form einer kortikalen reaktiven Gliose auf der einen und einer globalen endogenen Rekrutierung proliferativer Kapazitäten parenchymaler ZNS-Zellen auf der anderen Seite dar.

4. Diskussion

Traumatische Verletzungen des Rückenmarks verursachen eine Kaskade molekularer und zellulärer Ereignisse auch abseits des primär verletzten Gewebes. Die Ergebnisse bisheriger Studien weisen zwar darauf hin, dass derartige Traumata allgemein Veränderungen im Gehirnparenchym auslösen können, allerdings konzentriert sich die aktuelle Forschung zu diesen multifaktoriellen Mechanismen dabei hauptsächlich auf pathologische Prozesse, die in primär verletztem Gewebe auftreten. Die heterogene Zellreaktion in verschiedenen Hirnregionen wurde bisher nur ansatzweise berücksichtigt. Auch detaillierte Erkenntnisse bezüglich reaktiver Gliose sowie initiierender Signalwege existieren zum jetzigen Zeitpunkt nicht.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass nach Rückenmarksverletzungen eine weitreichende Aktivierung von Gliazellen in allen untersuchten kortikalen Hirnregionen stattfindet. Die Effekte ließen sich unter Berücksichtigung aller untersuchten Kontextfaktoren direkt mit dem Vorliegen eines invasiven Rückenmarkstraumas aber überraschenderweise auch nicht ZNS-penetrierender Rückenverletzung korrelieren. Sie umfassten sowohl morphologische, strukturelle und transkriptionelle Prozesse bis hin zu einer vermehrten mitotischen Aktivität zuvor ruhender Zellen. Die Hochregulation von GFAP und Iba1 innerhalb des zerebralen Hirnparenchyms weist dabei auf einen aktiven Zustand von astro- und mikroglialen Zellpopulationen hin. Weiterhin steht die Expansion von proliferierenden Ki67⁺ Zellen innerhalb des Hirnparenchyms in Folge traumatischer Ereignisse für eine adaptive Rekrutierung endogener proliferativer Kapazitäten. Diese mitotische Aktivität von ausdifferenzierten Zellen ist nicht nur ein weiteres Anzeichen reaktiver Zellphänotypen von glialen Zellen, sondern weist auf die Heterogenität in der Reaktion beteiligter Zelltypen hin.

Es ist bekannt, dass Astrozyten in kontextspezifischer Art und Weise auf pathologische Veränderungen reagieren und dabei heterogene Phänotypen annehmen können (Zamanian *et al.*, 2012). Auch Mikroglia zeigen eine Vielfalt von Phänotypen mit spezifischer Aktivität und Expressionsprofil im Rahmen ihrer Immunreaktionen (Gordon, 2003). Vor diesem Hintergrund sind die beobachteten morphologischen Veränderungen

geprägt durch Hypertrophie der Zellsomata und Zellfortsätze ebenfalls ein typisches Merkmal gesteigerter Reaktivität der betreffenden Zellen. Die Gesamtheit dieser beobachteten Prozesse im Sinne eines veränderten Aktivitätszustandes der untersuchten Gliazellpopulationen sind allgemein bekannt als Astro- beziehungsweise Mikrogliose. Dieser Komplex gilt als grundlegendes Hauptmerkmal einer reaktiven Gliose (Burda and Sofroniew, 2014).

4.1 Reaktiven Gliose im zerebralen Kortex nach Rückenmarksverletzung

Unter reaktiver Gliose versteht man eine durch pathophysiologische Prozesse ausgelöste Reaktion glialer Zellen, die in Abhängigkeit vom pathologischen Kontext in unterschiedlichen Formen auftritt. Die Reaktion der Gliazellen ist an der Vermittlung einer immunologischen Antwort beteiligt und führt zeitgleich zur Beschränkung zytotoxischer Auswirkungen auf das umgebende Gewebe, wodurch sekundäre Schäden reduziert werden (Myer, 2006). Zudem tragen reaktive Gliazellen maßgeblich zur Rekonstruktion und der lokalen Adaptation des Gewebes an die pathologisch veränderten strukturellen sowie funktionellen Anforderungen bei (Sims and Yew, 2017). Zusammenfassend sind reaktive Gliazellen für die akute, aber auch langfristige Reaktion des ZNS auf Pathologien und einem diesbezüglich möglichst günstigen Verlauf unabdingbar.

Eine vermehrte proliferative Aktivität, wie sie auch in dieser Arbeit beobachtet wurde, ist dabei eine spezifische Reaktion vor allem auf Pathologien, die mit Verletzungen der Blut-Hirn- beziehungsweise der Blut-Rückenmarks-Schranke assoziiert sind (Mattugini *et al.*, 2018). Neben den untersuchten Astrozyten und Mikroglia beteiligen sich weitere Gliazellen an einer reaktiven Gliose. Allen voran sind hier NG2-Glia zu nennen. Diese reagieren auf Verletzungen mit Migration zum geschädigten Gewebeareal sowie gesteigerter Proliferation (Hughes *et al.*, 2013), wodurch auch untergegangene OPCs und Oligodendrozyten ersetzt werden können (Sun *et al.*, 2010). Dies legt nahe, dass die in dieser Arbeit beobachteten, GFAP⁻/Iba1⁻ mitotisch aktiven (Ki67⁺) Zellen zum überwiegenden Teil NG2-Glia darstellen könnten.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass sowohl durch invasive Verletzung des Rückenmarks wie auch durch traumatische Einflüsse in dessen unmittelbarer Nähe eine zentralnervöse Reaktion ausgelöst werden kann. Obwohl die genauen Mechanismen und Faktoren dieser Reaktion noch nicht verstanden oder gar benannt sind, kommen unter anderem auch eine Reihe systemischer Vorgänge in Frage. So können beispielsweise im Rahmen von Rückenmarksverletzungen ausgedehnte Hypotonien ausgelöst durch vegetative Regulationsstörungen auftreten. Angesichts der zentralen Rolle von Astrozyten bei der Regulation der ZNS-Homöostase ist es denkbar, dass eine zerebrale Minderperfusion mit konsekutiver Gewebshypoxie und Ischämie zum reaktiven Phänotyp astroglialer Populationen beitragen kann. Diesbezüglich ist bekannt, dass vorwiegend Traumata hoher Rückenmarkssegmente zu solchen Komplikationen führen, da potenziell größere Teile des verantwortlichen peripheren vegetativen Nervensystems von einer veränderten zentralnervösen Tonusregulation betroffen sind. Allerdings wurde im tierexperimentellen Modell dieser Arbeit ein Trauma auf Höhe des 8. Brustwirbels gewählt. Zudem ist bei Nagetieren der Einfluss auf den Blutdruck selbst bei einer komplikationsreicheren hohen Rückenmarksverletzung und inklusive der ebenfalls potenziell blutdruckrelevanten Anästhesieauswirkungen eher als moderat beschrieben worden (Nout, Beattie and Bresnahan, 2012). Dies macht eine zerebrale Hypoxie als zugrundeliegenden Auslöser unwahrscheinlich.

4.2 Konsequenzen zellulärer Gliereaktionen nach Rückenmarksverletzungen

Ein wesentlicher Faktor, um akute von längerfristigen Konsequenzen differenzieren und somit die Tragweite reaktiver Veränderungen von Gliazellen nach Rückenmarksverletzungen bewerten zu können, ist der in dieser Arbeit ebenfalls adressierte zeitliche Verlauf. Als Maßstab stehen aktuell lediglich grundlegende Mechanismen zur Verfügung, die im Rahmen der sekundären Wundheilung innerhalb des ZNS beobachtet werden konnten. Ob und wie weit diese auf topographisch vom primären Gewebeschaden entfernte zelluläre Effekte übertragen werden können, ist dabei nicht bekannt. Dennoch bietet diese Einteilung einen guten Einblick, in welchem Stadium sich das zelluläre Milieu der Verletzung auf Rückenmarksebene als

zugrundeliegende Pathologie befindet. Demnach kann der Verlauf nach invasiven ZNS-Verletzungen in drei fließend ineinander übergehende, jedoch unscharf begrenzte Phasen eingeteilt werden (Abb. 18) (Burda and Sofroniew, 2014):

- (1) akut: Zelltod und Immunantwort
- (2) subakut: Zellvermehrung und Gewebsrekonstruktion
- (3) chronisch: funktionelle Adaption und Reorganisation

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass reaktive Veränderungen astro- und mikroglialer Zellen bereits 5 Tage nach Rückenmarkstraumata im zerebralen Kortex deutlich ausgeprägt sind. Im Verlauf erreicht der Rückgang dieser Reaktion auch 14 Tage nach Rückenmarksverletzung nicht sicher wieder das Ausgangsniveau. Im Gegenteil sind zu diesem Zeitpunkt anhaltende morphologische Veränderungen im Sinne reaktiver Zellphänotypen zu beobachten. Daher sind auch länger anhaltende gliale Aktivierungszustände mit gegebenenfalls chronischen Effekten nicht auszuschließen.

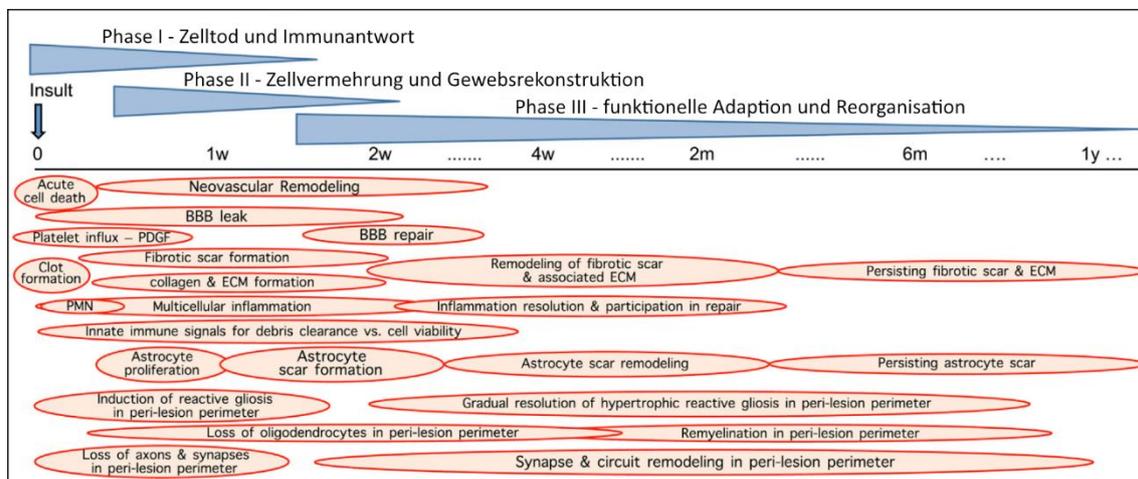


Abb. 18 Zelluläre Phasen und Verlauf der multizellulären Reaktion nach lokalem ZNS-Trauma

Quelle: In abgeänderter Form übernommen von Burda et al. „Reactive Gliosis and the Multicellular Response to CNS Damage and Disease“ (Burda and Sofroniew, 2014)

4.2.1 Rolle reaktiver Astrozyten im Kontext pathologischer Veränderungen

Durch zahlreiche Erkenntnisse in den letzten 20 Jahren ist mittlerweile sehr deutlich geworden, dass Astrozyten für viele grundlegende und auch übergeordnete Funktionen des ZNS unabdingbar sind (Allen and Lyons, 2018). Dies wird dadurch deutlich, dass sich Astrozyten innerhalb ihrer Domänen durch Zellkontakte und zahlreiche spezifische homöostatische sowie metabolische Wechselbeziehungen an einer Vielzahl zellulärer Prozesse beteiligen (Verkhratsky and Nedergaard, 2018). Durch diese Interaktionen mit der unmittelbaren Mikroumgebung, der Extrazellulärmatrix und anderen Zellen entstehen funktionale Einheiten, die letztendlich insgesamt für die physiologische Funktionalität des ZNS von entscheidender Bedeutung sind. Beispielsweise sind Astrozyten in neurovaskulären Einheiten mitverantwortlich für die Integrität der Blut-Hirn-Schranke (Abbott, Rönnbäck and Hansson, 2006) und auch Neuronen und insbesondere deren Synapsen sind auf die physiologischen Funktionen von Astrozyten in den umgebenen neuroglialen Einheiten angewiesen (Halassa and Haydon, 2010). GFAP ist eines der wichtigsten gliaspezifischen Intermediärfilamente, das im Zytoplasma von Astrozyten vorkommt und dessen Isoformen mit vielen astrozytenspezifischen Funktionen interferieren (Abb. 19) (Middeldorp and Hol, 2011). Die Hochregulation von GFAP ist neben der Zellhyperthrophie eines der Hauptmerkmale reaktiver Astrozyten und kann als Marker für Mikroläsionen der Blut-Hirn-Schranke (BHS) sowohl im Liquor als auch im Serum herangezogen werden.

Als Bestandteil des Zytoskeletts ist GFAP mitverantwortlich für die Morphologie der jeweiligen Zelle und dadurch mit den beobachteten Veränderungen im aktivierten und reaktiven Zustand der Astrozyten assoziiert. Es konnte gezeigt werden, dass Veränderungen von Intermediärfilamenten reaktiver Astrozyten generell zu einem Flexibilitätsverlust (Lu *et al.*, 2011) sowie eingeschränkter Spontanmotilität (Lepikhin *et al.*, 2001) führen. Betroffen sind in diesem Fall die bedarfsorientierte Annäherung von Zellfortsätzen an funktionell wichtige Strukturen innerhalb der eigenen Domäne. Hierzu zählen beispielsweise die von Astrozyten aktiv umschlossenen Synapsen (Bernardinelli, Muller and Nikonenko, 2014), was physiologisch für eine möglichst effiziente Aufrechterhaltung der benötigten Homöostase von Ionen und neuroaktiven Substanzen

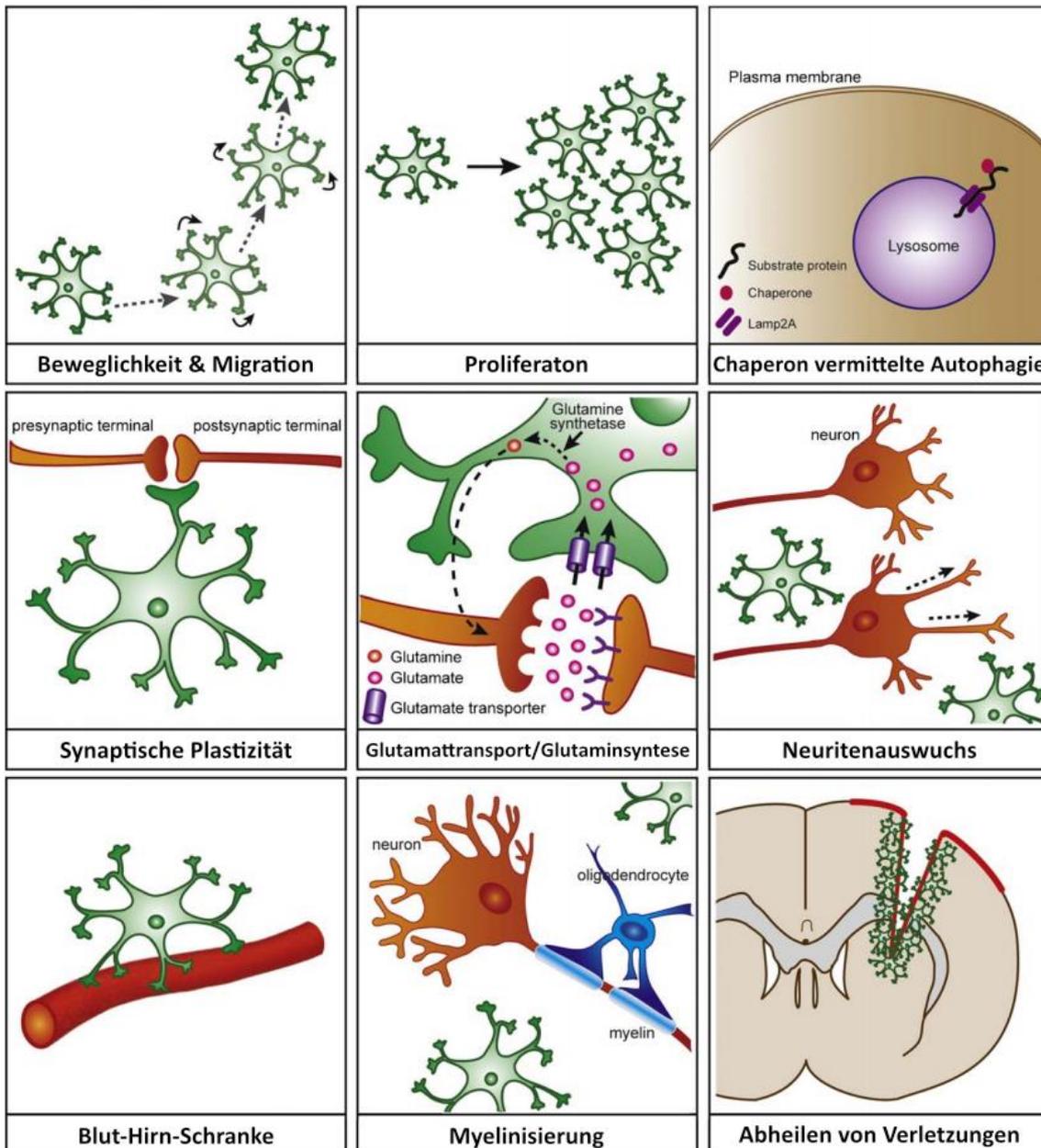


Abb. 19 Durch GFAP beeinflusste physiologische Funktionen von Astrozyten

Schematische Übersicht astrozytärer Funktionen, die nachgewiesener Weise durch GFAP beeinflusst werden können.

