

Aus der Orthopädischen Universitätsklinik Stiftung Friedrichsheim
der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main
Direktor: Prof. Dr. med. I. Marzi

und

der Dr. Senckenbergischen Anatomie
Institut für Anatomie II des Fachbereichs Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main
Direktor: Prof. Dr. med. H.-W. Korf

**Neuroprotektive Effekte des Immunsuppressivums MMF:
Studien zur retrograden Markierung des Tractus perforans
in der organotypischen hippocampalen Schnittkultur**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

vorgelegt von
Tilman Oest
aus Bielefeld

Frankfurt am Main, 2009

Dekan: Prof. Dr. J. Pfeilschifter
Referent: PD Dr. N. Hailer
Korreferent: Prof. Dr. H.-W. Korf

Tag der mündlichen Prüfung: 26.11.2010

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	1
Zusammenfassung	5
Summary	7
1 Einleitung	9
1.1 Die Verletzung des Rückenmarks: Epidemiologie und pathophysiologische Abläufe _____	9
1.2 Die Rolle von Mikrogliazellen im intakten und geschädigten ZNS __	12
1.2.1 Die Therapie bei spinalem Trauma _____	14
1.2.2 Pharmakologische Beeinflussung von Mikrogliazellen durch MMF _	17
1.3 Methodische Grundlagen _____	18
1.3.1 Der Tractus perforans: Ein Fasertrakt innerhalb der hippocampalen Formation _____	18
1.3.2 Die Organotypische Hippocampale Schnittkultur (OHSC) _____	18
1.3.3 Neuroanatomische Färbemethoden von Nervenfasern _____	19
1.3.4 Verschiedene Möglichkeiten der Markierung des Tractus perforans	23
1.3.5 Neuronale Marker _____	24
1.4 Zielsetzung und Fragestellung der folgenden Untersuchungen ____	25
1.4.1 Erste Arbeitshypothese _____	26
1.4.2 Zweite Arbeitshypothese _____	26
2 Material und Methoden	28
2.1 Verwendete Materialien _____	28
2.1.1 Grundsubstanzen und Lösungen _____	28

2.1.2	Antikörper und Tracer	29
2.1.3	Puffer	29
2.1.4	Geräte und Programme	30
2.2	Medien für die Präparation und Kultivierung von Schnittkulturen	30
2.2.1	Präparationsmedium	30
2.2.2	Kulturmedium	31
2.3	Herstellung von organotypischen hippokampalen Schnittkulturen (OHSC)	31
2.3.1	Herstellung des Präparationsagars	31
2.3.2	Ausstattung des Arbeitsplatzes	32
2.3.3	Präparation der OHSC	33
2.4	Experimentelle Gruppen	35
2.5	Fixierung der Schnittkulturen	35
2.6	Färbemethoden	36
2.6.1	Hämatoxylinfärbung	36
2.6.2	Retrograde Markierung des Tractus perforans mit Dil	36
2.6.3	NeuN-Färbung	37
2.6.4	Dil/NeuN Doppelfärbung	38
2.7	Auswertung	38
2.7.1	Darstellung der retrograden Markierung des Tractus perforans	38
2.7.2	Erfassung Dil-NeuN doppelmarkierter Zellen und Dil gefärbter Axone	39
2.7.3	Statistische Methoden	39

2.8	Versuche zur retrograden Markierung des Tractus perforans mit Mini Ruby _____	40
2.8.1	Mini Ruby _____	40
2.8.2	Versuchsmodell _____	40
2.8.3	Experimentelle Gruppen _____	40
2.8.4	Retrograde Markierung des Tractus perforans mit Mini Ruby _____	41
2.8.5	Fixierung _____	41
2.8.6	Herstellung von Gefrierschnitten der fixierten Kulturen _____	41
2.8.7	Färbung der Gefrierschnitte mittels Histochemie _____	42
2.8.8	Auswertung _____	43
3	Ergebnisse _____	44
3.1	Zytoarchitektur der OHSC _____	44
3.2	Retrograde Anfärbung des Tractus perforans mit Dil _____	44
3.3	Doppelfärbung entorhinaler Neurone durch retrograde Anfärbung mit Dil und Gegenfärbung mit NeuN _____	45
3.4	Einfluss von Mofetil auf die Anzahl doppelmarkierter Neurone im entorhinalen Kortex _____	48
3.5	Versuch der retrograden Markierung des Tractus perforans mit Mini Ruby in lebenden OHSC _____	48
4	Diskussion _____	50
4.1	Erfolgreiche retrograde Markierung des Tractus perforans mit Dil _____	50
4.2	Diffusionswege von Dil _____	50

4.3	Identifizierung retrograd mit Dil angefärbter entorhinaler Neurone mit dem Antikörper NeuN _____	52
4.4	Mofetil führt zu einer erhöhten Anzahl doppelmarkierter Neurone im entorhinalen Kortex _____	53
4.5	Rolle der Mikrogliazellen und Makrophagen nach Schädigung des ZNS _____	54
4.6	Versuche der retrograden Markierung des Tractus perforans mit Mini Ruby _____	60
4.7	Schlussfolgerung und Ausblicke _____	60
5	Anhang _____	62
5.1	Abbildungen _____	62
5.2	Abkürzungsverzeichnis _____	83
5.3	Literaturverzeichnis _____	84
5.4	Danksagung _____	105
5.5	Ehrenwörtliche Erklärung _____	106

Zusammenfassung

Mycophenolat-Mofetil (MMF) hemmt die Aktivität von Mikrogliazellen und verringert den exzitotoxischen neuronalen Schaden in organotypischen hippocampalen Schnittkulturen (OHSC). Der Tractus perforans ist die wichtigste neuronale afferente Verbindung zwischen entorhinalem Kortex (EC) und Gyrus dentatus (GD) im Hippocampus. Er besteht aus Axonen, deren Ursprungsneurone im EC liegen und die im GD terminieren. Ziel dieser Arbeit war es, die Wirkung von MMF auf den Erhalt dieser Projektion zu untersuchen.

Methodisch wurde zu diesem Zweck die Fluoreszenzmarkierung des Tractus perforans in der organotypischen hippocampalen Schnittkultur (OHSC) etabliert. Die von uns angestrebte retrograde Färbemethode sollte entorhinale Neurone unter der Voraussetzung markieren, dass deren Axone (Tractus perforans) intakt waren. Ein guter neuronaler Erhalt sollte sich in einem entsprechend erhaltenen Tractus perforans und retrograd markierten entorhinalen Neuronen widerspiegeln.