Quelle: In abgeänderter Form übernommen von Middeldorp et al. „GFAP in health and disease“ (Middeldorp and Hol, 2011)

essenziell ist. Auch andere GFAP vermittelte interzelluläre Funktionen wie die Integrität der BHS oder Vorgänge zur Aufrechterhaltung der Myelinisierung können darüber hinaus von negativen Folgen betroffen sein (Liedtke *et al.*, 1996; Giménez Y Ribotta *et al.*, 2000). Weiterhin ist bekannt, dass in reaktiven Astrozyten eine vermehrte GFAP Expression invers mit der Aufnahme von Glutamat korreliert und mit einem verminderten Glutamin-Umsatz einhergeht (Middeldorp and Hol, 2011). Daraus resultiert eine potenziell

eingeschränkte Kompensationskapazität einer im Falle vermehrt anfallender Transmittermetabolite entstehenden Neurotoxizität. Aber auch eine suffiziente Bereitstellung des wiederum von Neuronen für die Synthese exzitatorischer Neurotransmitter benötigte Glutamin könnte gefährdet sein.

Intermediärfilamente sind außerdem die Grundlage für den intrazellulären Vesikeltransport. Es konnte gezeigt werden, dass GFAP an Einschränkungen einer bedarfsgerechten Funktion von Lysosomen beteiligt sein kann (Potokar *et al.*, 2010). Endosomal-lysosomale Dysfunktionen gelten als eine Hauptursache einer Reihe chronischer neurodegenerativer Erkrankungen, die unter anderem mit Proteinaggregaten einhergehen (Wong, 2020). Prominente Vertreter sind hier beispielsweise die Tauopathien, zu denen auch die Alzheimer-Erkrankung zählt. In der Konsequenz ist zu vermuten, dass auch die Sekretion durch Exosomen auf diese Weise von GFAP beeinflusst werden und es somit zu Veränderungen der angesprochenen zahlreichen extrazellulär vermittelten Wechselbeziehungen kommen könnte.

Mit Teilen ihrer extrazellulären Produkte sind Gliazellen auch unter physiologischen Umständen an der Bildung der Extrazellulärmatrix beteiligt. Reaktive Astrozyten zeigen in diesem Zusammenhang veränderte Expressions- und Sekretionsprofile. Diese beinhalten einen vermehrten Umbau der extrazellulären Matrix durch spezifische Proteasen (ADAMTS) sowie eine vermehrte Sekretion von beispielsweise CSPGs und weiteren Molekülen mit potenziell negativen Folgen für übergeordnete Funktionen des ZNS (Song and Dityatev, 2018). Dazu gehören Einschränkungen der Zellproliferation und -migration, der Synaptogenese und deren Plastizität, des axonalen Wachstums sowie regenerativer Prozesse allgemein (Dityatev and Schachner, 2003). Strukturelle Veränderungen in Bezug auf die Stabilität des Zellverbandes sind ebenfalls denkbar. Auch wenn abweichende Expressionslevel extrazellulärer Matrixkomponenten dementsprechend auch bei den in dieser Arbeit beobachteten reaktiven Veränderungen wahrscheinlich sind, muss der konkrete Umfang in zukünftigen Fragestellungen adressiert werden.

Darüber hinaus spielt GFAP wohlmöglich auch eine wichtige Rolle in der intrazellulären Kommunikation, insbesondere bei der Aktivierung und Rekrutierung von Mikroglia sowie peripheren Monozyten (Nakazawa *et al.*, 2007). Dies stellt einen Weg dar, wie der astrogliale Aktivierungszustand im Rahmen einer reaktiven Gliose an weitere beteiligte Zelllinien vermittelt und das Entstehen einer neuroinflammatorischen Immunantwort gefördert werden könnte.

4.2.2 Konsequenzen reaktiver Mikrogliose und Neuroinflammation

Als Bestandteil des zellulären Immunsystems nehmen Mikroglia bei pathologischen Prozessen innerhalb des ZNS eine zentrale Rolle ein. Zusammen mit weiteren Gliazellen und peripheren Immunzellen sind sie ein wesentlicher Bestandteil der als Neuroinflammation zusammengefassten immunologischen Antwort auf pathologische Prozesse innerhalb des ZNS (Abb. 20) (Yang and Zhou, 2019). Ein Hauptmerkmal von in diesem Zusammenhang aktivierten Mikroglia ist die auch in dieser Arbeit beobachtete vermehrte Expression des Markers Iba1. Iba1 ist an der Organisation von beweglichen Ausläufern der Zellmembran, sogenannten Membran-Rüschen, beteiligt (Imai and Kohsaka, 2002) und hat somit direkten Einfluss auf die Zellmorphologie. Reaktive Formen sind mit der Expression proinflammatorischer Zytokine, reaktiver Sauerstoffradikale sowie Stickoxiden assoziiert (Lynch, 2009). Diese haben eine effektive Bekämpfung von Pathogenen in der Akutphase zum Zweck, führen auf der anderen Seite aber auch unselektiv zu oxidativem und metabolischem Stress für vitale Zellen in direkter Nachbarschaft der Entzündungsreaktion. Unter physiologischen Bedingungen ist eine Neuroinflammation nach Abklingen pathologischer Prozesse selbstlimitierend.

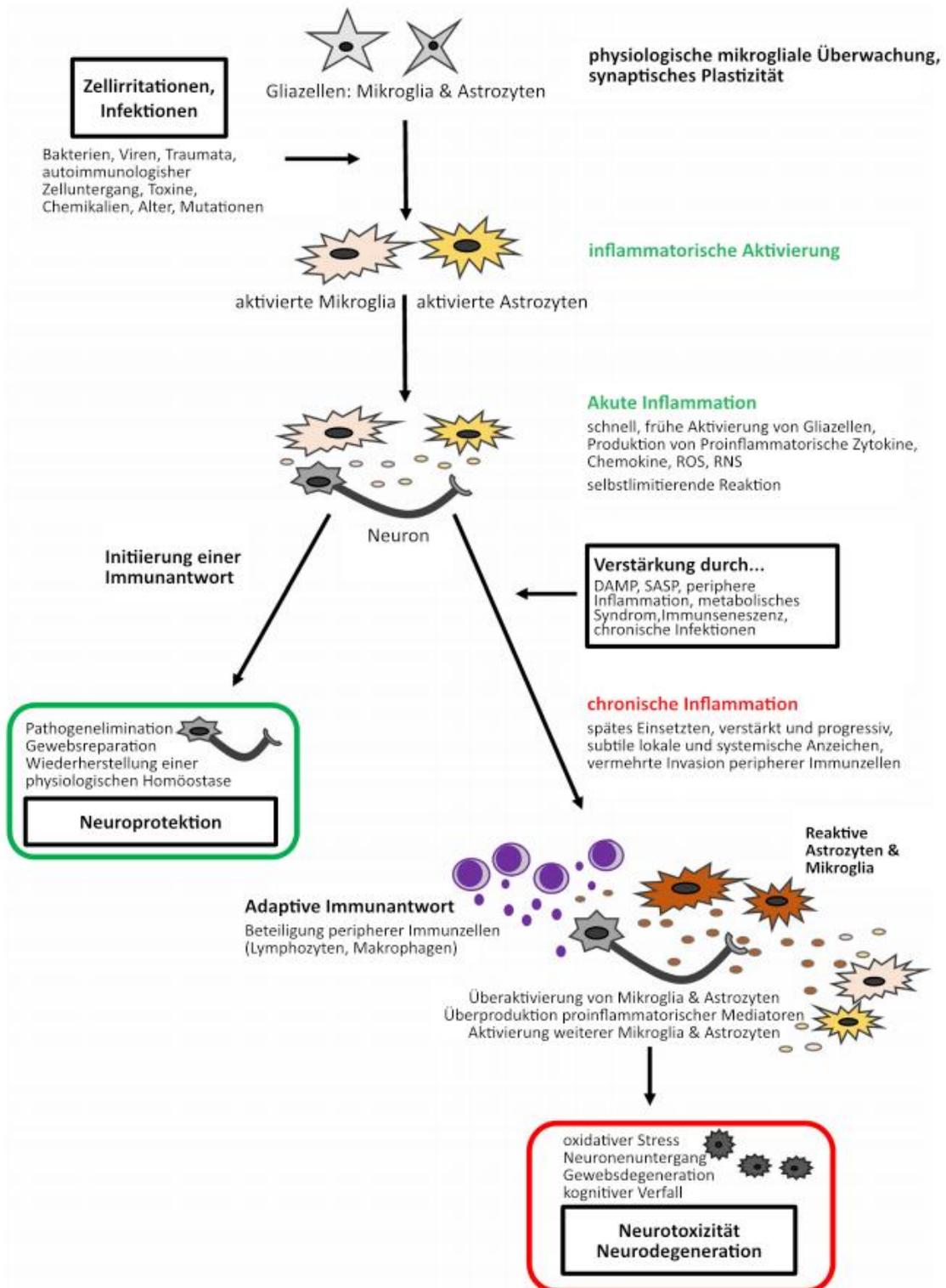


Abb. 20 Mikroglia im Verlauf einer Neuroinflammation

Schematische Übersicht des Beitrags von Mikroglia im Verlauf einer Neuroinflammation.

DAMP: Damage-associated molecular pattern; RNS: reactive nitrogen species; ROS: reactive oxygen species; SASP: Senescence-associated secretory phenotype

Quelle: *In abgeänderter Form übernommen von Sochocka et al. „Inflammatory Response in the CNS: Friend or Foe?“ (Sochocka, Diniz and Leszek, 2016)*

Die anhaltende Aktivierung von Mikroglia hingegen kann daher als Kompensation für das Unvermögen anderer Mechanismen zur effektiven Beseitigung des zugrundeliegenden pathologischen Prozesses gewertet werden. Selbst nach erfolgreicher Elimination der ursächlichen Pathologie kehren Mikroglia allerdings nicht zwangsläufig wieder zu ihrem ursprünglichen Aktivitätsprofil zurück, sondern können längerfristig in einem Bereitschaftszustand verharren (Witcher, Eiferman and Godbout, 2015), der im Falle weiterer Reize zu einer überschießenden Immunantwort durch Hyperreagibilität führt (Norden, Muccigrosso and Godbout, 2015). Welche Voraussetzungen im Einzelnen zu einer solchen Prägung von Mikroglia führen ist bisher nicht abschließend geklärt. In einer der wenigen tierexperimentellen histologischen Untersuchungen zerebraler Veränderungen nach Rückenmarkstraumata wurde von einer chronischen Neuroinflammation mit reaktiven Mikroglia innerhalb des Hippocampus berichtet, die mit kognitiven Einschränkungen einherging (Wu *et al.*, 2014). Dies korreliert mit Erkenntnissen von Patienten mit Rückenmarksverletzungen, bei denen ebenfalls längerfristige Beeinträchtigungen in Bezug auf Gedächtnisleistung, Lernen, Konzentration und Aufmerksamkeit nachgewiesen werden konnten (Davidoff, Roth and Richards, 1992; Murray *et al.*, 2007; Craig *et al.*, 2015).

Eine chronische Neuroinflammation wurde lange Zeit als sekundäres Ereignis neurologischer Erkrankungen betrachtet, konnte mittlerweile aber auch vorbestehend mit konkreten klinischen Krankheitsbildern in Verbindung gebracht werden. So korreliert das Persistieren reaktiver Mikroglia im Mausmodell mit einer erhöhten Inzidenz von depressiven Verhaltensmustern (Fenn *et al.*, 2014). Auch wurden in vereinzelt Fällen im Verlauf Proteinaggregate im Sinne von Tauopathien (Kitazawa, Yamasaki and LaFerla, 2004) assoziiert mit Alzheimer (Krstic *et al.*, 2012) oder Parkinson (Tansey, McCoy and Frank-Cannon, 2007) beobachtet. Nicht zuletzt gibt es organübergreifend einen Konsens darüber, dass eine chronische Inflammation generell das Auftreten einer Dysplasie innerhalb des betroffenen Gewebes begünstigt. Da diese in schwereren Ausprägungsformen als Präkanzerose gelten, ist in der Folge das Risiko für die Entstehung von Neoplasien sowie deren Progression erhöht (Singh *et al.*, 2019).

Die möglichen pathologischen Konsequenzen zeigen eindrücklich, dass reaktive Gliazellen neben einer Vielzahl zellulärer Wechselbeziehungen auch einen Einfluss auf die übergeordneten Funktionen des ZNS haben können. Es ist anzunehmen, dass zumindest Teile dieser neurologisch funktionellen Auswirkungen durch eine direkte Einflussnahme der Gliazellen auf die neuronale Plastizität vermittelt werden.

4.2.3 Neuronale Plastizität im Rahmen einer reaktiven Gliose

Unter neuronaler Plastizität versteht man die Eigenschaft von Neuronen sich unter veränderten Anforderungen funktionell anzupassen oder sogar auch gänzlich andere Funktionen innerhalb des neuronalen Netzwerks übernehmen zu können. Diese Anpassungen können sowohl einzelne Neurone als auch gesamte Hirnareale betreffen und finden überwiegend auf Ebene der einzelnen Synapsen statt. Es geht dabei nicht nur um die Reaktion auf ein (wie hier diskutiertes) pathologisches Umfeld, sondern vor allem auch um physiologische Prozesse, die beispielsweise für die Entwicklung des Gehirns sowie Gedächtnisleistung und Lernen existenziell sind. Dabei sind die betreffenden Neuronen nicht allein für die Initiierung der Anpassungen verantwortlich, sondern werden dahingehend von ihrer direkten Umgebung beeinflusst. Im Rahmen der bereits angesprochenen neuroglialen Einheiten geht ein maßgeblicher Beitrag zur strukturellen und funktionellen Plastizität von Synapsen von Gliazellen aus (Chung *et al.*, 2015). Diese bestehen auf der einen Seite aus den bereits dargestellten engen metabolischen und homöostatischen Wechselbeziehungen, die sich auf die Funktion jeder einzelnen Synapse auswirken (Abb. 21C). Auf der anderen Seite sind sowohl Astrozyten als auch Mikroglia an der Entstehung und dem Abbau neuronaler Synapsen direkt beteiligt (Abb. 21A+B).

Im Rahmen einer Neuroinflammation kommen unter anderem Zytokine und Komplementfaktoren in Betracht, um einen Einfluss auf die neuronale Plastizität zu vermitteln (Chung *et al.*, 2015). Die Auswirkungen sind dabei variabel und von den lokal überwiegenden Mediatoren abhängig. Sie können die neuronale Transmission sowohl exzitatorisch als auch inhibitorisch modulieren und somit den Beitrag aber auch die

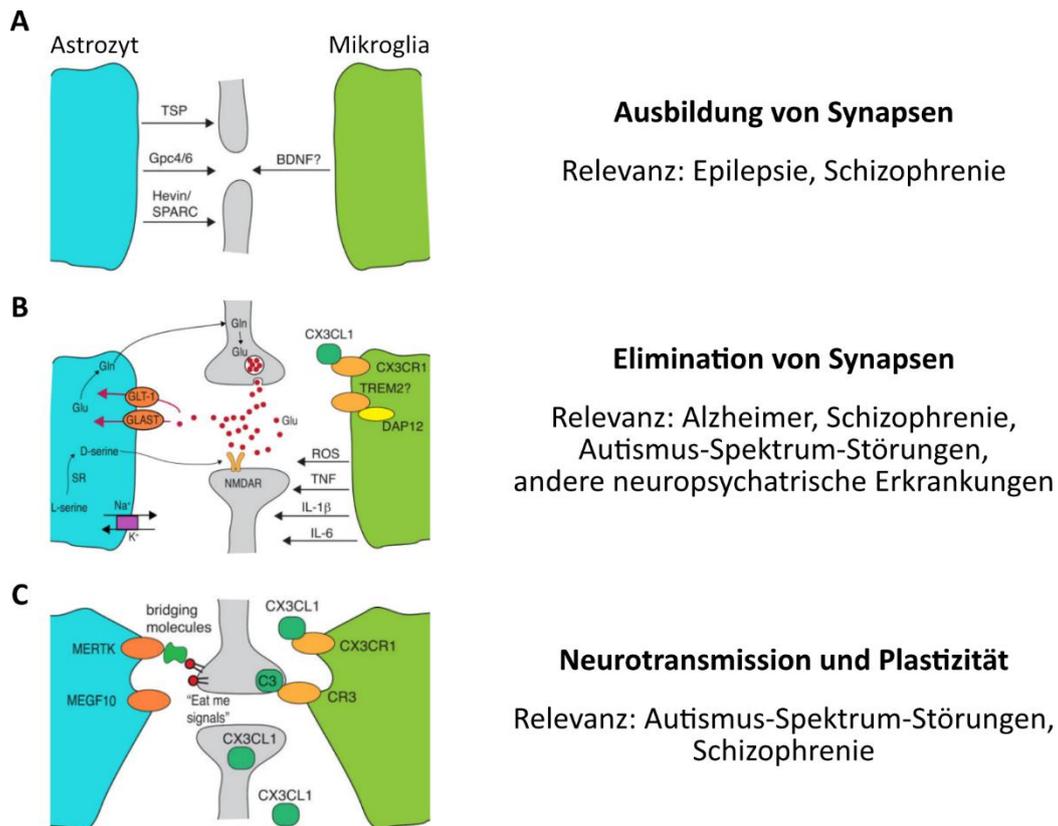


Abb. 21 Beitrag von Astrozyten und Mikroglia zur neuronalen Plastizität

Übersicht über konkrete Wege wie Astrozyten (blau) und Mikroglia (grün) über die Expression und Sekretion verschiedener Mediatoren direkt sowohl die Ausbildung (A) und Elimination (B) als auch die generelle Funktion und Plastizität von Synapsen (C) beeinflussen.

BDNF: Brain-derived neurotrophic factor; Gln: Glutamin; Glu: Glukose; Gpc: Glypican; IL: Interleukin; K: Kalium; Na: Natrium; ROS: reaktive Sauerstoffspezies; SR: SR splicing Protein; TNF: Tumornekrosefaktor; TSP: Thrombospondin;

Quelle: In abgeänderter Form übernommen von Chung et al. „Do glia drive synaptic and cognitive impairment in disease?“ (Chung et al., 2015)

übergeordnete Funktion des Neurons in seinem unmittelbaren Netzwerk verändern. Darüber hinaus können Synapsen komplementvermittelt auch gänzlich durch Mikroglia phagozytiert und somit eliminiert werden (Stevens et al., 2007).

Unabhängig von einer Neuroinflammation kann eine funktionelle Adaptation der beobachteten Hirnareale allerdings auch durch veränderte Muster neuronaler Aktionspotenziale aufgrund der weitreichenden Unterbrechung spinokortikaler Afferenzen im Rahmen invasiver Rückenmarksverletzungen ausgelöst werden (Nardone et al., 2013). In diesem Ausmaß wäre aufgrund ihres Beitrags zu synaptischen Anpassungsvorgängen ebenfalls mit konsekutiv reaktiven Gliazellen in betroffenen Hirnregionen zu rechnen. Da ähnliche reaktive Veränderungen auch nach rückenmarksnahen nicht ZNS-invasiven Traumata beobachtet werden konnten, haben

folglich auch diese Verletzungen gegebenenfalls das Potenzial zu signifikanten Auswirkungen auf zerebrale Funktionsmuster. Wahrscheinlich ist allerdings auch, dass über die potenziellen funktionellen Veränderungen hinaus noch weitere unidentifizierte Auslöser der traumafernen reaktiven Gliose zumindest eine zusätzliche Rolle spielen.

Da die interzellulären Wechselbeziehungen innerhalb des Hirnparenchyms wie diskutiert alles andere als einen passiven Status quo darstellen, sondern auch im physiologischen Zustand kontinuierlich ablaufenden dynamischen Veränderungen ausgesetzt sind, besteht hier gerade auf lange Sicht das Potenzial für weitreichende Abweichungen und Einschränkungen dieser Prozesse. Folglich ist vor dem Hintergrund eines pathologisch chronifizierenden Einflusses reaktiver Gliazellen auf neuroplastische Prozesse über die physiologische Akutanpassung hinaus von einem vermehrten Auftreten synaptischer Dysfunktionen auszugehen. Dysfunktionen sowie die Dichtenabnahme von Synapsen allgemein sind klassische pathologische Kennzeichen (Henstridge, Pickett and Spire-Jones, 2016) und können unter anderem auch als Erklärungs-Modell der mit reaktiven Mikroglia assoziierten kognitiven Folgeerscheinungen herangezogen werden. Weiterhin sind diese Kennzeichen ebenfalls bekannt im Zusammenhang mit einigen neurologischen Erkrankungen wie Epilepsie, Schizophrenie oder Autismus-Spektrum-Störungen (Chung *et al.*, 2015).

Um die Wahrscheinlichkeit der diskutierten Effekte reaktiver Gliazellen nach Rückenmarksverletzungen weiter konkretisieren und in Zukunft eventuell Kausalität herstellen zu können, muss grundlegend die Frage nach dem Signalweg und beteiligten Mediatoren beantwortet werden, die als Auslöser für die reaktiven Gliaveränderungen verantwortlich sind.

4.3 Mögliche neurale und extraneurale Signalkaskaden

Aufgrund der aus histologischer Sicht großen Distanz der reaktiven Gliaveränderungen im Großhirn zum eigentlichen Trauma auf Rückenmarksebene, ist intuitiv vor allem eine systemische Signaltransduktion naheliegend. Diese kann sowohl außerhalb des ZNS über den Blutkreislauf als auch innerhalb des ZNS durch das Liquorsystem vermittelt werden. Wie bereits diskutiert stellen aber auch die Folgen veränderter neurologischer Funktionsmuster als Konsequenz der Verletzungen eine Möglichkeit für eine Signalvermittlung dar.

4.3.1 Hämatogenen Signalvermittlung

Die hämatogene Vermittlung ist der häufigste Weg einer systemischen Signaltransduktion in komplexeren Lebewesen. Der gesamte Stoffwechsel inklusive sämtlicher Hormonachsen sowie das Immunsystem reagieren zum überwiegenden Teil auf hämatogen vermittelte Signale. Das ZNS nimmt dabei mit einer strengen Abschirmung gegenüber der Peripherie mittels der BHS eine Sonderrolle ein. Diese Barriere führt dazu, dass insbesondere größere und geladene Moleküle nicht frei in das Hirnparenchym diffundieren können (Abbott, Rönnbäck and Hansson, 2006), sondern bei Bedarf selektiv durch aktive Transportmechanismen eingeschleust werden müssen. Der Übertritt von physiologisch ausschließlich extrazerebral vorkommenden Molekülen hat somit das Potenzial für eine entsprechende Signalwirkung innerhalb des ZNS (Burda and Sofroniew, 2014). Sirko et al. konnten zeigen, dass das Sonic Hedgehog Protein, welches sowohl im Liquor als auch im Blutplasma vorkommt, nach invasiven ZNS-Verletzungen für eine Aktivierung von Astrozyten sowie deren Dedifferenzierung zu potenziell multipotenten Vorläuferzellen mit verantwortlich ist (Sirko et al., 2013). Abseits von Kontinuitätsunterbrechungen durch direkte Traumata konnten für geringfügige Permeabilitätsveränderungen bisher hauptsächlich immunologische Prozesse verantwortlich gemacht werden. Im Blutkreislauf zirkulierende Zytokine wie IL-6 und TNF- α können dabei, speziell auch im Rahmen einer systemischen Inflammation nach großen Operationen (Kragstjerg, Holmberg and Vikerfors, 1995), mit für eine

erhöhte BHS-Permeabilität verantwortlich sein (Saija *et al.*, 1995; de Vries *et al.*, 1996). Folglich bleibt in dieser Arbeit ungeklärt, ob die beobachteten Effekte durch jegliche ausreichend invasive Operation hervorgerufen werden können und die Nähe des Eingriffs zur Wirbelsäule in dem verwendeten Modell dementsprechend als sekundär zu betrachten ist.

Obwohl der in dieser Arbeit verwendete Cadaverin-Tracer mit etwa 950 Dalton sehr klein ist und daher auch bei geringer Permeabilitätserhöhungen frühzeitig mit über die BHS diffundieren kann, konnte mit der angewendeten histologischen Auswertung kein Hinweis für einen vermehrten Übertritt ins ZNS-Parenchym 5 Tage nach invasiver Rückenmarksverletzung festgestellt werden. In diesem Zusammenhang muss die Wahl des Analysezeitpunktes und die Detektionsschwelle der verwendeten Methode diskutiert werden. Während die Integrität der Blut-Hirn-Schranke nach einem invasiven Trauma erst nach etwa 2-3 Wochen vollständig wiederhergestellt ist (Burda and Sofroniew, 2014), sind immunologisch verursachte Permeabilitätserhöhungen einer sonst intakten Blut-Hirn-Schranke nach Abnahme der Zytokinkonzentration innerhalb weniger Stunden reversibel (Saija *et al.*, 1995; de Vries *et al.*, 1996). Auch ein hierdurch verursachter nur teilweiser und vorübergehender Funktionsverlust der BHS würde dennoch Möglichkeiten für eine hämatogene Signaltransduktion als Ausgang der im Verlauf beobachteten reaktiven Veränderungen eröffnen. Inwieweit eine systemische Immunantwort der Peripherie auf das zugefügte Trauma gegebenenfalls Einfluss auf die in dieser Arbeit beobachteten reaktiven Veränderungen innerhalb des ZNS haben kann, muss im Verlauf weiter untersucht werden. Die Genauigkeit der verwendete Analysemethode ist stark davon abhängig, dass im Aufbereitungsprozess möglichst wenig des fluoreszierenden Tracers verloren geht. Daher muss die Absenz einer Permeabilitätsveränderung durch weitere Experimente in größeren Kohorten bestätigt werden.

4.3.2 Signalvermittlung über das Liquorsystem

Ein weiterer potenzieller Weg der Signalvermittlung innerhalb des ZNS über die betreffende Distanz ist das Liquorsystem. Auch wenn die physiologische Flussrichtung tendenziell für einen direkten venösen Abfluss auf Rückenmarksebene spricht, kann nicht ausgeschlossen werden, dass bei ausreichender Konzentration Diffusionsvorgänge zu einer Vermittlung von Signalmolekülen nach kranial führen. Dies könnte weiterhin durch Liquorzirkulationsstörungen in Folge des Rückenmarkstrauma unterstützt werden. Im Gegensatz zum Blutkreislauf, gibt es in diesem Fall keine zu überwindende Barriere zwischen Liquor und Hirnparenchym (Tumani, Huss and Bachhuber, 2018). Da diese Kompartimente unbehindert miteinander kommunizieren können, wäre allerdings in der Konsequenz ein Gradient in der Ausprägung ausgelöster Effekte von liquornahen nach liquorfernen Parenchymabschnitten zu erwarten. Dieser konnte stellvertretend im Bereich der von Liquor umgebenen Großhirnoberfläche durch die Gegenüberstellung der oberflächlich und tiefer gelegenen Kortexschichten nicht festgestellt werden. Die abschließende Veröffentlichung von Proteomanalysen der Liquorproben durch Sirko et al. im Rahmen dieses Forschungsprojektes stehen zum Zeitpunkt des Verfassens dieser Arbeit noch aus.

4.3.3 Anpassung an neuronale Dysfunktion als Auslöser glialer Reaktionen

Aufgrund der vorliegenden Daten scheint zu diesem Zeitpunkt eine reaktive Anpassung auf die veränderte funktionelle Aktivität als Grundlage der Beobachtungen am wahrscheinlichsten. Bereits bekannt ist, dass es nach Rückenmarksverletzungen zu weitreichenden funktionellen Veränderungen in betroffenen Kortexarealen kommt, die mit Hilfe funktioneller Bildgebung sowie dem EEG objektiviert werden können (Freund *et al.*, 2011). Zusätzlich wurde von messbaren Volumenreduktionen von sowohl weißer als auch grauer Substanz innerhalb ZNS berichtet (Wrigley *et al.*, 2009; Freund *et al.*, 2011). Es ist davon auszugehen, dass dieser grobe Umbau des Hirnparenchyms mit Verlust von Neuronen sowie Elimination und Neubildung von Synapsen nach den bisher diskutierten Beiträgen von Gliazellen entsprechende reaktive Effekte hervorrufen könnte.

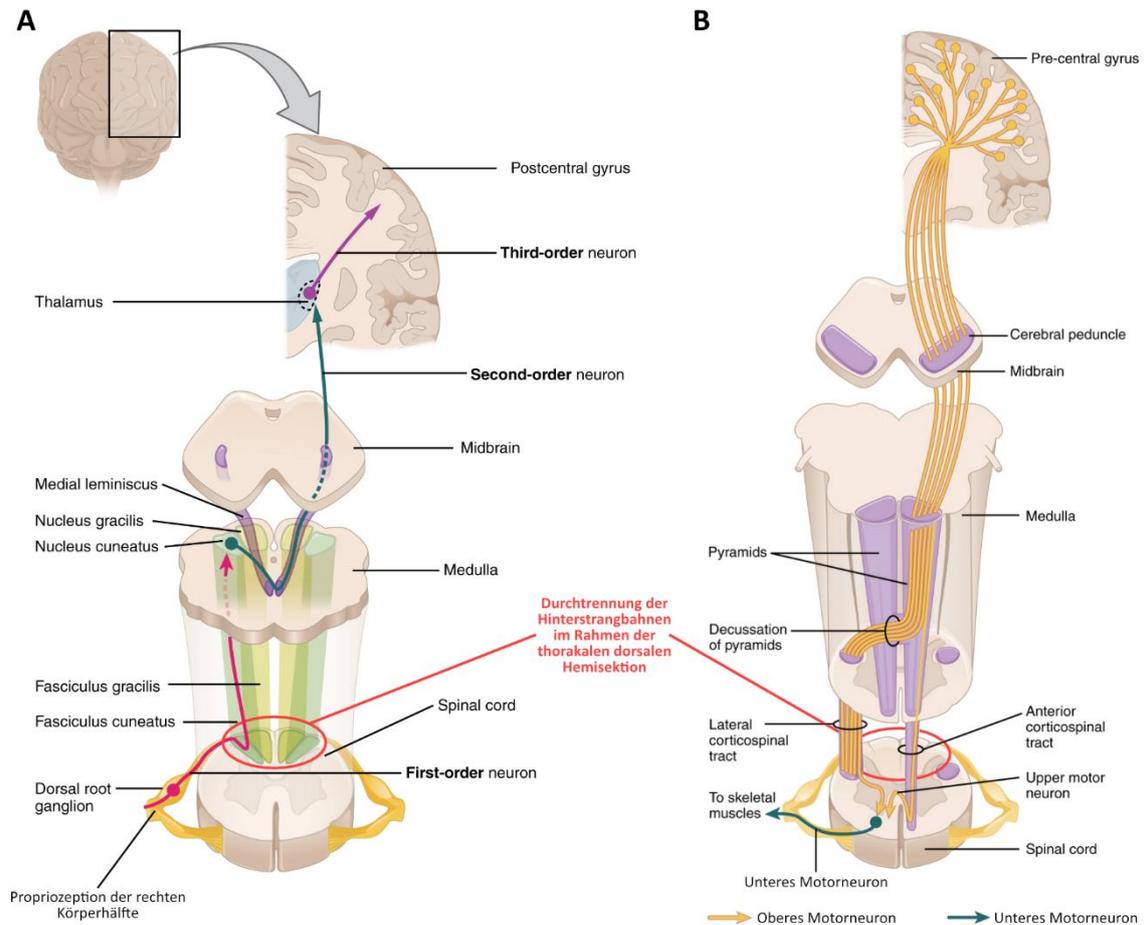


Abb. 22 Systematische Darstellung von Verläufen relevanter Nervenbahnen beim Menschen

Die Abbildung bezieht sich auf anatomische Verhältnisse beim Menschen, ist im Fall der in dieser Arbeit verwendeten Nager aber identisch. Dargestellt wird der Verlauf sensorischer Afferenzen in den Hinterstrangbahnen (Fasciculus cuneatus und gracilis), über mehrere Integrationsgebiete bis hin zum sensorischen Kortex (A) sowie der Verlauf motorischer Efferenzen ausgehend vom motorischen Kortex bis auf Rückenmarksebene (B).