OHSC aus 8 Tage alten Wistar Ratten wurden für 9 div (days in vitro) mit oder ohne MMF (100µg/ml) kultiviert. Zunächst wurde methodisch die retrograde Markierung des Tractus perforans mit dem lipophilen Farbstoff Dil (1,1'-Diocetadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindo-carbocyaninperchlorat) in der OHSC etabliert und mit dem hydrophilen Dextranamin Mini Ruby versucht. Die retrograde Markierung entorhinaler Neurone und die durchgängige Darstellung des Tractus perforans in der OHSC mit Mini Ruby gelang in unseren Versuchen nicht, während die Markierung mit Dil erfolgreich war.

Nach der Fixierung wurde die retrograde Markierung des Tractus perforans durch das Platzieren eines Dil-Kristalles im GD eingeleitet. Die auf diese Weise mit Dil markierten entorhinalen Neurone wurden mit neuronenspezifischen Antikörpern gegen NeuN gegengefärbt und somit zweifelsfrei als Neurone identifiziert. An diesem Modell wurde der Einfluß von MMF auf die Zahl Dil/NeuN doppelmarkierter entorhinaler Neurone quantitativ ausgewertet. Die quantitative Analyse erfolgte an Bildern, die mit einem konfokalen Laser Scanning Mikroskop gewonnen wurden.

Die quantitative Auswertung retrograd mit Dil markierter OHSC zeigte, dass die Anzahl der Dil-NeuN doppelmarkierten entorhinalen Neurone in den MMF behandelten OHSC 19fach höher war als in den unbehandelten OHSC ($p < 0,05$). Unsere Ergebnisse zeigen, dass MMF den Erhalt ganzer neuronaler Fasertrakte und Projektionen in der OHSC verbessert. Vor dem Hintergrund vorhandener Arbeiten, die auf neuroprotektive Effekte der MMF deuten, scheint MMF ein aussichtsreicher Kandidat für die Reduzierung des Sekundärschadens im Rahmen von Verletzungen des zentralen Nervensystems zu sein.

Summary

Previous studies with excitotoxically lesioned organotypic hippocampal slice cultures (OHSC) have revealed that the immunosuppressant mycophenolate-mofetil (MMF) inhibits microglial activation and suppresses neuronal damage. The perforant path provides the connection between the entorhinal cortex (EC) and the dentate gyrus (DG) in the hippocampus. It is an afferent projection originating in the entorhinal cortex and terminating in the molecular layer of the dentate gyrus. We here investigated whether MMF exerts beneficial effects on axon survival in a long-range projection, the perforant path.

We first established retrograde fluorescent labeling of the perforant path inside the OHSC. This method labels entorhinal neurons if their axons are intact. Consequently neuronal and perforant path preservation should result in retrograde labeling of entorhinal neurons.

OHSC were obtained from 8-day-old Wistar rats and cultured for 9 days in vitro with or without MMF (100µg/ml). We first established retrograde labeling of the perforant path with the lipophilic dye Dil (1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindo-carbocyanine perchlorate) inside OHSC and also attempted a retrograde labeling with the hydrophilic dye Mini Ruby. The retrograde labeling of entorhinal neurons and the perforant path with Dil was successful whereas retrograde labeling with Mini Ruby failed. We then analysed the effects of MMF on the number of Dil/NeuN double-labeled entorhinal neurons.

After fixation, the perforant path was retrogradely labeled by application of the fluorescent dye Dil in the hilus of the DG, and neuronal perikarya were

immunohistochemically stained with the neuron-specific antibody anti-NeuN to identify entorhinal neurons. Analysis of Dil-labeled and NeuN-stained OHSC by confocal laser scanning microscopy revealed double-labeled neurons in the entorhinal cortex which projected to the dentate gyrus via the perforant path. Quantitative analysis showed that the number of double-labeled neurons was 19-fold higher in OHSC treated with MMF than in control cultures ($p < 0,05$).

Our findings indicate that MMF treatment improves preservation of long-range projections in the OHSC such as the perforant path. In accordance with recent studies that showed neuroprotective effects of MMF, this agent could prove to be an interesting candidate for treatment of secondary damage after lesions of the central nervous system.

1 Einleitung

1.1 Die Verletzung des Rückenmarks: Epidemiologie und pathophysiologische Abläufe

Die Möglichkeit der kontrollierten Bewegung und der fehlerfreie Ablauf vegetativer Funktionen sind an die unversehrte Kontinuität des Rückenmarks gebunden. Schädigungen durch Kompression oder Durchtrennung führen zu Einschränkungen oder dem totalen Verlust dieser Funktionen. Ein Patient mit entsprechenden Verletzungen hat lebenslang mit den Folgen eines solchen Traumas zu kämpfen und ist auf umfangreiche Hilfe im täglichen Leben sowie lebenslange medizinische Nachsorge aufgrund begleitender Morbidität angewiesen. Eine Wiedererlangung früherer motorischer Fähigkeiten ist trotz heute bekannter Behandlungsmethoden nicht zu erwarten. Ein traumatisches Geschehen ist in 75% der Fälle für eine Querschnittlähmung verantwortlich, wobei Verkehrsunfälle, häusliche Unfälle und Sportunfälle in der genannten Reihenfolge ursächlich sind. Das Durchschnittsalter der in der Mehrzahl männlichen Verunglückten liegt bei 35 Jahren. Bei ca. 50.000 Querschnittgelähmten in Deutschland und 1500 Neuerkrankungen pro Jahr wiesen 62% der Betroffenen eine Paraplegie und 38% eine Tetraplegie auf (Deutsche Stiftung Querschnittlähmung, 2002).

Die traumatische Rückenmarkverletzung resultiert in pathophysiologischen Veränderungen, die einen Zeitraum von wenigen Minuten bis Jahren nach der Verletzung umfassen (Schwab et al., 1996). Diese Zeitspanne lässt sich in mehrere Phasen unterteilen: In der akuten Phase entsteht der Primärschaden,

diesem folgt unmittelbar ein sogenannter Sekundärschaden. Daran schließt sich ein chronisches Stadium an (Hulsebosch et al., 2002; Tator et al., 1995).

Der Primärschaden entsteht durch die Gewalteinwirkung zum Zeitpunkt des Unfalls. Die pathophysiologischen Abläufe beginnen mit der mechanischen Schädigung der Fasertrakte, gefolgt von einer Minderdurchblutung des komprimierten Gebietes, die zu einer ischämischen Schädigung des Gewebes (Sandler et al., 1976) und einem Ödem führt. Metabolische Störungen umfassen eine intraneuronale Kalzium-Akkumulation und einen Anstieg der extrazellulären Kalium-Konzentration (Schwab et al., 1996). Diese Veränderungen bedingen eine gestörte Funktion der Neurone, die in einen spinalen Schock (Rita et al., 1993) mündet, der einen Zeitraum von Tagen (bei Versuchstieren) bis Wochen (bei Menschen) umspannt. Minuten bis Wochen nach der Rückenmarkverletzung entstehende Gewebeschäden, die über den mechanischen Primärschaden hinausgehen, werden unter der Bezeichnung „Sekundärschaden“ zusammengefasst.