Quelle: In abgeänderter Form übernommen von philschatz.com; Lizenz CC BY 4.0
https://philschatz.com/anatomy-book/resources/1417_Ascending_Pathways_of_Spinal_Cord.jpg
https://philschatz.com/anatomy-book/resources/1426_Corticospinal_Pathway.jpg

Im Rahmen der experimentellen Intervention in Form einer dorsalen Hemisektion auf Höhe des 8. Brustwirbelkörpers wurden große Anteile der dort verlaufenden Hinterstrangbahnen beidseitig gezielt durchtrennt. Physiologisch projizieren die betroffenen 1. afferenten Neuronen auf die in der Medulla oblongata gelegenen Nuclei gracilis beziehungsweise cuneatus (Abb. 22A). Hier erfolgt eine Integration in unterschiedliche Systeme auf Hirnstammebene sowie eine Weiterleitung über den Lemniscus medialis in Richtung des ebenfalls untersuchten Nucleus ventralis posterior des Thalamus. Das Ausbleiben der so nach zerebral vermittelten Signale führt in der Folge zu deutlich veränderten neuronalen Funktionsmustern innerhalb der

Projektionsgebiete. So kommt es zu einem Ausbleiben exzitatorischer Eingänge ausgehend vom Thalamus im somatosensorischen Kortexareal, die ursprünglich zur Wahrnehmung von Informationen der epikritischen Sensibilität geführt haben. Da die prozessierten Signale des somatosensorischen Kortex über interkortikale Kommissuren wiederum in diversen anderen Arealen integriert werden, ist denkbar, dass potenziell viele unterschiedliche zerebrale Hirnregionen durch diese funktionellen Veränderungen betroffen sein können. Unter anderem werden diese Informationen physiologischerweise sowohl exzitatorisch als auch inhibitorisch in die Planung von Bewegungsabläufen innerhalb des motorischen Kortexareals mit einbezogen (Sanes, Suner and Donoghue, 1990; Bolognini, Russo and Edwards, 2016). Diese intrakortikalen Eingänge befinden sich dabei vor allem in den oberen Kortexschichten (I & II) des Motorkortex, in denen bei dieser Arbeit keine besonderen Auffälligkeiten bezüglich der beobachteten Veränderungen vorzufinden waren. Im Rahmen der neuronalen Funktion des Motorkortex ist darüber hinaus nicht auszuschließen, dass diesem Kortexareal entstammende Motorneurone durch die Intervention auf Rückenmarksebene ebenfalls affektiert wurden, da diese zum großen Teil innerhalb des Tractus corticospinalis lateralis verlaufen, der den Hinterstrangbahnen direkt anliegt (Abb. 22B). Dies hätte direkte Auswirkungen auf das motorische Kortexareal, da die Somata der betroffenen Neurone überwiegend in dessen tieferer Kortexschicht (V) liegen und die umgebenen Gliazellen daher unmittelbar auf gegebenenfalls pathologisch veränderte Expressionsmuster der traumatisierten Zellen reagieren könnten. Allerdings waren auch in dieser Kortexschicht keine herausragenden Unterschiede im Vergleich zu anderen Schichten des motorischen Kortexareals feststellbar. Die direkte Gegenüberstellung des somatosensorischen und motorischem Kortexareals hingegen zeigte eine deutlich vermehrte Aktivierung proliferativer Kapazitäten im Bereich des somatosensorischen Kortex. Dort lässt sich der relative Anstieg in der Anzahl zellzyklusaktiver Zellen mit dem Ausmaß der Veränderungen innerhalb des funktionell vorangeschalteten Thalamuskerngebietes vergleichen. Somit könnte zumindest ein überdurchschnittlicher Anstieg proliferativer Zellen mit den unmittelbaren Auswirkungen auf neuronale Funktionsmuster in betroffenen sensorischen Hirnarealen in Verbindung gebracht werden. Festzuhalten

bleibt allerdings nach wie vor, dass konträr dazu die Ausprägung reaktiver Gliazellen über den gesamten Kortex hinweg sehr ähnlich ausfiel und im Thalamusgebiet des Nucleus ventralis posterior hingegen nicht nachweisbar war.

Mit den grundlegenden histologischen Auswertungen dieser Arbeit wäre es in Anbetracht der Komplexität und Weitläufigkeit der potenziellen Prozesse sehr erstaunlich gewesen aus dem Vergleich einzelner Kompartimente mehr als Tendenzen in der Ausprägung der beobachteten Veränderungen ableiten zu können. Über den Weg der Signalvermittlung können daher mit den vorliegenden Daten zum jetzigen Zeitpunkt nur hypothetische Überlegungen angestellt werden. Da die ausgelösten Effekte allerdings quantifizierbar vorhanden sind, können auf Grundlage bisheriger Erkenntnisse zumindest mögliche zelluläre Signaltransduktionskaskaden benannt werden, die potenziell durch die vermittelten Signale beeinflusst werden.

4.3.4 Potenzielle Beteiligung zellulärer Signalwege

Einer der bekanntesten Mechanismen, an dessen Ende die Aktivierung der Transkription astroglialer Gene steht, ist der JAK-STAT-Signalweg. Dieser vermittelt grundlegend Informationen extrazellulärer Signalpeptide wie Wachstumshormonen und Zytokinen an intrazelluläre Transkriptionsmodulatoren der STAT-Familie. Insbesondere STAT3 scheint in Gliazellen dabei eine Schlüsselrolle einzunehmen, da speziell diese Signalkaskade als ein Hauptschalter für die Gliogenese und die Differenzierung von Gliazellen gilt (Bonni *et al.*, 1997). Für STAT3 konnte aber auch in adulten Gliazellen eine spezifische regulatorische Rolle im Rahmen der lokalen reaktiven Gliose nach Rückenmarksverletzungen nachgewiesen werden (Okada *et al.*, 2006; Herrmann *et al.*, 2008; Wanner *et al.*, 2013). Liganden für verschiedene Kombinationen aus mehreren Rezeptor-Subtypen sind unter anderem LIF, CNTF sowie IL-6. Aber auch exzitatorische Neurotransmitter und freie Radikale scheinen den STAT-Signalweg aktivieren zu können (Dziennis and Alkayed, 2008).

Durch eine ligandenabhängige Dimerisierung unterschiedlicher Rezeptor-Subtypen wie GP130 und LIF-Rezeptor bewirkt die Aktivitätserhöhung der intrazellulär assoziierten JAK-Tyrosinkinasen neben einer Autophosphorylierung ebenfalls die Phosphorylierung der benachbarten SH2-Domäne (Yan *et al.*, 2018). Dadurch wird eine Bindungsstelle für STAT-Moleküle geschaffen, die nach Anlagerung ebenfalls phosphoryliert werden und in Folge dimerisieren. Erst als Dimer kann gegebenenfalls STAT3 mit dem Co-Aktivator-Komplex aus CBP/p300/Smad1 interagieren und nach Transport in den Zellkern dort als Transkriptionsaktivator an spezifischen Promotor-Bindungsstellen fungieren. So konnten beispielsweise STAT3-Bindungsstellen in der Region B des Basalpromotors des GFAP-Gens (Bonni *et al.*, 1997) sowie zur Regulation der S100 β -Transkription identifiziert werden. Interessanterweise wurden auch STAT1 und STAT3 Bindungsstellen in den Promotoren für STAT1 und STAT3 selbst sowie für JAK1 und GP130 gefunden. Diese Möglichkeit zur positiven Autoregulation (He *et al.*, 2005) könnte an einer chronischen Aufrechterhaltung des Aktivitätszustandes bei Dysregulation einer physiologischen Inhibition beteiligt sein.

Eine Möglichkeit, die zur Transkription des beobachteten Markers Iba1 und den damit assoziierten Veränderungen des Phänotyps führt, beinhaltet einen bekannten Ras-Raf-MAPK-Signalweg mit Beteiligung der Rho-GTPase Rac (Imai and Kohsaka, 2002). Dieser Signalweg ist vermittelt durch ATP auch an der Reaktion vormals ruhender Mikroglia auf eine gesteigerte neuronale Aktivität beteiligt und scheint durch veränderte Expressionsprofile eine überschießende Aktivität ursächlicher Neuronen abzuschwächen (Li, Du and Du, 2013). Da nach dem initialen Ausbleiben von Aktionspotenzialen aufgrund der fehlenden afferenten spinokortikalen Eingänge eine unspezifische Zunahme neuronaler Aktivität im Rahmen der beschriebenen Adaptationsprozesse vor allem im Motorkortex folgt (López-Larraz *et al.*, 2015), ist denkbar, dass die Mikroglia über diesen Weg sekundär aktiviert werden und somit in der Folge ihren Beitrag zur neuronalen Plastizität leisten könnten.

In Bezug auf die diskutierte Möglichkeit einer inflammatorischen Ursache der reaktiven Gliose sind die beobachteten Veränderungen von Seiten der Mikroglia pathognomonisch. Die Tatsache, dass unter anderem Pax5-Bindungsstellen im Iba1-Promotor nachgewiesen werden konnten, welches als Modulator immunologischer Prozesse ebenfalls mit einer inflammatorischen Immunantwort, Leukozytenaktivierung sowie B-Lymphozyten-Entwicklung in Verbindung gebracht wird (Maurya and Mishra, 2018), unterstreicht diesen Zusammenhang. Für die übergeordnete Orchestrierung einer inflammatorischen Immunreaktion vieler Zellen ist außerdem der NF- κ B-Signalweg von großer Bedeutung. Eine Inhibition dieses Signalwegs konnte im Rahmen lokaler invasiver Traumata bereits mit förderlichen Effekten für Funktion und Regeneration in Verbindung gebracht werden (Brambilla *et al.*, 2005).

Es gibt weitere Hinweise auf einzelne Elemente von nach Rückenmarksverletzungen veränderten Expressionsprofilen, die im Zusammenhang mit dieser Arbeit von Interesse sein könnten. So wurde im Rahmen von Rückenmarksverletzungen von einer verminderten Expression des Nogo-Rezeptors sowie dessen Co-Rezeptors LINGO-1 bei zeitgleicher erhöhter Konzentration von BDNF in kortikalen Bereichen mit verminderten somatosensorischen Eingangssignalen berichtet (Endo *et al.*, 2007). Außerdem konnte die Aktivität beteiligter Mikroglia im Bereich des Nucleus ventralis posterior des

Thalamus nach Rückenmarksverletzungen mit der Sekretion von CCL21 durch pathologisch traumatisierte Neuronen in Zusammenhang gebracht werden (Zhao, Waxman and Hains, 2007). Vergleichbare Mechanismen wären im motorischen Kortexareal für den angesprochenen Fall einer akzidentellen Affektion betreffender Motorneurone ebenfalls denkbar.

4.4 Bedeutung einer reaktive Gliose nach Rückenmarksverletzung

Die Beobachtungen zeigen, dass es über die lokale Traumareaktion auf Rückenmarksebene hinaus zerebrale, möglicherweise ubiquitäre Anpassungsprozesse mit Beteiligung von Gliazellen gibt. Bemerkenswert ist außerdem, dass auch nicht ZNS-penetrierende Rückenoperationen mit solchen glialen Effekten korreliert werden konnten. Wie dargestellt haben reaktive Gliazellen in diesem Zusammenhang das Potenzial für vielseitige und weitreichende Auswirkungen auch auf das nicht primär betroffene zerebrale ZNS-Gewebe. Neben den strukturellen sowie funktionellen Konsequenzen auf zellulärer Ebene, können diese in ihrer Gesamtheit auch übergeordnete kognitive Funktionen wie beispielsweise Gedächtnisleistungen, Lernen und Konzentrationsvermögen negativ beeinflussen. Aus evolutionärer Sicht ist es völlig abwegig, dass die beobachteten traumafernen reaktiven Veränderungen keine unmittelbaren für das Überleben vorteilhaften Effekte haben, auch wenn diese abseits der offensichtlich notwendigen funktionellen Adaptation des neuronalen Netzwerks zum jetzigen Zeitpunkt nicht klar benannt werden können. Es scheint wie bei der reaktiven Gliose allgemein eher die Frage zu sein, ob es sich um eine vorübergehende physiologisch selbstlimitierende Reaktion handelt oder die reaktiven Zustände pathologisch persistieren und letztendlich chronifizieren (Abb. 20). In diesem Fall wäre auf Grundlage der geführten Diskussion von einer glialen Dysfunktion zu sprechen, die mit Einschränkungen gegenüber zukünftig notwendigen Reaktionsmöglichkeiten betroffener Zellen einhergeht. Zum einen führt eine inadäquate Antwort reaktiv geprägter Gliazellen beispielsweise durch Hyperreagibilität potenziell zu einer individuellen Vulnerabilität gegenüber neurodegenerativen Pathologien (Thameem Dheen, Kaur and Ling, 2007). Zum anderen behindert eine verringerte strukturelle oder

funktionelle Flexibilität möglicherweise die physiologisch kontinuierlich notwendigen Adaptationsprozesse an verändernde Anforderungen innerhalb einzelner glialer Einheiten. Darüber hinaus sind außerdem die direkt mit chronisch reaktiven Gliazellen assoziierten pathologischen Langzeitfolgen auf das ZNS-Parenchym zu berücksichtigen. Hier stehen neben dem Umbau des histologischen Milieus vor allem Folgen einer persistierenden Neuroinflammation mit Prädispositionen für neurologische und neurodegenerative Erkrankungen wie Depressionen, Alzheimer sowie Parkinson im Vordergrund.

Nicht zuletzt ist die reaktive Gliose übergeordnet selbst als Bestandteil einer komplexen Reaktion des ZNS als gesamtheitliches Organ anzusehen, an der neurale und nicht-neurale Zellen des ZNS sowie periphere Zellen zusammen beteiligt sind. Aufgrund der dargestellten großen Heterogenität und Komplexität der reaktiven Effekte gestaltet sich die Identifikation von einzelnen spezifischen Einflussfaktoren und deren Konsequenzen schwierig, sodass viele Zusammenhänge der ablaufenden Prozesse noch unbekannt sind. Allerdings sind insbesondere die daraus resultierenden Erkenntnisse für den pathologischen Verlauf förderlicher sowie beeinträchtigender Aspekte essenziell, um in der Folge neue therapeutische Ansätze und die Entwicklung spezifischer Biomarker zu ermöglichen.

4.5 Limitationen und Ausblick

Die Beobachtungen und Rückschlüsse dieser Arbeit verschaffen erste Hinweise auf Reaktionen von Gliazellen nach invasiven Rückenmarksverletzungen im Vergleich zu nicht ZNS-penetrierender Rückenoperationen. Neben der geringen Anzahl publizierter Datenpunkte zu diesem Thema, muss auch das in dieser Arbeit verwendete tierexperimentelle Modell berücksichtigt werden. Auch wenn die Anordnung und Proportion der einzelnen Hirnareale zwischen Menschen und Mäusen Unterschiede aufweisen, sind sich die einzelnen Komponenten und damit der funktionelle Aufbau prinzipiell sehr ähnlich. Auch in Bezug auf fundamentale zelluläre Prozesse können aufgrund der evolutionären Konservierung weitreichende Gemeinsamkeiten

vorausgesetzt werden. Die Übereinstimmungen sind offensichtlich groß genug, dass auf Grundlage von Mausmodellen über die Erkenntnisse zu physiologischen aber auch pathophysiologischen Prozessen therapeutische Optionen zur Behandlung von neurologischen und psychiatrischen Erkrankungen entwickelt werden konnten (Ellenbroek and Youn, 2016; Żakowski, 2020). Dennoch sind tierexperimentelle Modelle immer nur ein Annäherungsversuch, gerade in Bezug auf den komplexen Kontext neurowissenschaftlicher Fragestellungen. Da Mäuse als Modelle in der Grundlagenforschung mittlerweile sehr etabliert und weit verbreitet sind, ist eine Diversität der Erkenntnisse und somit Bestätigung aus anderen untersuchten Spezies seltener geworden. Für eine Verallgemeinerung der Rückschlüsse aus solchen Modellen sind daher weitere Bestätigungen zwingend erforderlich.

Korrespondierende reaktive Zustände glialer Zellen konnten im Menschen bisher postmortal beziehungsweise in Resektionsgewebe nach neurochirurgischen Eingriffen nachvollzogen werden (Verwer *et al.*, 2015) und sind in Ihrer Beschreibung mit Erkenntnissen aus tierexperimentellen Mausmodellen vergleichbar. Eine Identifizierung von direkt auf reaktive Gliazellen zurückführbare klinische Auswirkungen scheint in der Praxis zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht möglich zu sein. Im akuten Ereignis imponieren vor allem neuronal bedingte Defizite, wohingegen im Falle eines chronischen Verlaufs die gegebenenfalls hohe Latenz bis zum Auftreten klinisch relevanter Symptome eine konkrete Zuordnung erschwert. Selbst wenn man sich über die zu verfolgenden Auswirkungen von reaktiven Gliazellen im Klaren wäre, fehlt es aktuell an spezifischen und nicht-invasiven Möglichkeiten zur (Verlaufs-)Diagnostik. Die Entwicklung spezifischer Biomarker sowie höherer Auflösungen in der funktionellen Bildgebung wird daher die Identifikation von Patienten mit reaktiver Gliose erst zuverlässig ermöglichen und im Verlauf neue erforderliche Einblicke in ablaufende Prozesse bieten. So geben beispielsweise Studien mit Hilfe der PET zunehmend Hinweise darauf, dass Mikroglia auch im Menschen eine entscheidende Rolle bei chronischer Neurodegeneration und Neuroinflammation nach ZNS-Verletzungen spielen (Ramlackhansingh *et al.*, 2011; Johnson *et al.*, 2013).

5. Zusammenfassung

Die reaktive Gliose ist als physiologische Reaktion auf pathologische Veränderungen innerhalb des zentralen Nervensystems (ZNS) schon länger bekannt. Bisher wurden viele unterschiedliche Ausprägungsformen und Effekte in Abhängigkeit verschiedener pathologischer Prozesse und der betroffenen histologischen Kompartimente beschrieben. Die übergeordneten Auswirkungen sowie Einflussfaktoren dieser multizellulären Reaktion sind nicht zuletzt aufgrund der hohen Komplexität bisher ungewiss. Durch die Erkenntnis der letzten Jahrzehnte über die essenziellen Funktionen von Gliazellen in ihren interzellulären Interaktionen aber auch für das ZNS als ganzheitliches Organ ist das Potenzial für therapeutische Einflussmöglichkeiten auf diese Zellpopulation deutlich geworden. Bislang fehlen allerdings nach wie vor ausreichend Daten zu verschiedenen pathologischen Einflüssen, um das generelle Zusammenspiel beteiligter molekularer Signalkaskaden und interzellulärer Interaktionen zur Orchestrierung einer reaktiven Gliose entschlüsseln und potenzielle Konsequenzen umfassend beurteilen zu können.

Angesichts der zentralen Rolle von Astrozyten für alle Ebenen der funktionellen Plastizität und Mikroglia als Immuneffektorzellen innerhalb des ZNS, habe ich in dieser Arbeit die regionsspezifische Dynamik der Aktivierung dieser Gliazellpopulationen nach thorakalen Rückenmarkstraumata untersucht. In dieser Arbeit konnte ich zeigen, dass auch Gliazellen des zerebralen Kortex auf Traumata des Rückenmarks reagieren. Diese Reaktion war darüber hinaus nicht nur auf invasive Rückenmarksverletzungen beschränkt, sondern konnte auch im Rahmen von Rückenoperationen in unmittelbarer Umgebung der Wirbelsäule beobachtet werden. Diese Ergebnisse unterstützen die Annahme, dass eine reaktive Gliose auch peripher zur Läsionstelle auftreten kann und die gliale Reaktion eine regionsspezifische Heterogenität aufweist. In der Konsequenz besteht aufgrund ausgelöster glialer Dysfunktionen das Potenzial für klinisch relevante längerfristige Folgen auf übergeordnete Funktionen des ZNS über die akuten neurologischen Symptomatiken hinaus. Die in dieser Studie eingeführten und angewandten Methoden wurden bereits publiziert (Frik *et al.*, 2018) und das Ergebnis aktuell für eine Veröffentlichung in „Frontiers in Molecular Neuroscience“ vorbereitet.

6. Literaturverzeichnis

Abbott, N. J., Rönnebeck, L. and Hansson, E. (2006) 'Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier', *Nature Reviews Neuroscience*. Nat Rev Neurosci, pp. 41–53. doi: 10.1038/nrn1824.

Allen, N. J. and Lyons, D. A. (2018) 'Glia as architects of central nervous system formation and function', *Science*, 362(6411), pp. 181–185. doi: 10.1126/science.aat0473.

Anderson, M. A., Ao, Y. and Sofroniew, M. V. (2014) 'Heterogeneity of reactive astrocytes', *Neuroscience Letters*, 565, pp. 23–29. doi: 10.1016/j.neulet.2013.12.030.

Bak, L. K., Schousboe, A. and Waagepetersen, H. S. (2006) 'The glutamate/GABA-glutamine cycle: aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer', *Journal of Neurochemistry*, 98(3), pp. 641–653. doi: 10.1111/j.1471-4159.2006.03913.x.

Barateiro, A., Brites, D. and Fernandes, A. (2016) 'Oligodendrocyte Development and Myelination in Neurodevelopment: Molecular Mechanisms in Health and Disease', *Current Pharmaceutical Design*, 22(6), pp. 656–679. doi: 10.2174/1381612822666151204000636.

Bardehle, S. *et al.* (2013) 'Live imaging of astrocyte responses to acute injury reveals selective juxtavascular proliferation', *Nature Neuroscience*, 16(5), pp. 580–586. doi: 10.1038/nn.3371.

Bareyre, F. M. *et al.* (2004) 'The injured spinal cord spontaneously forms a new intraspinal circuit in adult rats', *Nature Neuroscience*, 7(3), pp. 269–277. doi: 10.1038/nn1195.

von Bartheld, C. S., Bahney, J. and Herculano-Houzel, S. (2016) 'The search for true numbers of neurons and glial cells in the human brain: A review of 150 years of cell counting', *Journal of Comparative Neurology*, 524(18), pp. 3865–3895. doi: 10.1002/cne.24040.

Bazargani, N. and Attwell, D. (2016) 'Astrocyte calcium signaling: the third wave', *Nature Neuroscience*, 19(2), pp. 182–189. doi: 10.1038/nn.4201.

Bernardinelli, Y., Muller, D. and Nikonenko, I. (2014) 'Astrocyte-Synapse Structural Plasticity', *Neural Plasticity*, 2014, pp. 1–13. doi: 10.1155/2014/232105.

Boillée, S., Vande Velde, C. and Cleveland, D. W. W. (2006) 'ALS: A Disease of Motor Neurons and Their Nonneuronal Neighbors', *Neuron*. Neuron, pp. 39–59. doi: 10.1016/j.neuron.2006.09.018.

Bolognini, N., Russo, C. and Edwards, D. J. (2016) 'The sensory side of post-stroke motor rehabilitation', *Restorative Neurology and Neuroscience*, 34(4), pp. 571–586. doi: 10.3233/RNN-150606.

Bonni, A. *et al.* (1997) 'Regulation of gliogenesis in the central nervous system by the JAK-STAT signaling pathway', *Science*, 278(5337), pp. 477–483. doi: 10.1126/science.278.5337.477.

Brambilla, R. *et al.* (2005) 'Inhibition of astroglial nuclear factor κ B reduces inflammation and improves functional recovery after spinal cord injury', *Journal of Experimental Medicine*, 202(1), pp. 145–156. doi: 10.1084/jem.20041918.

Burda, J. E. and Sofroniew, M. V. (2014) 'Reactive Gliosis and the Multicellular Response to CNS Damage and Disease', *Neuron*, 81(2), pp. 229–248. doi: 10.1016/j.neuron.2013.12.034.

Casano, A. M. and Peri, F. (2015) 'Microglia: Multitasking Specialists of the Brain', *Developmental Cell*, 32(4), pp. 469–477. doi: 10.1016/j.devcel.2015.01.018.

Castro Dias, M. *et al.* (2019) 'Structure and Junctional Complexes of Endothelial, Epithelial and Glial Brain Barriers', *International Journal of Molecular Sciences*, 20(21), p. 5372. doi: 10.3390/ijms20215372.

Chung, W.-S. *et al.* (2015) 'Do glia drive synaptic and cognitive impairment in disease?', *Nature Neuroscience*, 18(11), pp. 1539–1545. doi: 10.1038/nn.4142.

Colodner, K. J. *et al.* (2005) 'Proliferative Potential of Human Astrocytes', *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 64(2), pp. 163–169. doi: 10.1093/jnen/64.2.163.

- Craig, A. *et al.* (2015) 'Prospective study of the occurrence of psychological disorders and comorbidities after spinal cord injury', *Archives of physical medicine and rehabilitation*, 96(8), pp. 1426–34. doi: 10.1016/j.apmr.2015.02.027.
- Davidoff, G. N., Roth, E. J. and Richards, J. S. (1992) 'Cognitive deficits in spinal cord injury: epidemiology and outcome', *Archives of physical medicine and rehabilitation*, 73(3), pp. 275–84. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1543433> (Accessed: 4 January 2018).
- Devinsky, O. *et al.* (2013) 'Glia and epilepsy: excitability and inflammation', *Trends in Neurosciences*, 36(3), pp. 174–184. doi: 10.1016/j.tins.2012.11.008.
- Dewan, M. C. *et al.* (2019) 'Estimating the global incidence of traumatic brain injury', *Journal of Neurosurgery*, 130(4), pp. 1080–1097. doi: 10.3171/2017.10.JNS17352.
- Dimou, L. and Götz, M. (2014) 'Glial Cells as Progenitors and Stem Cells: New Roles in the Healthy and Diseased Brain', *Physiological Reviews*, 94(3), pp. 709–737. doi: 10.1152/physrev.00036.2013.
- Dityatev, A. and Schachner, M. (2003) 'Extracellular matrix molecules and synaptic plasticity', *Nature Reviews Neuroscience*, 4(6), pp. 456–468. doi: 10.1038/nrn1115.
- Dziennis, S. and Alkayed, N. J. (2008) 'Role of Signal Transducer and activator of transcription 3 in neuronal survival and regeneration', *Reviews in the Neurosciences*. Freund Publishing House Ltd, pp. 341–361. doi: 10.1515/REVNEURO.2008.19.4-5.341.
- Ellenbroek, B. and Youn, J. (2016) 'Rodent models in neuroscience research: is it a rat race?', *Disease Models & Mechanisms*, 9(10), pp. 1079–1087. doi: 10.1242/dmm.026120.
- Endo, T. *et al.* (2007) 'Cortical sensory map rearrangement after spinal cord injury: fMRI responses linked to Nogo signalling', *Brain*, 130(11), pp. 2951–2961. doi: 10.1093/brain/awm237.
- Escartin, C. *et al.* (2021) 'Reactive astrocyte nomenclature, definitions, and future directions', *Nature Neuroscience*, 24(3), pp. 312–325. doi: 10.1038/s41593-020-00783-4.
- Falk, S. and Götz, M. (2017) 'Glial control of neurogenesis', *Current Opinion in Neurobiology*, 47, pp. 188–195. doi: 10.1016/j.conb.2017.10.025.
- Faulkner, J. R. (2004) 'Reactive Astrocytes Protect Tissue and Preserve Function after Spinal Cord Injury', *Journal of Neuroscience*, 24(9), pp. 2143–2155. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3547-03.2004.
- Fenn, A. M. *et al.* (2014) 'Immune activation promotes depression 1 month after diffuse brain injury: A role for primed microglia', *Biological Psychiatry*, 76(7), pp. 575–584. doi: 10.1016/j.biopsych.2013.10.014.
- Freund, P. *et al.* (2011) 'Disability, atrophy and cortical reorganization following spinal cord injury', *Brain*, 134(6), pp. 1610–1622. doi: 10.1093/brain/awr093.
- Frik, J. *et al.* (2018) 'Cross-talk between monocyte invasion and astrocyte proliferation regulates scarring in brain injury', *EMBO reports*, 19(5), p. e45294. doi: 10.15252/embr.201745294.
- Giaume, C. and McCarthy, K. D. (1996) 'Control of gap-junctional communication in astrocytic networks', *Trends in Neurosciences*, 19(8), pp. 319–325. doi: 10.1016/0166-2236(96)10046-1.
- Giménez Y Ribotta, M. *et al.* (2000) 'Comparative anatomy of the cerebellar cortex in mice lacking vimentin, GFAP, and both vimentin and GFAP', *GLIA*, 31(1), pp. 69–83. doi: 10.1002/(SICI)1098-1136(200007)31:1<69::AID-GLIA70>3.0.CO;2-W.
- Ginhoux, F. *et al.* (2010) 'Fate Mapping Analysis Reveals That Adult Microglia Derive from Primitive Macrophages', *Science*, 330(6005), pp. 841–845. doi: 10.1126/science.1194637.
- Gordon, S. (2003) 'Alternative activation of macrophages', *Nature Reviews Immunology*, 3(1), pp. 23–35. doi: 10.1038/nri978.
- Götz, M. *et al.* (2015) 'Reactive astrocytes as neural stem or progenitor cells: In vivo lineage, In vitro potential, and Genome-wide expression analysis', *Glia*, 63(8), pp. 1452–1468. doi: 10.1002/glia.22850.
- Halassa, M. M. and Haydon, P. G. (2010) 'Integrated Brain Circuits: Astrocytic Networks Modulate Neuronal

Activity and Behavior', *Annual Review of Physiology*, 72(1), pp. 335–355. doi: 10.1146/annurev-physiol-021909-135843.

Hamby, M. E. *et al.* (2012) 'Inflammatory mediators alter the astrocyte transcriptome and calcium signaling elicited by multiple G-protein-coupled receptors', *Journal of Neuroscience*, 32(42), pp. 14489–14510. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1256-12.2012.

Hamilton, N. *et al.* (2008) 'Mechanisms of ATP- and glutamate-mediated calcium signaling in white matter astrocytes', *Glia*, 56(7), pp. 734–749. doi: 10.1002/glia.20649.

Hanisch, U.-K. and Kettenmann, H. (2007) 'Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain', *Nature Neuroscience*, 10(11), pp. 1387–1394. doi: 10.1038/nn1997.

He, F. *et al.* (2005) 'A positive autoregulatory loop of Jak-STAT signaling controls the onset of astroglialogenesis', *Nature Neuroscience*, 8(5), pp. 616–625. doi: 10.1038/nn1440.

Henstridge, C. M., Pickett, E. and Spire-Jones, T. L. (2016) 'Synaptic pathology: A shared mechanism in neurological disease', *Ageing Research Reviews*, 28, pp. 72–84. doi: 10.1016/j.arr.2016.04.005.

Herrmann, J. E. *et al.* (2008) 'STAT3 is a Critical Regulator of Astroglialosis and Scar Formation after Spinal Cord Injury', *Journal of Neuroscience*, 28(28), pp. 7231–7243. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1709-08.2008.

Hughes, E. G. *et al.* (2013) 'Oligodendrocyte progenitors balance growth with self-repulsion to achieve homeostasis in the adult brain', *Nature Neuroscience*, 16(6), pp. 668–676. doi: 10.1038/nn.3390.

Imai, Y. and Kohsaka, S. (2002) 'Intracellular signaling in M-CSF-induced microglia activation: Role of Iba1', *Glia*, 40(2), pp. 164–174. doi: 10.1002/glia.10149.

Jäkel, S. and Dimou, L. (2017) 'Glial Cells and Their Function in the Adult Brain: A Journey through the History of Their Ablation', *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 11, p. 24. doi: 10.3389/fncel.2017.00024.

Johnson, V. E. *et al.* (2013) 'Inflammation and white matter degeneration persist for years after a single traumatic brain injury', *Brain*, 136(1), pp. 28–42. doi: 10.1093/brain/aww322.

Kassebaum, N. J. *et al.* (2016) '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', *The Lancet*, 388(10053), pp. 1603–1658. doi: 10.1016/S0140-6736(16)31460-X.

Kettenmann, H. *et al.* (2011) 'Physiology of Microglia', *Physiological Reviews*, 91(2), pp. 461–553. doi: 10.1152/physrev.00011.2010.

Kitazawa, M., Yamasaki, T. R. and LaFerla, F. M. (2004) 'Microglia as a potential bridge between the amyloid β -peptide and tau', in *Annals of the New York Academy of Sciences*. New York Academy of Sciences, pp. 85–103. doi: 10.1196/annals.1332.006.

Kraft, A. W. *et al.* (2013) 'Attenuating astrocyte activation accelerates plaque pathogenesis in APP/PS1 mice', *FASEB Journal*, 27(1), pp. 187–198. doi: 10.1096/fj.12-208660.

Kraggsbjerg, P., Holmberg, H. and Vikersfors, T. (1995) 'Serum concentrations of interleukin-6, tumour necrosis factor-alpha, and C-reactive protein in patients undergoing major operations.', *The European journal of surgery = Acta chirurgica*, 161(1), pp. 17–22.

Krstic, D. *et al.* (2012) 'Systemic immune challenges trigger and drive Alzheimer-like neuropathology in mice', *Journal of Neuroinflammation*, 9. doi: 10.1186/1742-2094-9-151.

Lassmann, H. (2018) 'Multiple Sclerosis Pathology', *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 8(3), p. a028936. doi: 10.1101/cshperspect.a028936.

Lau, A. and Tymianski, M. (2010) 'Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration', *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 460(2), pp. 525–542. doi: 10.1007/s00424-010-0809-1.

Lepekhn, E. A. *et al.* (2001) 'Intermediate filaments regulate astrocyte motility', *Journal of Neurochemistry*, 79(3), pp. 617–625. doi: 10.1046/j.1471-4159.2001.00595.x.