Im Rahmen des Sekundärschadens kommt es zu einer verstärkten Produktion freier Radikale, Stickstoffmonoxid (NO) und einer erhöhten Ausschüttung erregender Neurotransmitter wie Glutamat. Immunkompetente Zellen werden aus der Peripherie rekrutiert und ortsständige immunkompetente Zellen, die Mikrogliazellen, werden aktiviert. So wandern neutrophile Granulozyten 6-24 Stunden nach Schädigung, Makrophagen 24 Stunden bis 2 Wochen nach der Verletzung und T-Zellen mit einem Höhepunkt um den ersten bis zweiten Tag in das geschädigte ZNS ein (Bethea et al., 2002; Schnell et al., 1999). Zu der

Nekrose primär geschädigter Neurone kommt durch die Einwirkung dieser Faktoren ein apoptotischer Zelltod.

Eine wichtige Rolle bei der Entstehung des Sekundärschadens spielt die inflammatorische Reaktion. Speziellen Adhäsionsmolekülen kommt bei der Rekrutierung hämatogener Zellen eine besondere Bedeutung zu. Die endotheliale Expression dieser Moleküle ermöglicht die Migration von Leukozyten aus dem Gefäßsystem. Der Prozess der Einwanderung beginnt mit der Bindung von Leukozyten an das Endothel der Blutgefäße. Die Bindungsfunktion übernehmen Glykoproteine auf der Leukozytenoberfläche und endotheliale Selektine, durch die ein sogenanntes „Roller“ der Leukozyten entlang des Endothels ermöglicht wird. Eine festere Bindung an das Endothel entsteht durch die Anlagerung von dem auf der Leukozytenoberfläche exprimierten Integrin Leukocyte Function Antigen (LFA)-1 an das Intercellular Adhesion Molecule (ICAM)-1 der Endothelien. Abschließend kommt es zu einer Diapedese der Zellen durch das Endothel und zu einer durch Chemokine gesteuerten Migration in das Läsionsgebiet (Hamada et al., 1996).

Im Anschluß an die Primär- und Sekundärschädigung nach spinalem Trauma folgt eine chronische Phase der Schädigung. Diese erstreckt sich von einigen Tagen bis Jahren nach dem Trauma. Sie beinhaltet einen fortlaufenden apoptotischen Zelluntergang, verminderte Ionen-Kanal- und Rezeptorfunktion sowie eine die Wallersche Degeneration begleitende Demyelinisierung und Vernarbung.

Nach ZNS-Verletzung ist die Formation einer Glianarbe zu beobachten. Diese Glianarbe ist eine Struktur, an deren Entstehung verschiedene Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten beteiligt sind. Die ersten Zellen, die innerhalb weniger Stunden im Bereich der Verletzung aktiv werden, sind Mikrogliazellen aus dem umgebenden ZNS-Gewebe. Nach 3-5 Tagen wandern Oligodendrozytenvorläufer aus dem benachbarten ZNS-Gewebe und meningeale Zellen in die Verletzungszone ein, um offen exponiertes ZNS-Gewebe zu bedecken. Anschließend formiert sich die endgültige, hauptsächlich aus Astrozyten bestehende Glianarbe. Diese Astrozyten zeigen eine langsame Migration in den Verletzungsbereich und füllen verletzungsbedingte Gewebelücken in Form eines Netzwerkes aus (Fawcett et al., 1999).

1.2 Die Rolle von Mikrogliazellen im intakten und geschädigten ZNS

Die heute etablierte Theorie beschreibt, dass sich die Mikrogliazellen aus dem hämatopoetischen Zellsystem, nämlich aus zirkulierenden Monozyten oder pluripotenten monozytischen Vorläuferzellen, ableiten. Die Abnahme der Zahl amöboider, aus dem Blut stammenden Zellen, begleitet von der Zunahme der Zahl ramifizierter Mikrogliazellen während der ersten Wochen nach der Geburt weist auf eine Verwandlung amöboider Zellen in ortsständige Mikrogliazellen hin (Ling et al., 1993).

Das größte Problem bei der Entwicklung einer einheitlichen Theorie über die Herkunft der Mikroglia ist der Mangel an spezifischen Markern für Mikrogliazellen. Diese Marker markieren residente Mikrogliazellen und periphere Makrophagen (Drager et al., 1983; Hume et al., 1983; Mathew et al., 1983). Dies

liegt an der Tatsache, dass Mikrogliazellen die meisten ihrer Oberflächenmoleküle mit peripheren Makrophagen teilen (Flaris et al., 1993). Dazu gehören MHC-Klasse-1 und -2 Moleküle (Suzumura et al., 1987; Akiyama et al., 1988) sowie Fc-Rezeptoren und Rezeptoren für Komplement Typ 3 (Perry et al., 1988).

Wie oben erwähnt, verfügen Mikrogliazellen über Oberflächenmoleküle und Rezeptoren, um Aufgaben der Antigenpresentation und Zell-zu-Zell Kommunikation übernehmen zu können. Mikrogliazellen haben die Fähigkeit, schnell auf pathologische Vorgänge im ZNS zu reagieren. Es kommt zu einer Veränderungen der Morphologie, zur Proliferation, zur Expression von Oberflächenmolekülen und zur Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen. Aktivierte Mikrogliazellen entwickeln eine amöboide Form mit gröberen, weniger ramifizierten Zellfortsätzen, begleitet von verstärkter Chemokin-Rezeptor (CR)-3 Expression und hochregulierten MHC Klasse 1-2 Antigenen auf der Zelloberfläche, welche eine Interaktion mit T-Zellen ermöglichen (Hickey et al., 1988).

Ähnlich wie Makrophagen produzieren aktivierte Mikrogliazellen verschiedene, teilweise zytotoxisch wirkende Faktoren. Dazu gehören Sauerstoffradikale, Stickstoffmonoxid (NO), proteolytische Enzyme sowie proinflammatorisch wirkende Zytokine wie Tumornekrosefaktor (TNF)- α und Interleukin (IL)-1 (Banati et al., 1993; Renno et al., 1995; Kreutzberg et al., 1996; Chabot et al., 1997). Die Fähigkeit von Mikrogliazellen, sich in Phagozyten umzuwandeln, ermöglicht ihnen, Reste von untergegangenen Neuronen oder Axonen aufzunehmen.