- Li, Y., Du, X. fei and Du, J. lin (2013) 'Resting microglia respond to and regulate neuronal activity in vivo', *Communicative and Integrative Biology*, 6(4). doi: 10.4161/cib.24493.
- Liedtke, W. *et al.* (1996) 'GFAP is necessary for the integrity of CNS white matter architecture and long-term maintenance of myelination', *Neuron*, 17(4), pp. 607–615. doi: 10.1016/S0896-6273(00)80194-4.
- López-Larraz, E. *et al.* (2015) 'Evolution of EEG Motor Rhythms after Spinal Cord Injury: A Longitudinal Study', *PLOS ONE*. Edited by F. de Castro, 10(7), p. e0131759. doi: 10.1371/journal.pone.0131759.
- Lu, Y. *et al.* (2011) 'Reactive glial cells: increased stiffness correlates with increased intermediate filament expression', *The FASEB Journal*, 25(2), pp. 624–631. doi: 10.1096/fj.10-163790.
- Luh, C. *et al.* (2011) 'Influence of a Brief Episode of Anesthesia during the Induction of Experimental Brain Trauma on Secondary Brain Damage and Inflammation', *PLoS ONE*. Edited by S. G. Meuth, 6(5), p. e19948. doi: 10.1371/journal.pone.0019948.
- Lynch, M. A. (2009) 'The Multifaceted Profile of Activated Microglia', *Molecular Neurobiology*, 40(2), pp. 139–156. doi: 10.1007/s12035-009-8077-9.
- Maragakis, N. J. and Rothstein, J. D. (2006) 'Mechanisms of Disease: astrocytes in neurodegenerative disease', *Nature Clinical Practice Neurology*, 2(12), pp. 679–689. doi: 10.1038/ncpneuro0355.
- Marlier, Q. *et al.* (2020) 'Core cell cycle machinery is crucially involved in both life and death of post-mitotic neurons', *Cellular and Molecular Life Sciences*, 77(22), pp. 4553–4571. doi: 10.1007/s00018-020-03548-1.
- Masuda, T. *et al.* (2020) 'Microglia Heterogeneity in the Single-Cell Era', *Cell Reports*, 30(5), pp. 1271–1281. doi: 10.1016/j.celrep.2020.01.010.
- Mattugini, N. *et al.* (2018) 'Influence of white matter injury on gray matter reactive gliosis upon stab wound in the adult murine cerebral cortex', *Glia*, 66(8), pp. 1644–1662. doi: 10.1002/glia.23329.
- Mauch, D. H. *et al.* (2001) 'CNS Synaptogenesis Promoted by Glia-Derived Cholesterol', *Science*, 294(5545), pp. 1354–1357. doi: 10.1126/science.294.5545.1354.
- Maurya, S. K. and Mishra, R. (2018) 'Co-Localization and Interaction of Pax5 with Iba1 in Brain of Mice', *Cellular and Molecular Neurobiology*, 38(4), pp. 919–927. doi: 10.1007/s10571-017-0566-1.
- Mckee, A. C. and Daneshvar, D. H. (2015) 'The neuropathology of traumatic brain injury', in *Handbook of clinical neurology*. Handb Clin Neurol, pp. 45–66. doi: 10.1016/B978-0-444-52892-6.00004-0.
- Middeldorp, J. and Hol, E. M. (2011) 'GFAP in health and disease', *Progress in Neurobiology*, 93(3), pp. 421–443. doi: 10.1016/j.pneurobio.2011.01.005.
- Morell, P. and Quarles, R. H. (1999) *The Myelin Sheath, Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects. 6th edition*. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27954/> (Accessed: 15 January 2022).
- Mulligan, S. J. and MacVicar, B. A. (2004) 'Calcium transients in astrocyte endfeet cause cerebrovascular constrictions', *Nature*, 431(7005), pp. 195–199. doi: 10.1038/nature02827.
- Murabe, Y. and Sano, Y. (1982) 'Morphological studies on neuroglia', *Cell and Tissue Research*, 225(3), pp. 469–485. doi: 10.1007/BF00214798.
- Muramatsu, R. *et al.* (2015) 'Prostacyclin prevents pericyte loss and demyelination induced by lysophosphatidylcholine in the central nervous system.', *The Journal of biological chemistry*, 290(18), pp. 11515–25. doi: 10.1074/jbc.M114.587253.
- Murray, R. F. *et al.* (2007) 'Impact of spinal cord injury on self-perceived pre- and postmorbid cognitive, emotional and physical functioning.', *Spinal cord*, 45(6), pp. 429–36. doi: 10.1038/sj.sc.3102022.
- Myer, D. J. (2006) 'Essential protective roles of reactive astrocytes in traumatic brain injury', *Brain*, 129(10), pp. 2761–2772. doi: 10.1093/brain/awl165.
- Nakazawa, T. *et al.* (2007) 'Attenuated glial reactions and photoreceptor degeneration after retinal detachment in mice deficient in glial fibrillary acidic protein and vimentin', *Investigative Ophthalmology*

- and *Visual Science*, 48(6), pp. 2760–2768. doi: 10.1167/iovs.06-1398.
- Nardone, R. *et al.* (2013) 'Functional brain reorganization after spinal cord injury: Systematic review of animal and human studies', *Brain Research*, 1504, pp. 58–73. doi: 10.1016/j.brainres.2012.12.034.
- Neary, J. T. *et al.* (2003) 'Activation of Extracellular Signal-Regulated Kinase by Stretch-Induced Injury in Astrocytes Involves Extracellular ATP and P2 Purinergic Receptors', *The Journal of Neuroscience*, 23(6), pp. 2348–2356. doi: 10.1523/JNEUROSCI.23-06-02348.2003.
- Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F. and Helmchen, F. (2005) 'Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo.', *Science (New York, N.Y.)*, 308(5726), pp. 1314–8. doi: 10.1126/science.1110647.
- Norden, D. M., Muccigrosso, M. M. and Godbout, J. P. (2015) 'Microglial priming and enhanced reactivity to secondary insult in aging, and traumatic CNS injury, and neurodegenerative disease', *Neuropharmacology*. Elsevier Ltd, pp. 29–41. doi: 10.1016/j.neuropharm.2014.10.028.
- Nout, Y. S., Beattie, M. S. and Bresnahan, J. C. (2012) 'Severity of Locomotor and Cardiovascular Derangements after Experimental High-Thoracic Spinal Cord Injury Is Anesthesia Dependent in Rats', *Journal of Neurotrauma*, 29(5), pp. 990–999. doi: 10.1089/neu.2011.1845.
- Oberheim, N. A., Goldman, S. A. and Nedergaard, M. (2012) 'Heterogeneity of Astrocytic Form and Function', in *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*. Methods Mol Biol, pp. 23–45. doi: 10.1007/978-1-61779-452-0_3.
- Okada, S. *et al.* (2006) 'Conditional ablation of Stat3 or Socs3 discloses a dual role for reactive astrocytes after spinal cord injury', *Nature Medicine*, 12(7), pp. 829–834. doi: 10.1038/nm1425.
- Pekny, M. *et al.* (2016) 'Astrocytes: a central element in neurological diseases', *Acta Neuropathologica*, 131(3), pp. 323–345. doi: 10.1007/s00401-015-1513-1.
- Pekny, M. and Nilsson, M. (2005) 'Astrocyte activation and reactive gliosis', *Glia*, 50(4), pp. 427–434. doi: 10.1002/glia.20207.
- Plass, D. *et al.* (2014) 'Trends in Disease Burden in Germany', *Deutsches Ärzteblatt international*, 111(38), pp. 629–638. doi: 10.3238/arztebl.2014.0629.
- Potokar, M. *et al.* (2010) 'Intermediate filaments attenuate stimulation-dependent mobility of endosomes/lysosomes in astrocytes', *GLIA*, 58(10), pp. 1208–1219. doi: 10.1002/glia.21000.
- Prokop, S., Miller, K. R. and Heppner, F. L. (2013) 'Microglia actions in Alzheimer's disease', *Acta Neuropathologica*, 126(4), pp. 461–477. doi: 10.1007/s00401-013-1182-x.
- Ramlackhansingh, A. F. *et al.* (2011) 'Inflammation after trauma: Microglial activation and traumatic brain injury', *Annals of Neurology*, 70(3), pp. 374–383. doi: 10.1002/ana.22455.
- Rasmussen, R. *et al.* (2020) 'Interstitial ions: A key regulator of state-dependent neural activity?', *Progress in Neurobiology*, 193, p. 101802. doi: 10.1016/j.pneurobio.2020.101802.
- Retzius, Gustaf, Fürst, C. M. and Stach, W. (1921) *Biologische Untersuchungen*. Stockholm,: Samson & Wallin; doi: 10.5962/bhl.title.59322.
- Richardson, W. D. *et al.* (2011) 'NG2-glia as Multipotent Neural Stem Cells: Fact or Fantasy?', *Neuron*, 70(4), pp. 661–673. doi: 10.1016/j.neuron.2011.05.013.
- Rivera-Zengotita, M. and Yachnis, A. T. (2012) 'Gliosis Versus Glioma?', *Advances in Anatomic Pathology*, 19(4), pp. 239–249. doi: 10.1097/PAP.0b013e31825c6a04.
- Robel, S., Berninger, B. and Götz, M. (2011) 'The stem cell potential of glia: lessons from reactive gliosis', *Nature Reviews Neuroscience*, 12(2), pp. 88–104. doi: 10.1038/nrn2978.
- Saija, A. *et al.* (1995) 'Systemic cytokine administration can affect blood-brain barrier permeability in the rat', *Life Sciences*, 56(10), pp. 775–784. doi: 10.1016/0024-3205(95)00008-T.
- Salzer, J. L. and Zalc, B. (2016) 'Myelination', *Current Biology*, 26(20), pp. R971–R975. doi:

10.1016/j.cub.2016.07.074.

Sanes, J. N., Suner, S. and Donoghue, J. P. (1990) 'Dynamic organization of primary motor cortex output to target muscles in adult rats I. Long-term patterns of reorganization following motor or mixed peripheral nerve lesions', *Experimental Brain Research*, 79(3), pp. 479–491. doi: 10.1007/BF00229318.

Schneider, J., Karpf, J. and Beckervordersandforth, R. (2019) 'Role of Astrocytes in the Neurogenic Niches', in *Methods in Molecular Biology*. Humana Press Inc., pp. 19–33. doi: 10.1007/978-1-4939-9068-9_2.

Seifert, G. and Steinhäuser, C. (2018) 'Heterogeneity and function of hippocampal macroglia', *Cell and Tissue Research*, 373(3), pp. 653–670. doi: 10.1007/s00441-017-2746-1.

Shechter, R. et al. (2009) 'Infiltrating Blood-Derived Macrophages Are Vital Cells Playing an Anti-inflammatory Role in Recovery from Spinal Cord Injury in Mice', *PLoS Medicine*. Edited by M. B. Graeber, 6(7), p. e1000113. doi: 10.1371/journal.pmed.1000113.

Shirakawa, H. et al. (2010) 'Transient Receptor Potential Canonical 3 (TRPC3) Mediates Thrombin-Induced Astrocyte Activation and Upregulates Its Own Expression in Cortical Astrocytes', *Journal of Neuroscience*, 30(39), pp. 13116–13129. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1890-10.2010.

Sims, N. R. and Yew, W. P. (2017) 'Reactive astrogliosis in stroke: Contributions of astrocytes to recovery of neurological function', *Neurochemistry International*, 107, pp. 88–103. doi: 10.1016/j.neuint.2016.12.016.

Singh-Bains, M. K. et al. (2019) 'Altered microglia and neurovasculature in the Alzheimer's disease cerebellum', *Neurobiology of Disease*, 132, p. 104589. doi: 10.1016/j.nbd.2019.104589.

Singh, N. et al. (2019) 'Inflammation and cancer', *Annals of African Medicine*, 18(3), pp. 121–126. doi: 10.4103/aam.aam_56_18.

Sirko, S. et al. (2013) 'Reactive Glia in the Injured Brain Acquire Stem Cell Properties in Response to Sonic Hedgehog', *Cell Stem Cell*, 12(4), pp. 426–439. doi: 10.1016/j.stem.2013.01.019.

Sochocka, M., Diniz, B. S. and Leszek, J. (2016) 'Inflammatory Response in the CNS: Friend or Foe?', *Molecular Neurobiology*, (November), pp. 1–19. doi: 10.1007/s12035-016-0297-1.

Sofroniew, M. V. and Vinters, H. V. (2010) 'Astrocytes: biology and pathology', *Acta Neuropathologica*, 119(1), pp. 7–35. doi: 10.1007/s00401-009-0619-8.

Song, I. and Dityatev, A. (2018) 'Crosstalk between glia, extracellular matrix and neurons', *Brain Research Bulletin*, 136, pp. 101–108. doi: 10.1016/j.brainresbull.2017.03.003.

Stephan, A. H., Barres, B. A. and Stevens, B. (2012) 'The Complement System: An Unexpected Role in Synaptic Pruning During Development and Disease', *Annual Review of Neuroscience*, 35(1), pp. 369–389. doi: 10.1146/annurev-neuro-061010-113810.

Stevens, B. et al. (2007) 'The Classical Complement Cascade Mediates CNS Synapse Elimination', *Cell*, 131(6), pp. 1164–1178. doi: 10.1016/j.cell.2007.10.036.

Sun, F. et al. (2010) 'Effects of axon degeneration on oligodendrocyte lineage cells: Dorsal rhizotomy evokes a repair response while axon degeneration rostral to spinal contusion induces both repair and apoptosis', *Glia*, 58(11), pp. 1304–1319. doi: 10.1002/glia.21009.

Tansey, M. G., McCoy, M. K. and Frank-Cannon, T. C. (2007) 'Neuroinflammatory mechanisms in Parkinson's disease: Potential environmental triggers, pathways, and targets for early therapeutic intervention', *Experimental Neurology*. Exp Neurol, pp. 1–25. doi: 10.1016/j.expneurol.2007.07.004.

Thameem Dheen, S., Kaur, C. and Ling, E.-A. (2007) 'Microglial Activation and its Implications in the Brain Diseases', *Current Medicinal Chemistry*, 14(11), pp. 1189–1197. doi: 10.2174/092986707780597961.

Trotter, J., Karram, K. and Nishiyama, A. (2010) 'NG2 cells: Properties, progeny and origin', *Brain Research Reviews*, 63(1–2), pp. 72–82. doi: 10.1016/j.brainresrev.2009.12.006.

Tumani, H., Huss, A. and Bachhuber, F. (2018) 'The cerebrospinal fluid and barriers – anatomic and physiologic considerations', in *Handbook of clinical neurology*. Handb Clin Neurol, pp. 21–32. doi:

10.1016/B978-0-12-804279-3.00002-2.

Verkhatsky, A. (2009) 'Neuronismo y reticulismo: neuronal-glia circuits unify the reticular and neuronal theories of brain organization', *Acta Physiologica*, 195(1), pp. 111–122. doi: 10.1111/j.1748-1716.2008.01926.x.

Verkhatsky, A., Ho, M. S. and Parpura, V. (2019) 'Evolution of Neuroglia', in *Advances in experimental medicine and biology*. Adv Exp Med Biol, pp. 15–44. doi: 10.1007/978-981-13-9913-8_2.

Verkhatsky, A. and Nedergaard, M. (2018) 'Physiology of Astroglia', *Physiological Reviews*, 98(1), pp. 239–389. doi: 10.1152/physrev.00042.2016.

Verwer, R. W. H. *et al.* (2015) 'Injury Response of Resected Human Brain Tissue In Vitro', *Brain Pathology*, 25(4), pp. 454–468. doi: 10.1111/bpa.12189.

Virchow, R. (1856) *Gesammelte Abhandlungen zur wissenschaftlichen Medicin*. Frankfurt am Main: Verlag von Meidinger Sohn & Comp.

Vogt, C. (1919) *Allgemeine Ergebnisse unserer Hirnforschung*. Leipzig: Verlag von Johann Ambrosius Barth.

de Vries, H. E. *et al.* (1996) 'The influence of cytokines on the integrity of the blood-brain barrier in vitro', *Journal of Neuroimmunology*, 64(1), pp. 37–43. doi: 10.1016/0165-5728(95)00148-4.

Wang, H. *et al.* (2018) 'Portrait of glial scar in neurological diseases', *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 31, p. 205873841880140. doi: 10.1177/2058738418801406.

Wanner, I. B. *et al.* (2013) 'Glial scar borders are formed by newly proliferated, elongated astrocytes that interact to corral inflammatory and fibrotic cells via STAT3-dependent mechanisms after spinal cord injury', *Journal of Neuroscience*, 33(31), pp. 12870–12886. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2121-13.2013.

Watkins, S. *et al.* (2014) 'Disruption of astrocyte-vascular coupling and the blood-brain barrier by invading glioma cells', *Nature communications*, 5, p. 4196. doi: 10.1038/ncomms5196.

Wicher, G. *et al.* (2017) 'Interleukin-33 Promotes Recruitment of Microglia/Macrophages in Response to Traumatic Brain Injury', *Journal of neurotrauma*, 34(22), pp. 3173–3182. doi: 10.1089/neu.2016.4900.

Witcher, K. G., Eiferman, D. S. and Godbout, J. P. (2015) 'Priming the Inflammatory Pump of the CNS after Traumatic Brain Injury', *Trends in Neurosciences*. Elsevier Ltd, pp. 609–620. doi: 10.1016/j.tins.2015.08.002.

Wong, C.-O. (2020) 'Endosomal-Lysosomal Processing of Neurodegeneration-Associated Proteins in Astrocytes', *International Journal of Molecular Sciences*, 21(14), p. 5149. doi: 10.3390/ijms21145149.

Wrigley, P. J. *et al.* (2009) 'Anatomical Changes in Human Motor Cortex and Motor Pathways following Complete Thoracic Spinal Cord Injury', *Cerebral Cortex*, 19(1), pp. 224–232. doi: 10.1093/cercor/bhn072.

Wu, J. *et al.* (2014) 'Isolated spinal cord contusion in rats induces chronic brain neuroinflammation, neurodegeneration, and cognitive impairment', *Cell Cycle*, 13(15), pp. 2446–2458. doi: 10.4161/cc.29420.

Yamanaka, K. *et al.* (2008) 'Astrocytes as determinants of disease progression in inherited amyotrophic lateral sclerosis', *Nature Neuroscience*, 11(3), pp. 251–253. doi: 10.1038/nn2047.

Yan, Z. *et al.* (2018) 'Role of the JAK/STAT signaling pathway in regulation of innate immunity in neuroinflammatory diseases', *Clinical Immunology*, 189, pp. 4–13. doi: 10.1016/j.clim.2016.09.014.

Yanagida, K. *et al.* (2017) 'Size-selective opening of the blood-brain barrier by targeting endothelial sphingosine 1-phosphate receptor 1', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(17), pp. 4531–4536. doi: 10.1073/pnas.1618659114.

Yang, Q. and Zhou, J. (2019) 'Neuroinflammation in the central nervous system: Symphony of glial cells', *Glia*, 67(6), pp. 1017–1035. doi: 10.1002/glia.23571.

Żakowski, W. (2020) 'Animal Use in Neurobiological Research', *Neuroscience*, 433, pp. 1–10. doi: 10.1016/j.neuroscience.2020.02.049.

Zamanian, J. L. *et al.* (2012) 'Genomic Analysis of Reactive Astroglia', *Journal of Neuroscience*, 32(18),

pp. 6391–6410. doi: 10.1523/JNEUROSCI.6221-11.2012.

Zhang, Z. G. and Chopp, M. (2015) 'Promoting brain remodeling to aid in stroke recovery', *Trends in Molecular Medicine*, 21(9), pp. 543–548. doi: 10.1016/j.molmed.2015.07.005.

Zhao, P., Waxman, S. G. and Hains, B. C. (2007) 'Modulation of Thalamic Nociceptive Processing after Spinal Cord Injury through Remote Activation of Thalamic Microglia by Cysteine Cysteine Chemokine Ligand 21', *Journal of Neuroscience*, 27(33), pp. 8893–8902. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2209-07.2007.

Zlokovic, B. V. (2011) 'Neurovascular pathways to neurodegeneration in Alzheimer's disease and other disorders', *Nature Reviews Neuroscience*, 12(12), pp. 723–738. doi: 10.1038/nrn3114.

Danksagung

Ich möchte meiner Doktormutter PD Dr. Swetlana Sirko für die Möglichkeit sowie das Thema dieser Dissertation und den erfolgreichen Abschluss danken, ebenso ein großes Dankeschön an PD Dr. Florence Bareyre und ihre Mitarbeiter*innen für das zur Verfügung gestellte Mausmodell.

Ich danke meiner Partnerin Johanna Kuss für Ihre Geduld und Verständnis, mit der sie mich in dieser Zeit unterstützt hat.

Ich danke ebenfalls meinem Kommilitonen, Lab-Partner und Freund Ole Sommerfeldt für moralische Unterstützung und den fachlichen Austausch über weite Strecken der Arbeit.

Außerdem danke ich allen Mitarbeiter*innen, insbesondere den technischen Assistent*innen der Forschungsgruppe von Prof. Dr. Magdalena Götz, die mit Beratung, Einarbeitung und Hilfestellung die Durchführung dieser Arbeit unterstützt haben.

Erklärung an Eides statt

Ich erkläre, dass ich die an der Ludwig-Maximilians-Universität eingereichte Dissertation mit dem Titel

„Hirnregionsspezifische Reaktion von Gliazellen auf invasive und nicht-penetrierende Verletzungen des Rückenmarks“

im Physiologischen Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München Lehrstuhl für Physiologische Genomik unter Betreuung von

PD Dr. Swetlana Sirko

selbständig 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 in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 15.11.2023

(Ort, Datum)

Jonas Kraska

(Jonas Kraska)

Lebenslauf

Jonas Kraska

geboren am 21.06.1988 in Göttingen

Ausbildung

2014 - 2020 **Ludwig-Maximilians-Universität München**

- Staatsexamen Medizin
- Stipendiat der Stiftung Begabtenförderung berufliche Bildung (SBB)

2009 - 2012 **Elbe Kliniken Stade-Buxtehude GmbH**

- Staatsexamen Gesundheits- und Krankenpflege

2007 - 2009 **Deutsches Rotes Kreuz - Kreisverband Stade gGmbH**

- Freiwilliges Soziales Jahr (FSJ) mit Ausbildung zum Rettungssanitäter

2000 - 2007 **Hölty-Gymnasium Celle**

- Abschluss mit Abitur

Berufserfahrung

2015 - 2021 **studentische Hilfskraft, Ludwig-Maximilians-Universität München**

- studentischer Tutor: selbstständige Konzeption und Durchführung von Tutorien in Anatomie, Erste Hilfe und Notfallmedizin
- Web-Developer: Mitentwicklung eines webbasierten Campus Management Systems (mecumplus.de)

2012 - 2014 **Gesundheits- und Krankenpfleger, Elbe Kliniken Stade-Buxtehude GmbH**

- kardiologisch geführte internistische Intensivstation mit Chest-Pain-Unit

Wissenschaftliche Arbeit

2017 - 2023 **Experimentelle Doktorarbeit**

- am physiologischen Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München, Abteilung für Physiologische Genomik, Direktorin: Prof. Dr. Magdalena Götz
- Betreuung durch Prof. Dr. Swetlana Sirko

Wissenschaftliche Veröffentlichungen

Publikationen

04/2018 EMBO Reports: Cross-talk between monocyte invasion and astrocyte proliferation regulates scarring in brain injury

Jesica Frik, Juliane Merl-Pham, Nikolaus Plesnila, Nicola Mattugini, Jacob Kjell, **Jonas Kraska**, Ricardo M Gómez, Stefanie M Hauck, Swetlana Sirko, Magdalena Götz

<https://doi.org/10.15252/embr.201745294>

In Vorbereitung - Frontiers in Molecular Neuroscience: Region-specific reaction of glial cells in the brain parenchyma of adult mice following spinal cord injury

Melanie Y. Li, **Jonas Kraska**, Kristina Loy, Judith Fischer-Sternjak, Giacomo Masserdotti, Fabian H. Metzger, Stefanie M. Hauck, Florence M. Bareyre, Swetlana Sirko

Poster

Region-specific reaction of glial cells in the brain parenchyma of adult mice following spinal cord injury

XIII European Meeting on Glial Cell Function in Health and Disease, 08.-11. Juli 2017
Edinburgh

Anhang

ImageJ-Plugin

```
// @File(label="Images", style="directory") IMAGE_DIR

importPackage(Packages.ij);
importPackage(java.awt.event);

importClass(java.io.File);
importClass(java.util.Properties);
importClass(java.io.FileInputStream);
importClass(java.io.FileOutputStream);

importClass(Packages.ij.IJ);
importClass(Packages.ij.ImagePlus);
importClass(Packages.ij.WindowManager);
importClass(Packages.ij.text.TextWindow);
importClass(Packages.ij.gui.GenericDialog);
importClass(Packages.ij.gui.DialogListener);
importClass(Packages.ij.io.DirectoryChooser);
importClass(Packages.ij.measure.Calibration);
importClass(Packages.ij.measure.ResultsTable);
importClass(Packages.ij.measure.Measurements);
importClass(Packages.ij.gui.WaitForUserDialog);
importClass(Packages.ij.process.ImageProcessor);
importClass(Packages.ij.plugin.frame.RoiManager);
importClass(Packages.ij.plugin.filter.Analyzer);
importClass(Packages.ij.gui.NonBlockingGenericDialog);
importClass(Packages.ij.plugin.filter.ParticleAnalyzer);

// ##### CONFIGURATIONS ##### //

// calibrate all images with the given settings
IMAGE_CAL = {
    unit: 'µm',
    scale: 0.5535106,
    stack: 1.5,
}

// number and name mapping of the channels
CHANNEL_COUNT = 4;
CHANNEL_MAP = {
    Ki67: 1,
    Iba1: 2,
    DAPI: 3,
    GFAP: 4,
};

// recognizable ROI entries and their namings
ROI_TAGS = ["cor", "thal", "grey", "white", "upper", "lower", "cin", "dia"];
ROI_MAP = {
    excl: "0 - Excludes",
    cor: "1 - Cortex",
    thal: "1 - Thalamus",
    grey: "2 - Grey Matter",
    white: "3 - White Matter",
    upper: "4 - Upper Layer",
    lower: "5 - Lower Layer",
    cin: "6 - Cingulum",
    dia: "7 - Diameter",
    temp: "8 - Temporary"
};

// ##### GLOBAL VARIABLES ##### //

// IMAGE_DIR // given parameter at plugin start
IMAGE_NAME = null; // contains only the name of the upper file
UPPER_NAME = null; // contains only the name of the upper file
```

```

LOWER_NAME = null;           // contains only the name of the lower file
CHANNEL = [];               // all channel images in order like defined above
CHANNEL_FOCUS = [];
CHANNEL_CELLS = [];
ROI_MNG = null;           // ROI Manager object
ROI_CACHE = {             // cached ROI entries
    auto: [],
    manual: [],
    excludes: []
};
DATA = null;
DATA_LABELS = {
    animal: 0,
    slice: 1,
    region: 2,
    brainArea: 3,
    zStack: 4,
    volume: 5,
    GFAPArea: 6,
    GFAPMean: 7,
    IbalArea: 8,
    IbalMean: 9,
    Ki67: 10,
};

CHANNEL_MIN_THRESHOLD = { // default channel min threshold settings
    1: 0,
    2: 0,
    3: 0,
    4: 0,
};
CHANNEL_MAX_THRESHOLD = { // default channel max threshold settings
    1: 255,
    2: 255,
    3: 255,
    4: 255,
};

// ##### START SCRIPT ##### //

// check if both directories were selected
if(IMAGE_DIR != null && IMAGE_DIR.isDirectory()) {

    // get file names
    tmpName = IMAGE_DIR.getAbsolutePath().split("\\");
    IMAGE_NAME = tmpName[tmpName.length-1];
    UPPER_NAME = IMAGE_NAME + "-UI_Maximum intensity projection";
    LOWER_NAME = IMAGE_NAME + "-LI_Maximum intensity projection";

    // open and combine all channels
    channel_init();

    // open previous saved data results
    data_init();

    // start ROI manager
    roi_init();

    // measure all channels
    channel_measure();

    // close channel images
    channel_close();

    // save and close ROI manager
    roi_close();

    // save and close data results
    data_close();
}

```

```

// ##### RESULT DATA ##### //

function data_init() {

    // set measurement options
    Analyzer.setMeasurement(Measurements.AREA, true);
    Analyzer.setMeasurement(Measurements.MEAN, true);
    Analyzer.setMeasurement(Measurements.MIN_MAX, true);
    Analyzer.setMeasurement(Measurements.LABELS, true);
    Analyzer.setMeasurement(Measurements.LIMIT, true);

    // load saved data result file
    resultFile = new File(IMAGE_DIR.getAbsolutePath() + "\\results.csv");
    if(resultFile.exists() && !resultFile.isDirectory()) {
        table = ResultsTable.open(resultFile.getAbsolutePath());
        table.show("Results");
    }
}

function data_format() {

    // save raw results
    results = Analyzer.getResultsTable();
    if(results) results.save(IMAGE_DIR.getAbsolutePath() + "\\results.csv");

    // cache result rows
    rowCache = [];
    for(r=0;r<results.getCounter();r++) {
        tmpLabel = results.getLabel(r).split(':');
        if(!rowCache[tmpLabel[0]]) rowCache[tmpLabel[0]] = [];
        rowCache[tmpLabel[0]][tmpLabel[1]] = r;
    }

    // preprocess naming data
    tmpAnimal = IMAGE_DIR.getParent().split('\\');
    tmpSlice = IMAGE_DIR.getName().split('_');
    tmpSlice = tmpSlice[0].split('#');
    tmpArea = IMAGE_DIR.getName().split('-');

    // create new formatted result data set
    DATA = new ResultsTable();
    animal = tmpAnimal[tmpAnimal.length-1];
    slice = tmpSlice[tmpSlice.length-1];
    area = tmpArea[tmpArea.length-1];

    // create entries in the given area order
    for each(name in [
        ROI_MAP["grey"],
        ROI_MAP["white"],
        ROI_MAP["upper"],
        ROI_MAP["lower"],
        ROI_MAP["cin"],
        ROI_MAP["thal"]
    ]) {

        // check if results for this area exists
        if(rowCache["c1"][name] >= 0) {

            // generate naming fields
            region = area;
            switch(name) {
                case ROI_MAP["grey"]: region+= "-GM"; break;
                case ROI_MAP["white"]: region+= "-WM"; break;
                case ROI_MAP["upper"]: region+= "-UL"; break;
                case ROI_MAP["lower"]: region+= "-LL"; break;
                case ROI_MAP["cin"]: region+= "-CI"; break;
                case ROI_MAP["thal"]: region+= "-VP"; break;
            }

            // add new row
            DATA.incrementCounter();

            // add data to row
            DATA.addValue("animal", animal);
        }
    }
}

```

```

        DATA.addValue("slice", slice);
        DATA.addValue("region", region);
        DATA.addValue("brainArea", results.getValue("Area",
rowCache["c"+CHANNEL_MAP["DAPI"]][name]));
        DATA.addValue("GFAPArea", results.getValue("Area",
rowCache["c"+CHANNEL_MAP["GFAP"]][name]));
        DATA.addValue("GFAPMean", results.getValue("Mean",
rowCache["c"+CHANNEL_MAP["GFAP"]][name]));
        DATA.addValue("IbalArea", results.getValue("Area",
rowCache["c"+CHANNEL_MAP["Ibal"]][name]));
        DATA.addValue("IbalMean", results.getValue("Mean",
rowCache["c"+CHANNEL_MAP["Ibal"]][name]));

        if(rowCache["c"+CHANNEL_MAP["Ki67"]])
            DATA.addValue("Ki67", results.getValue("Ki67",
rowCache["c"+CHANNEL_MAP["Ki67"]][name]));
    }
}

// save formatted data
DATA.save(IMAGE_DIR.getAbsolutePath() + "\\data.csv");

// show formatted data results
Analyzer.setResultsTable(DATA);
DATA.show("Results");
}

function data_close() {

    // close raw result window
    Analyzer.setUnsavedMeasurements(false);
    win = ResultsTable.getResultsWindow();
    if(win) win.close();
}

// ##### IMAGE MANIPULATION ##### //

function openImage(path) {

    // check if the file exists
    tmpFile = new File(path);
    if(tmpFile.exists() && !tmpFile.isDirectory()) {

        // open and show image
        img = IJ.openImage(path);
        if(img != null) img.show();
        return img;
    }

    return null;
}

function vCombine(uImage, lImage) {

    // combine images vertically if both are available
    if(uImage != null && lImage != null)
        IJ.run(uImage, "Combine...", "stack1=[" + uImage.getTitle() + "] stack2=[" +
lImage.getTitle() + "] combine");
}

function getCombinedChannel(channel) {

    // open images
    uImage = openImage(IMAGE_DIR.getAbsolutePath() + "\\\" + UPPER_NAME + "_c" + channel +
".tif");
    lImage = openImage(IMAGE_DIR.getAbsolutePath() + "\\\" + LOWER_NAME + "_c" + channel +
".tif");

    // check if both images are loaded
    if(uImage != null && lImage != null) {

        // combine images
        vCombine(uImage, lImage);
    }
}