1.2.1 Die Therapie bei spinalem Trauma

Erste Maßnahmen nach spinalem Trauma sind die Stabilisierung und Wiederherstellung der natürlichen Morphologie des Wirbelkanals sowie die Dekompression des verletzten Rückenmarksegments. In Folge des oben erwähnten spinalen Schocks kommt es initial zu einer Bradykardie, der Blutdruck fällt und das Herzminutenvolumen nimmt ab. Diese klassischen Zeichen eines Schocks erfordern die notfallmäßige Stabilisierung der Herzkreislauffunktionen des Verletzten.

Die medikamentöse Therapie des spinalen Traumas sollte in den ersten Stunden nach dem Unfallereignis einsetzen. Bis vor wenigen Jahren wurde die Gabe nach Rückenmarkverletzungen empfohlen: Die National Acute Spinal Cord Injury Studies (NASCIS) 1 bis 3 zeigten, dass eine intravenöse Bolusgabe von 30 mg/kg/KG (Körpergewicht) Methylprednisolon und eine Verabreichung von 5,4 mg/kg/KG (Körpergewicht) Methylprednisolon pro Stunde für 23 Stunden eine neurologische Verbesserung bewirkt, wenn die Behandlung innerhalb der ersten 8 Stunden nach der Verletzung begonnen wird (Bracken et al., 1997; Bracken et al., 2001). Der Wirkmechanismus der Kortikosteroide wird allerdings kontrovers diskutiert. Da der Serum-Kortisol-Spiegel in den ersten 24 Stunden nach spinalem Trauma abfällt, haben Kortikosteroidgaben eine normalisierende Wirkung auf Plasma-Glukose und Elektrolyte (Lewin et al., 1974). Membranstabilisation und die Verhinderung der Lipidperoxidation sollen zu den wichtigsten Mechanismen der Neuroprotektion durch Methylprednisolon gehören (Hall et al., 1993; Hall et al., 1992). Steroide haben eine stark

antiinflammatorische Wirkung und sind in der Lage, spinale Ödeme zu verringern (Lewin et al., 1974).

Einschränkend muß erwähnt werden, dass die Verbesserung der motorischen Funktion durch diese Behandlung minimal ist. Aktuelle Untersuchungen stellen den relativ geringen Nutzen des Kortisonschemas den ausgeprägten Nebenwirkungen, wie Wundinfektionen, Lungenembolien und Sepsis einer hochdosierten Kortisontherapie gegenüber. Sie geben zu bedenken, dass diese Therapieform möglicherweise insgesamt mehr schadet als klinisch messbare Vorteile bringt. Die Beweislage für den direkten positiven Nutzen der Kortisontherapie unter Berücksichtigung der Wiedererlangung sensibler und motorischer Fähigkeiten nach spinalem Trauma ist gering und gilt nur für Patienten mit Rückenmarkverletzung, die diese Therapie innerhalb der ersten 8 Stunden erhalten. Verbesserungen der motorischen Fähigkeiten können sich innerhalb eines Jahres nach Verletzung einstellen. Danach ist im Vergleich zu Patienten, die keine Kortisontherapie erhalten, keine motorische Verbesserung erkennbar (Hurlbert et al., 2006).

Eine Vielzahl weiterer immunsuppressiver Ansätze zur Behandlung des spinalen Traumas sind im Tiermodell erprobt worden: So führte die Gabe von Cyclosporin A nach spinaler Läsion zu einer vermehrten axonalen Regeneration und einer reduzierten Lipidperoxidation (Teichner et al., 1993; Diaz-Ruiz et al., 1999). Die Gabe von FK 506 im Tiermodell der spinalen Läsion erhöhte die Axonregeneration und verbesserte die motorische Funktion. In Versuchen wurde Ratten in vivo aufsteigende Nervenbahnen im Bereich des Hinterstranges des

Rückenmarkes durchtrennt und anschließend eine Behandlung mit FK506 durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten, dass unter der Behandlung mit FK506 die Neuaussprossung von Axonen und das Einwachsen über die Läsionsstelle hinaus signifikant zunahm (Bavetta et al., 1999). Andere Versuche untersuchten die Wirkung von FK506 in vitro auf Axonsprossung an Retinakulturen der Ratte und in vivo an Läsionsmodellen des Nervus opticus der Ratte. In beiden Versuchsmodellen konnte nach der Behandlung mit FK 506 eine die Regeneration und Aussprossung von Axonen fördernde Wirkung nachgewiesen werden. Zusätzlich konnte in vivo durch FK 506 die Anzahl abgestorbener retinaler Ganglienzellen signifikant gesenkt werden (Rosenstiel et al., 2003).

Ein weiterer erfolgversprechender Ansatz ist die Verwendung des Interleukin-1-Rezeptorantagonisten. Er hat insbesondere in der Phase der Sekundärschädigung einen entscheidenden Einfluss auf die inflammatorischen Prozesse. Für den Interleukin-1-Rezeptorantagonisten wurde eine hemmende Wirkung auf die Aktivierung der Mikrogliazellen und eine Verminderung neuronaler Schäden nach zerebraler Ischämie im Tiermodell nachgewiesen (Loddick et al., 1997; Lawrence et al., 1998). Zusätzlich zeigte er positive Effekte auf den neuronalen Strukturerhalt im Kontusions-Erschütterungsmodell am Rattenhirn (Toulmond et al., 1995). Besonders erwähnenswert bezüglich des IL-1 Rezeptorantagonisten ist, dass er die Signalwege der zytotoxischen Wirkung zwischen immunkompetenten Zellen hemmen kann.

1.2.2 Pharmakologische Beeinflussung von Mikrogliazellen durch MMF

Dem Ansatz folgend, dass die Hemmung der Mikrogliazellen einen positiven Einfluss auf neuronales Überleben in traumatisiertem neuronalen Gewebe hat, soll hier auf Pharmaka eingegangen werden, die eine spezifische Wirkung auf die Aktivität von Monozyten haben. Dies trifft auf das Immunsuppressivum Mycophenolat-Mofetil zu, welches im klinischen Alltag der Transplantationsmedizin eingesetzt wird. Das inaktive Prodrug Mycophenolat-Mofetil (MMF) wird von Esterasen gespalten und gibt so das immunmodulatorisch wirksame Mycophenolat frei (Allison et al., 1993). MMF ist ein Inhibitor der Inosinmonophosphat (IMP)-Dehydrogenase II leukozytärer Zellen. Dieses Enzym ist entscheidend für die de novo Biosynthese der Purine: Leukozyten sind auf diesen Syntheseweg angewiesen, da sie nicht über die Synthese durch Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase im Salvage Pathway verfügen. Schlussendlich resultiert durch die Wirkung von MMF eine Verringerung des Guanin-Nukleotid-Pools mit folgender Hemmung der DNA-Synthese. Eine antiproliferative Wirkung auf Leukozyten und Monozyten wird damit erreicht (Allison et al., 1996). Ein anderer Mechanismus hemmt die Transferierung von Mannose und Fucose an Glycoproteine. Dadurch werden die Bindungseigenschaften von Adhäsionsmolekülen moduliert (Allison et al., 2001). Versuche, in denen die Bindung von Monozyten und Lymphozyten an Endothelzellen untersucht wurde, zeigten, dass MMF diese zu vermindern vermag (Laurent et al., 1996; Blaheta et al., 1998; Glomsda et al., 2003).

1.3 Methodische Grundlagen

1.3.1 Der Tractus perforans: Ein Fasertrakt innerhalb der hippocampalen Formation

Der Tractus perforans ist die wichtigste extrinsische Afferenz der hippocampalen Formation. Er verbindet den entorhinalen Kortex mit dem Gyrus dentatus. Neurone in Schicht 2 des entorhinalen Kortex senden Axone aus, die in den äußeren zwei Dritteln der Molekularschicht des Gyrus dentatus terminieren. Über den Tractus perforans versorgt der entorhinale Kortex den Hippocampus mit einem Großteil der kortikalen Innervationen (Witter et al., 1989).

Wichtig für Versuche an neuronalen Verschaltungen oder ganzen Fasertrakten ist deren Unversehrtheit nach Präparation von Kulturen. Für die Intaktheit der intrinsischen Verschaltungen des Hippocampus zieht das keine spezielle Einschränkung in der Auswahl der Schnittebenen nach sich (Zimmer et al., 1984). Um jedoch die Vollständigkeit des Tractus perforans in einer komplexen entorhinalen hippocampalen Schnittkultur zu gewährleisten, muss eine von kaudal nach rostral parallel zum Tractus perforans ansteigend verlaufende Schnittführung gewählt werden, wobei weit dorsal und ventral liegende Schnittebenen keine Verwendung finden, da sie den Tractus Perforans nur in angeschnittener Form enthalten (Abb. 1) (Amaral et al., 1995).

1.3.2 Die Organotypische Hippocampale Schnittkultur (OHSC)

Die organotypische hippocampale Schnittkultur umfasst den entorhinalen Kortex (EC), das Prä- und Parasubiculum, das Subiculum (SUB), das Ammonshorn (CA, Cornu ammonis), die Hilusregion (HI) und den Gyrus dentatus (GD) . Die

Pyramidenzellschicht im CA und die Körnerzellschicht (GCL) im DG sind diejenigen Areale im Hippocampus, in denen Neurone in bandförmiger Anordnung zu finden sind. Die Fascia dentata ist der Bereich des Gyrus dentatus, der die Körner- und Molekularzellschicht enthält.

Anhand der OHSC ist es möglich, aufgrund eines komplett erhaltenen und myelinisierten Fasertraktes, des Tractus perforans, verschaltete Neurone in organotypischer Umgebung und Anordnung zu erforschen. Untersuchungen haben ergeben, dass die zelluläre Umgebung in den OHSC in einem Maße erhalten ist, welches nahezu in vivo Bedingungen entspricht (Stoppini et al., 1991; Frotscher et al., 1995; Gähwiler et al., 1997). Zur gleichen Zeit wurde auch gezeigt, dass die Organotypie in den OHSC auch für Astrozyten und Oligodendrozyten gilt (del Rio et al., 1991; Berger et al., 1994). Mikrogliazellen zeigen nach Präparation der Schnittkulturen zunächst einen amöboiden, aktivierten Zustand, der in den Narben bildenden Grenzschichten der OHSC bestehen bleibt, im Inneren aber nach 6 Tagen in Kultur einer ramifizierten Morphologie weicht (Hailer et al., 1996). Damit ist auch für Mikrogliazellen nach Ablauf einer initialen Verletzungs- und Aktivierungsphase gezeigt, dass in der OHSC organotypische Verhältnisse herrschen.

1.3.3 Neuroanatomische Färbemethoden von Nervenfasern

In diesem Kapitel wird auf verschiedene Methoden der Färbung neuronaler Verbindungen eingegangen, um im folgenden speziell die Anfärbung des Tractus perforans aufzuzeigen. Die Geschichte der Anfärbung neuronaler Strukturen begann mit der Silberimpregnationstechnik von Golgi und Cajal Ende des 19.

Jahrhunderts und ermöglichte erstmalig umfangreiche morphologische Studien an Nervenzellen. In den späten 60er Jahren des 20. Jahrhunderts wurden Methoden entwickelt, die zelluläre Transportvorgänge nutzen, um Nervenfasern anzufärben. Dies war der entscheidende Schritt, der es ermöglichte, die Verbindung einzelner Regionen des zentralen Nervensystems zu erforschen und so Konzepte über die Funktion dieser Regionen zu erstellen. Die selektive Silberimprägnationstechnik von degenerierenden Axonen (Nauta et al., 1954; Fink et al., 1967) ist eine der ersten Techniken, die diesen Ansatz verfolgte. Die mangelnde Zuverlässigkeit der Silberimprägnationstechniken führte zu einer Methode, die „autoradiographische Erkennung anterograd transportierter Aminosäuren“ genannt wird (ARG) (Hendrickson & Edwards, 1978). Die bei dieser Methode eingeschränkte Auflösung von Axonen und Zielstrukturen ebnete den Weg für den Tracer Phaseolus vulgaris leucoagglutinin (PHAL), der eine anterograde Anfärbung von Axonen und Zielstrukturen mit hoher Sensitivität und Selektivität ermöglichte (Gerfen et al, 1984). Gerade verschiedene Projektionen in die Fascia dentata, bestehend aus der Körnerzellschicht, der inneren Molekularzellschicht und der äußeren Molekularzellschicht des Gyrus dentatus, wurden mit PHAL untersucht (Deller et al., 1998).

Eine völlig neue Gruppe von Tracern stellten die Konjugate aus Dextranen und verschiedenen fluoreszierenden Stoffe dar. Entscheidend für die guten Eigenschaften dieser Tracer bei anterograder und retrograder Anfärbung von Axonen und Neuronen ist die intrazelluläre und intraaxonale Aufnahme der Dextrane, sowie deren aktive Beförderung durch axonale Transportvorgänge. Da

der aktive Transport der Dextrane Voraussetzung für die axonale und neuronale Anfärbung ist, schließt sich die Bearbeitung fixierter Gewebe mit Dextranen aus. Der erste Tracer dieser Gruppe, welcher der Erforschung von Verbindungen im ZNS diene, war ein mit einem Fluorophor konjugiertes Dextran-Lysin (Glover et al., 1986; Fritsch et al., 1990). Diese Autoren haben fluoreszierende Dextranamine zum Zwecke der anterograden Fasertraktmarkierung verwendet. Andere Konjugate der Dextranamine sind z.B. Texas Red, Cascade Blue, Fluorescein und Tetramethylrhodamin. Der Nachteil dieser fluoreszierenden Konjugate besteht in der Ausbleichung bei Betrachtung unter dem Fluoreszenzmikroskop.