```

```

// rename and convert iamge to 32-bit
IJ.run("32-bit");
tmpImage = IJ.getImage();
tmpImage.setTitle("c" + channel);
tmpImage.changes = false;

// get current global calibration
cal = tmpImage.getGlobalCalibration();
if(cal === null) cal = new Calibration();

// set calibration to suit the confocal resolution in µm
cal.pixelWidth = IMAGE_CAL.scale;
cal.pixelHeight = IMAGE_CAL.scale;
cal.pixelDepth = IMAGE_CAL.stack;
cal.setUnit(IMAGE_CAL.unit);

// apply global calibration
tmpImage.setGlobalCalibration(cal);

return tmpImage;

// notification if a image was not found
} else {
    if(uImage === null) new WaitForUserDialog("Image not found!",
IMAGE_DIR.getAbsolutePath() + "\\\" + UPPER_NAME + "_c" + channel + ".tif").show();
    if(lImage === null) new WaitForUserDialog("Image not found!",
IMAGE_DIR.getAbsolutePath() + "\\\" + LOWER_NAME + "_c" + channel + ".tif").show();
}

return null;
}

// ##### CHANNEL HELPER FUNCTIONS ##### //

function channel_init() {

// combine channel images
if(CHANNEL_COUNT > 0) {
    for(i=1;i<=CHANNEL_COUNT; i++)
        CHANNEL[i] = getCombinedChannel(i);
}

// load threshold settings
thresholdProps = new Properties();
thresholdFile = new File(IMAGE_DIR.getAbsolutePath() + "\\threshold.config");
if(thresholdFile.exists() && !thresholdFile.isDirectory())
    thresholdProps.load(new FileInputStream(thresholdFile));

// store threshold config in cache and apply to images if > 0
for(channel in CHANNEL_MAP) {
    c = CHANNEL_MAP[channel];
    CHANNEL_MIN_THRESHOLD[c] = thresholdProps.getProperty("c"+c+"-min-threshold") || 0;
    if(CHANNEL_MIN_THRESHOLD[c] > 0) {
        proc = CHANNEL[c].getProcessor();
        if(proc !== null) {
            proc.setThreshold(CHANNEL_MIN_THRESHOLD[c], CHANNEL_MAX_THRESHOLD[c],
ImageProcessor.RED_LUT);
            CHANNEL[c].setProcessor(proc);
        }
    }
}
}

function channel_measure() {
    if(CHANNEL_COUNT > 0 && CHANNEL.length > 0) {

// clear previous displayed results
Analyzer.setResultsTable(new ResultsTable());

// prepare particle analyzing
counter = 0;
manager = new RoiManager(false);
ParticleAnalyzer.setRoiManager(manager);

```

```

// measure all channels
for(i=1;i<=CHANNEL_COUNT; i++) {

    // get channel name
    name = "";
    for(tmp in CHANNEL_MAP) if(CHANNEL_MAP[tmp] === i) name = tmp;

    // select channel image
    win = WindowManager.getWindow("c" + i);
    if(win !== null) {

        // bring channel image to the front
        WindowManager.setCurrentWindow(win);

        // measure all automatically generated ROIs
        for(r=0;r<ROI_MNG.getCount();r++) {
            tmpName = ROI_MNG.getName(r);
            if(tmpName.indexOf(" - ") >= 0 &&
                tmpName != ROI_MAP["excl"] &&
                tmpName != ROI_MAP["dia"] &&
                tmpName != ROI_MAP["temp"]) {

                // measure roi
                ROI_MNG.select(r);
                ROI_MNG.runCommand("Measure");

                // count cells
                if(CHANNEL_CELLS[i] === true) {

                    // analyze particles
                    ParticleAnalyzer.setRoiManager(manager);
                    IJ.run(IJ.getImage(), "Analyze Particles...", "size=10-100 circularity=0.25-
1.00 show=Nothing add");

                    // add counter to results
                    count = manager.getCount() - counter;
                    Analyzer.getResultsTable().addValue(name, count);
                    counter = manager.getCount();
                    Analyzer.getResultsTable().show("Results");
                }
            }
        }
    }
}

// close temporary used roi manager
manager.close();

// format data result table
data_format();

// wait for the user
new WaitForUserDialog("Ready...", "All measurements are done!").show();
}
}

function channel_close() {
    if(CHANNEL_COUNT > 0 && CHANNEL.length > 0) {

        // close all open channel images
        for(i=1;i<=CHANNEL_COUNT; i++) {
            if(CHANNEL[i] != null) {
                CHANNEL[i].changes = false;
                CHANNEL[i].close();
            }
        }

        // save threshold config
        thresholdProps = new Properties();
        for(channel in CHANNEL_MAP) thresholdProps.setProperty("c"+CHANNEL_MAP[channel]+"-
min-threshold", CHANNEL_MIN_THRESHOLD[CHANNEL_MAP[channel]]);
        thresholdProps.store(new FileOutputStream(new File(IMAGE_DIR.getAbsolutePath() +
"\\threshold.config")), "MIN CHANNEL THRESHOLD");
    }
}

```

```

    }
}

// ##### ROI HELPER FUNCTIONS ##### //

function roi_init() {

    // open the ROI manager and try to load existing data
    ROI_MNG = new RoiManager();
    roiFile = new File(IMAGE_DIR.getAbsolutePath() + "\\ROI.zip");
    if(roiFile.exists() && !roiFile.isDirectory())
        ROI_MNG.runCommand("Open", roiFile.getAbsolutePath());

    // start roi management
    roi_manage();
}

function roi_close() {
    if(ROI_MNG !== null) {

        // save ROI entries
        if(ROI_MNG.getCount() > 0)
            ROI_MNG.runCommand("Save", IMAGE_DIR.getAbsolutePath() + "\\ROI.zip");

        // close ROI manager
        ROI_MNG.close();
    }
}

function roi_cache() {
    if(ROI_MNG !== null &&
        ROI_CACHE !== null &&
        ROI_CACHE.auto !== null &&
        ROI_CACHE.manual !== null &&
        ROI_CACHE.excludes !== null) {

        // sort all entries before building cache
        ROI_MNG.runCommand("Sort");

        // reset roi cache
        ROI_CACHE = {
            auto: [],
            manual: [],
            excludes: []
        }

        // check all roi entries
        for(r=0;r<ROI_MNG.getCount();r++) {
            tmpName = ROI_MNG.getName(r).toLowerCase();

            // get automatic generated entries
            autoFound = false;
            if(tmpName.indexOf(" - ") >= 0) {
                for(var name in ROI_MAP) {
                    if(tmpName.indexOf(ROI_MAP[name].toLowerCase()) >= 0) {
                        ROI_CACHE.auto[name] = r;
                        autoFound = true;
                        break;
                    }
                }
            }
            if(autoFound) continue;
        }

        // check if any tag matches the entry name
        manualFound = false;
        if(!autoFound) {
            for(t=0;t<ROI_TAGS.length;t++) {
                if(tmpName.indexOf(ROI_TAGS[t].toLowerCase()) >= 0) {
                    if(tmpName.indexOf("_") !== 0) roi_rename(r, "_" + tmpName);
                    ROI_CACHE.manual[ROI_TAGS[t]] = r;
                    manualFound = true;
                    break;
                }
            }
        }
    }
}

```

```

        if(manualFound) continue;
    }

    // if no tag was found, mark entry as an exclude
    if(!autoFound && !manualFound) {
        if(tmpName.indexOf("exclude: ") !== 0) roi_rename(r, "exclude: " + tmpName);
        ROI_CACHE.excludes[ROI_CACHE.excludes.length] = r;
    }
}
}
}

function roi_manage() {
    if(ROI_MNG !== null) {

        // build roi current cache
        roi_cache();

        // select all auto entries
        selection = [];
        for(var name in ROI_MAP)
            if(ROI_CACHE.auto[name] >= 0)
                selection[selection.length] = ROI_CACHE.auto[name];

        // delete all auto entries
        if(selection.length > 0) {
            ROI_MNG.setSelectedIndexes(selection);
            ROI_MNG.runCommand("Delete");
        }

        roiContinue = false;
        while(!roiContinue) {

            // preview thresholds, so that the user could add proper excludes
            roiDialog = new NonBlockingGenericDialog("ROI Setup");
            roiDialog.addMessage("Please add/adjust all of the ROIs...");
            roiDialog.addMessage("Settings:");
            for(c=1;c<=CHANNEL_COUNT;c++)
                for(var name in CHANNEL_MAP)
                    if(c == CHANNEL_MAP[name]) {
                        roiDialog.addSlider(name, 0, 255, CHANNEL_MIN_THRESHOLD[c]);
                        roiDialog.addCheckbox("count "+name+"-cells ", false);
                    }
                //roiDialog.addNumericField(name, CHANNEL_MIN_THRESHOLD[c], 0);
            roiDialog.addDialogListener(new DialogListener() {
                dialogItemChanged : function(d, e) {

                    // event function triggered correctly
                    if(d !== null && e !== null) {
                        source = e.getSource();

                        // its a checkbox
                        if(typeof source.getLabel === 'function')
                            CHANNEL_CELLS[CHANNEL_MAP[source.label.split(" ")[1].split('-')[0]] =
                                source.state;

                        // its a textbox
                        if(typeof source.getText === 'function') {

                            // check if the input is an integer
                            value = source.getText();
                            if(!value.matches("\\d+")) return false;

                            // find correct input field
                            c = 0;
                            inputs = d.getNumericFields();
                            for(i=0;i<inputs.length;i++) {
                                if(inputs[i] === e.getSource()) {
                                    c = i+1;
                                    break;
                                }
                            }
                            if(c === 0) return false;
                        }
                    }
                }
            });
        }
    }
}

```

```

// if DAPI channel was detected, denie threshold adjustments
if(CHANNEL_MAP["DAPI"] === c) return true;

// bring channel image to the front, if not focused
if(!CHANNEL_FOCUS[c]) {

    // track focus
    for(channel in CHANNEL_MAP) CHANNEL_FOCUS[channel] = false;
    CHANNEL_FOCUS[c] = true;

    // bring image to front and focus the dialog again after
    win = WindowManager.getWindow("c" + c);
    if(win !== null) win.toFront();
    d.toFront();
}

// set new threshold
CHANNEL_MIN_THRESHOLD[c] = value;
proc = CHANNEL[c].getProcessor();
if(proc !== null) {
    proc.setThreshold(CHANNEL_MIN_THRESHOLD[c], CHANNEL_MAX_THRESHOLD[c],
ImageProcessor.RED_LUT);
    CHANNEL[c].setProcessor(proc);
}
}

return true;
}
});
roiDialog.hideCancelButton();
roiDialog.showDialog();
roiDialog.dispose();

// rebuild roi current cache
roi_cache();

// ROI: cingulum
roi_process("cin", "XOR", ["cin", "white"]);

// ROI: whitematter
roi_process("white", "Combine", ["white", "cin"]);

// ROI: greymatter
roi_process("grey", "XOR", ["cor", "white"]);

// ROI: upper
roi_process("upper", "XOR", ["cor", "lower"]);

// ROI: lower
roi_process("lower", "XOR", ["lower", "white"]);

// ROI: thal
roi_process("thal", "XOR", ["thal", "white"]);

// ROI: cortex
roi_process("cor", null, null);

// ROI: diameter
roi_process("dia", null, null);

// refresh cache
roi_cache();

// exlude unknown area from all automatically generated entries
roi_exclude();

// check ROIs before exiting the managment
roiCheckDialog = new NonBlockingGenericDialog("ROI Missing");
roiCheckDialog.setOKLabel("ROIs correct!");
roiCheckDialog.setCancelLabel("Make changes");
roiCheckDialog.addMessage("Please check once more if all ROIs are correct...");
roiCheckDialog.showDialog();
roiContinue = !roiCheckDialog.wasCanceled();

```

```

        roiCheckDialog.dispose();
    }
}

function roi_add(name) {
    if(ROI_MNG !== null && name !== null) {

        // add current ROI selection
        ROI_MNG.runCommand("add");

        // select new entry and rename
        newIndex = ROI_MNG.getCount()-1;
        roi_rename(newIndex, name);

        return newIndex;
    }

    return null;
}

function roi_delete(index) {
    if(ROI_MNG !== null && index >= 0) {

        // select entry and delete
        ROI_MNG.select(index);
        result = ROI_MNG.runCommand("Delete");

        // update cache
        roi_cache();
    }
}

function roi_rename(index, name) {
    if(ROI_MNG !== null && index >= 0) {

        // select entry and rename
        ROI_MNG.select(index);
        result = ROI_MNG.runCommand("Rename", name);
    }
}

function roi_process(name, cmd, comp) {
    if(ROI_MNG !== null && ROI_CACHE !== null && name !== null) {
        if(cmd !== null && comp !== null && comp.length > 1) {

            // check if requested manual roi entries exists and build index array for selection
            selection = [];
            for(c=0;c<comp.length;c++) {
                if(ROI_CACHE.auto[comp[c]] >= 0) {
                    selection[selection.length] = ROI_CACHE.auto[comp[c]];
                } else {
                    if(ROI_CACHE.manual[comp[c]] >= 0) {
                        selection[selection.length] = ROI_CACHE.manual[comp[c]];
                    } else {
                        if(c == 0) return;
                    }
                }
            }

            // run command, if more then one component was detected
            if(selection.length >= 2) {

                // select all entries in the new selection array
                ROI_MNG.setSelectedIndexes(selection);

                // run bulk command
                ROI_MNG.runCommand(cmd);

                // add new entry
                newIndex = roi_add(name);
                roi_rename(newIndex, ROI_MAP[name]);
                ROI_CACHE.auto[name] = newIndex;
            }
        }
    }
}

```

```

        return;
    }
}

// if no cmd was executed, just process the entry
if(ROI_CACHE.manual[name] != null && ROI_CACHE.manual[name] >= 0) {
    ROI_MNG.select(ROI_CACHE.manual[name]);
    roi_rename(roi_add(name), ROI_MAP[name]);
}
}

function roi_exclude() {
    if(ROI_MNG != null) {

        // check all roi entries for excludes
        ROI_CACHE.excludes = [];
        for(r=0;r<ROI_MNG.getCount();r++) {
            tmpName = ROI_MNG.getName(r).toLowerCase();

            // delete main exclude field, if found
            if(tmpName.indexOf(ROI_MAP["excl"].toLowerCase()) >= 0) {
                ROI_MNG.select(r);
                ROI_MNG.runCommand("Delete");
                r--;
                continue;
            }

            // skip all automatically named fields
            if(tmpName.indexOf(" - ") != 1) {

                // check if there is a tag matching for this entry
                tagFound = false;
                for(t=0;t<ROI_TAGS.length;t++) {
                    if(tmpName.indexOf(ROI_TAGS[t].toLowerCase()) >= 0) {
                        tagFound = true;
                        break;
                    }
                }

                // if no tag was identified, exclude this entry from all measurements
                if(!tagFound) ROI_CACHE.excludes[ROI_CACHE.excludes.length] = r;
            }
        }

        // combine all untagged fields to 'excludes'
        if(ROI_CACHE.excludes.length > 0) {
            if(ROI_CACHE.excludes.length > 1) {
                ROI_MNG.setSelectedIndexes(ROI_CACHE.excludes);
                ROI_MNG.runCommand("Combine");
                ROI_CACHE.auto["excl"] = roi_add(ROI_MAP["excl"]);
            } else {
                ROI_MNG.select(ROI_CACHE.excludes[0]);
                ROI_CACHE.auto["excl"] = roi_add(ROI_MAP["excl"]);
            }
        }

        // update cache after combining excludes
        roi_cache();

        // only run, if excludes have been detected
        if(ROI_CACHE.excludes.length > 0 && ROI_CACHE.auto["excl"] != null) {
            var entries = ROI_MNG.getCount();
            var img = IJ.getImage();

            // look for automatically named entries
            for(var name in ROI_MAP) {

                // skip excludes, diameter and temporary
                if(ROI_MAP[name] == ROI_MAP["excl"] ||
                    ROI_MAP[name] == ROI_MAP["dia"] ||
                    ROI_MAP[name] == ROI_MAP["temp"]) continue;

                // check all roi entries

```

```
for(r=1;r<entries;r++) {
    tmpName = ROI_MNG.getName(r).toLowerCase();
    if(tmpName.indexOf(ROI_MAP[name].toLowerCase()) >= 0 &&
tmpName.indexOf("exclude") == -1) {

        // get area that is excluded within the entry
        ROI_MNG.setSelectedIndexes([0, r]);
        ROI_MNG.runCommand("AND");

        // check if there is a combined selection to exclude
        if(img.getRoi() != null) {
            newIndex = roi_add(ROI_MAP["temp"]);

            // apply excludes to entry
            ROI_MNG.setSelectedIndexes([r, ROI_MNG.getCount()-1]);
            ROI_MNG.runCommand("XOR");
            roi_add(ROI_MAP[name]);

            // delete temp and old entry
            ROI_MNG.setSelectedIndexes([r, ROI_MNG.getCount()-2]);
            ROI_MNG.runCommand("Delete");

            entries --;
        }
        break;
    }
}

// sort and update cache one last time
roi_cache();
}
```