Um diesen Nachteil zu umgehen, wurden biotinylierte Dextranamine entwickelt, die mit Hilfe von Avidin und biotinylierter Meerrettich-Peroxidase bzw. der sogenannten ABC-Entwicklung sichtbar gemacht werden (Hsu et al., 1981). Das Reaktionsprodukt kann am Licht- und Elektronenmikroskop ausgewertet werden. Nach Injektion von biotinylierten Dextranaminen in das ZNS wurde eine intensive anterograde Anfärbung der Axone und Terminalregion beobachtet (Veenman et al., 1992; Veenman et al., 1996).

In weiteren Studien hat sich herausgestellt, dass sich biotinylierte Dextranamine abhängig von ihrem Molekulargewicht und dem pH-Wert sowohl für die anterograde als auch für die retrograde Markierung im ZNS eignen (Fritsch et al., 1993; Kaneko et al., 1996; Medina et al., 1997). Die biotinylierten Dextranamine sind nach der Markierung im Zytoplasma oder in Vesikeln der Neurone und Axone lokalisiert.

Als man mit Markern arbeitete, deren intensive Färbereigenschaften auf der vornehmlichen Anfärbung der Zellmembranen beruhten, wie z.B. Rhodamin, rückten andere Farbstoffe in den Mittelpunkt des Interesses. Diese, die Zellmembranen anfärbenden Farbstoffe, sind intrazellulär und –axonal an die Lipidmembranen gebunden und weniger in cytoplasmatischen Vesikeln enthalten (Bonhoeffer et al., 1980). So wurden Carbocyaninfarbstoffe wie 1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindo-carbocyaninperchlorat (DiI), 3,3'-Dioctadecyloxa-carbocyaninperchlorat (DiO) und DiS eingesetzt (Honig et al., 1986).

Diese Farbstoffe bestehen aus zwei durch drei Kohlenstoff-Atome verbundene Ringstrukturen, die in einer Position entweder eine Isopropylgruppe, ein Sauerstoff-Atom oder ein Schwefel-Atom enthalten und mit einer unterschiedlich langen Alkylkette konjugiert sind. Sie binden in Abhängigkeit von der Länge der Alkylgruppe unterschiedlich stark an Lipidmembranen (Honig et al., 1989a; Honig et al., 1989b).

Die retrograde Markierung von Nervenfaserntrakten in vivo wurde an Hühnern etabliert, denen DiI in die Beinmuskulatur injiziert wurde. Diese Injektion führte zur Anfärbung der Motoneurone im Rückenmark (Landmesser et al., 1978). Die anterograde Markierung mit DiI wurde ebenfalls an Hühnern eingeführt, um das Wachstum von sensorischen und motorischen Axonen in die untere Extremität verfolgen zu können (Landmesser et al., 1986). Nachfolgend wurde beobachtet, dass die Anfärbung durch DiI hauptsächlich auf der Diffusion entlang der Lipidmembranen beruht, und dass der Farbstoff mehr in diesen Membranen als in cytoplasmatischen Vesikeln lokalisiert ist.

Die Wanderung erfolgt bei anterograden und retrograden Dil-Markierungs-Techniken passiv und die Wanderungsgeschwindigkeit ist an verschiedenen Lipidmembranen weitestgehend unabhängig von aktiven Transportvorgängen. Diese Erkenntnisse ließen die Idee aufkommen, Carbocyanin-Farbstoffe als anterograde und retrograde Marker in fixierten Geweben einzusetzen (Godement et al., 1987).

1.3.4 Verschiedene Möglichkeiten der Markierung des Tractus perforans

Die Darstellung des Tractus perforans erfolgte zunächst in vivo, später aber auch in vitro. In vivo wurde Mini Ruby, ein biotinyliertes Dextranamin, zur anterograden Darstellung des Tractus perforans verwendet (Bechmann et al., 1997). An narkotisierten, unversehrten Ratten wurden der fluoreszierende Farbstoff Fast Blue und Diamidino yellow mit Mikropipetten in die Molekularzellschicht des Gyrus dentatus eingebracht, um eine retrograde Markierung von entorhinalen Neuronen in Schicht 2 via Tractus perforans in vivo zu erzielen (Dolorfo et al., 1998). Der Tractus perforans selbst wurde dabei aber nicht angefärbt.

Die Darstellung des Tractus perforans in der fixierten Schnittkultur ist mit verschiedenen Farbstoffen gelungen. Anterograd wurde er mit Rhodamin-Dextran-Aminen (Boulton et al., 1992) und Biocytin (Diekmann et al., 1994) angefärbt. Um den Tractus perforans in der lebenden OHSC in vitro anzufärben, wurde wie in vivo Mini Ruby mit einem Molekulargewicht von 10 kD verwendet (Kluge et al., 1998).

Die anterograde Markierung des Tractus perforans mit Dil wurde in vivo (Tamamaki et al., 1999) und in vitro (Woodhams et al., 2000) verwirklicht.

1.3.5 Neuronale Marker

Traditionelle Methoden, um Neurone zu markieren, sind die Nissl- und die Golgi-Färbung. Die Nissl-Färbung zeigt jedoch Schwächen bei der Differenzierung zwischen Neuronen und Gliazellen. Insbesondere die Unterscheidung der Körnerzellen des Kleinhirns und des Gyrus dentatus von Gliazellen ist schwierig. Die Golgi-Färbung färbt nur einen kleinen Prozentsatz der Neurone in fixiertem Gewebe.

Neben diesen klassischen Verfahren existiert seit der Einführung immunhistochemischer Methoden eine Vielzahl von Färbemöglichkeiten. Die neuronenspezifische Enolase (NSE) ist ein Protein, welches durch einen Antikörper markiert werden kann. Dieses Protein ist aber nicht spezifisch für die neuronale Zelllinie: Es findet sich in großen Mengen in Neuronen, neuroendokrinen Zellen und daraus entstehenden Tumoren (Schmechel et al., 1985; Vinores et al., 1984). Zu den sauren Glykoproteinen gehört das Chromogranin. Es ist an neurosekretorische Granula verschiedener Zelltypen gebunden und kommt im zentralen als auch peripheren Nervensystem vor. Verschiedene Antikörper gegen Chromogranin sind vorhanden (Munoz et al., 1990; Schmid et al., 1989; Nolan et al., 1985; Somogyi et al., 1984). Das Glycoprotein Synaptophysin ist Bestandteil der Membranen in präsynaptischen Vesikeln. Die Immunoreaktivität beschränkt sich deshalb hauptsächlich auf das Neuropil, während das Zellsoma der Neurone wenig reagiert (Miller et al., 1990; Gould et al., 1986). Neurofilamentproteine sind Bestandteile des neuronalen Zytoskeletts. Abhängig von ihrem Molekulargewicht und dem Grad der

Phosphorylierung, zeigt die Immunreaktivität eine große Schwankungsbreite. Kleine Interneurone enthalten zudem nur geringe Mengen an Neurofilamentprotein (Shaw et al., 1981; Schlaepfer et al., 1987; Trojanowski et al., 1987). Das neuronenspezifische neuronale Antigen NeuN (neuron nuclei) kann von dem Antikörper MAb A60 detektiert werden. Dieser Antikörper markiert das NeuN des Nukleus und des Perikaryons der meisten neuronalen Zellen des Nervensystems. Zur Expression von NeuN kommt es entwicklungsgeschichtlich während der terminalen neuronalen Ausreifung, wenn die Neurone in den postmitotischen Zustand übergehen (Mullen et al., 1992). Eine Gemeinsamkeit mit dem neuronalen Zytoskelettprotein A60 besteht nicht (Hayes et al., 1995).

1.4 Zielsetzung und Fragestellung der folgenden Untersuchungen

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Wirkung von MMF auf das Überleben entorhinaler Neurone und ihrer Projektion in den Gyrus dentatus in der OHSC überprüft werden. Dieser Ansatz war von der Vorstellung geleitet, dass eine erhöhte Anzahl entorhinaler Neurone zu einer ebenfalls erhöhten Anzahl von Axonen, die in den Gyrus dentatus projizieren, führt. Über die Axone des Tractus perforans sollten die Neurone des entorhinalen Kortex vom Gyrus dentatus ausgehend retrograd mit Dil angefärbt werden können. Ein guter Erhalt des Tractus perforans würde dementsprechend zu einer hohen Anzahl retrograd markierter Neurone führen. Um die retrograd mit Dil markierten Neurone zweifelsfrei als Neurone zu identifizieren, musste eine Gegenfärbung mit dem Neuronen spezifischen Antikörper NeuN durchgeführt werden.

1.4.1 Erste Arbeitshypothese

Um den oben beschriebenen Versuchsansatz zu ermöglichen, musste die retrograde Markierung des Tractus perforans mit Dil oder Mini Ruby in der OHSC etabliert werden. Die Neurone des entorhinalen Kortex projizieren via Tractus perforans zu den Körnerzellen des Gyrus dentatus. Diese Projektion ist in den OHSC erhalten. Dil und Mini Ruby sind als Farbstoffe für die anterograde Markierung des Tractus perforans sowohl in vivo als auch in vitro etabliert.

Hypothese 1: Es ist möglich, eine retrograde Markierung entorhinaler Neurone samt Tractus perforans mit Dil oder Mini Ruby über den Tractus perforans durch Applikation von Dil- oder Mini Ruby-Kristallen im Hilus des Gyrus dentatus zu erreichen und die retrograd markierten Neurone mit NeuN gegenzufärben.

1.4.2 Zweite Arbeitshypothese

Die Schnittkultur kann als ein Modell angesehen werden, in dem der Zellverband gut erhalten ist und in vivo Bedingungen (Organotypie) simuliert werden. Auch wenn Neurone in der OHSC typische morphologische Eigenschaften beibehalten und nach einer gewissen Zeitspanne aktivierte Mikrogliazellen aus ihrer amöboiden Form in den ramifizierten inaktiven Zustand übergehen, stellt die Präparation doch einen erheblichen Eingriff in die Integrität des Gewebes dar. Die Mikrogliazellen sind über proinflammatorische Zytokine maßgeblich an den inflammatorischen Prozessen beteiligt, die durch eine Schädigung von ZNS-Gewebe angestoßen werden und entfalten vor allem in den ersten Tagen nach Präparation der OHSC eine neurotoxische Wirkung. Frühere Arbeiten haben gezeigt, dass MMF über seine hemmende Wirkung auf Mikrogliazellen das

neuronalen Überleben in experimentell geschädigtem ZNS-Gewebe positiv beeinflussen kann.

Hypothese 2: Die Zugabe von MMF zu den Schnittkulturen über den gesamten Kultivierungszeitraum führt zu einem verbesserten neuronalen Erhalt im entorhinalen Kortex einschließlich der Projektion in den Gyrus dentatus via Tractus perforans. Dies sollte sich in unseren Experimenten in einer erhöhten Anzahl von retrograd angefärbten Neuronen im entorhinalen Kortex in den mit MMF behandelten OHSC ausdrücken.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Materialien

2.1.1 Grundsubstanzen und Lösungen

Agar, Merck, Darmstadt

Bovines Serum Albumin (BSA), Sigma Chemicals, Deisenhofen

Dako Fluoreszenz Eindeckelmedium, DAKO, Hamburg

Ethanol, Mallinckrodt Baker, Deventer, Niederlande

Glukose, Braun, Melsungen

Glutamin, Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein

Glutaraldehyd Lösung, Sigma Chemicals, Deisenhofen

Hämalaun, ApliChem, Darmstadt

Hank's balanced salt solution (HBSS), Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein

Insulin, Boehringer, Mannheim

Kaliumchlorid (KCl), Merck, Darmstadt

Kalziumchlorid-Dihydrat ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), Merck, Darmstadt

Magnesiumsulfat-Heptahydrat ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), Merck, Darmstadt

Methanol, Merck, Darmstadt

Minimal essential medium (MEM), Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein

Natriumazid (NaN_3), Merck, Darmstadt

Natriumbikarbonat, Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein

Natriumchlorid (NaCl), Merck, Darmstadt

Natriumhydrogenphosphat-Monohydrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) , Merck, Darmstadt

Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3), Merck, Darmstadt, Deutschland

Normales Pferdeserum (NHS), Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein

Paraformaldehyd, Merck, Darmstadt

Penicillin-Streptomycin-Lösung, Sigma Chemicals, Deisenhofen

Salzsäure 25%, Merck, Darmstadt

Tissue Tek, Sakura Finetek, Coeterwoude, Niederlande

Trishydroxymethylaminomethan (Tris), Merck, Darmstadt

Triton X 100, Sigma Aldrich Chemic GmbH, Steinheim

Vitamin C, Sigma Chemicals, Deisenhofen

Xylol, Merck, Darmstadt

2.1.2 Antikörper und Tracer

Alexa Fluor 488, Ziege-anti-Maus, monoklonal, (Molecular Probes, Leiden, Niederlande)

NeuN, Chemicon, Maus-anti-Maus, monoklonal, Temecula, USA

Dil, Molecular Probes, Eugen, USA

Mini Ruby, Molecular Probes, Eugen, USA

2.1.3 Puffer

Die verwendeten Mengen beziehen sich auf die Lösung in einem Liter Aqua destillata.

Alle Puffer wurden auf einen ph-Wert von 7,4 eingestellt.

Phosphatpuffer (PB) 0,1 M:

11,36 g Na_2HPO_4

2,72 g KH_2PO_4

Phosphatpuffer (PB) 0,2 M:

22,72 g Na₂HPO₄

5,44 g KH₂PO₄

Phosphatpuffer (PBS) 0,02 M:

9 g NaCl

0,54 g KH₂PO₄

2,27 g Na₂HPO₄

Phosphatpuffer (PBS/Triton) 0,02 M mit Triton X:

9 g NaCl

0,54 g KH₂PO₄

2,27 g Na₂HPO₄

3 ml Triton X

2.1.4 Geräte und Programme

Vibratom, Vibratom 1000 Classic, ST. Louis, Missouri, USA

Kryostat, Microm, Walldorf

Konfokales Laser Scanning Mikroskop, LSM 510, Zeiss, Göttingen

GraphPad (Statistikprogramm), San Diego, USA

Adobe Photoshop, Adobe Systems, San Jose, USA

2.2 Medien für die Präparation und Kultivierung von Schnittkulturen

2.2.1 Präparationsmedium

Für die Präparation des Gehirns einer Ratte werden mindestens 50 ml Präparationsmedium benötigt. Es dient zum einen der Versorgung des Hirngewebes während des Schneidevorgangs, zum anderen der Aufbewahrung und Versorgung der schon präparierten Hirnschnitte bis zur Verteilung auf die

Kultureinsätze. Zur Herstellung des Präparationsmediums werden 99 ml Minimal Essential Medium (MEM) und 1 ml Glutamin durch ein Sterilfilter (Porengröße: 0,22 µm) filtriert. Fertiges Medium wird dann mit 25% Salzsäure auf einen pH-Wert von 7,35 eingestellt. Die Temperatur wird mittels Eiskühlung bei 4°C gehalten.

2.2.2 Kulturmedium

Nach Überführung der präparierten Schnitte in jeweils einen Kultureinsatz, wird eine 6-Lochplatte mit 1 ml Kulturmedium pro Loch befüllt, in das der Kultureinsatz eingesetzt wird. Zur Herstellung einer Verbrauchsmenge von 100 ml Kulturmedium werden 50 ml Minimal Essential Medium (MEM), 25 ml Hanks' gepufferte Salzlösung (HBSS), 2 ml Glutamin, 1,2 ml 20% Glucoselösung, 1 ml Penicillin-Streptomycin-Lösung, 580 µl 7,5% Bicarbonat-Lösung, 100 µl Insulin und 80 µl Vitamin C durch ein Sterilfilter (Porengröße: 0,22 µm) filtriert. Zur Fertigstellung dieses Mediums werden dann 25 ml normales Pferdeserum (NHS) hinzugegeben. Abschließend ist der pH-Wert auf 7,4 einzustellen.

2.3 Herstellung von organotypischen hippokampalen Schnittkulturen (OHSC)

2.3.1 Herstellung des Präparationsagars

Der Präparationsagar wird zur Einbettung des Hirngewebes während des Schneidevorgangs verwendet. Für die Herstellung werden folgende Chemikalien in 100 ml Aqua destillata gelöst:

0,725 g NaCl, 0,0373 g KCl, 17,25 mg NaH₂PO₄·H₂O, 0,0493 g MgSO₄·7H₂O, 0,2184 g NaHCO₃, 0,18 g Glucose, 0,0294 g CaCl₂·2H₂O, 5 g Agar

Die fertige Lösung wird für 30 min bei 70°C auf dem Heizmagnetrührer erwärmt und durchmischt, danach in sterile Gewebekulturschalen (Durchmesser 35 mm) abgefüllt. Dort kühlt der Agar aus, verfestigt sich und wird bis zur weiteren Verwendung versiegelt im Kühlschrank aufbewahrt.

2.3.2 Ausstattung des Arbeitsplatzes

Folgende Instrumente und Materialien werden für die Präparation der OHSC benötigt:

1 Plastiktüte, 1 große Verbandsschere, 2 kleine Scheren, 1 kleine chirurgische Pinzette, 1 große gebogene Pinzette, 1 kleine gebogene Pinzette, 2 Skalpellhalter, 2 gebogene chirurgische Einmalklingen (Größe 15), 2 gerade chirurgische Einmalklingen (Größe 11), 1 halbierte Rasierklinge, 2 Metallspatel, 1 Pasteurpipette aus Glas, 2 Pasteurpipetten mit abgesägter Spitze, 2 Vakuumbälle, 3 Rundfilter (Durchmesser: 55 mm), 4 große Gewebekulturschalen (Durchmesser: 94 mm), 4 kleine Gewebekulturschalen (Durchmesser: 35 mm), 1 Gewebekulturschale mit Agar, 1 Kühlelement, etwas Histoacryl-Kleber, etwas Eis (die Materialien sind bis auf das Eis steril).

Der Arbeitsplatz befindet sich unter einer offenen Sterilbank, in der sich auch das Vibratom und ein binokulares Mikroskop befinden. Nur die Dekapitierung der Ratte findet außerhalb der Sterilbank statt. Dort wird eine Plastiktüte für die Überreste der Ratte, die große Verbandsschere zur Dekapitierung, eine kleine Verbandsschere und die kleine chirurgische Pinzette für die ersten Präparationsschritte bereitgehalten. In die Sterilbank wird das Kühlelement zur Kühlung des Präparationsmediums gelegt. Eine kleine Gewebekulturschale wird

mit Präparationsmedium gefüllt und für die Aufnahme des Hirns bereitgestellt. Zwei Rundfilter werden jeweils in eine große Gewebekulturschale getan. Zwei kleine Gewebekulturschalen kommen neben das Vibratom, um Schnitte vorübergehend aufzunehmen und als Abfallbehälter zu dienen. Eine kleine Gewebekulturschale wird auf das Kühlelement gestellt, um die unter dem binokularen Mikroskop ausgesuchten Schnitte zu lagern. Die drei Agarblöcke (einer für die stirnseitige Stabilisierung und zwei für die Seitenführung des Gehirnes) zur Fixierung des Gehirns auf dem Plexiglaseinsatz des Vibratoms werden zurechtgeschnitten und kurz auf einem der Rundfilter angetrocknet. Vor dem Einkleben der Agarblöcke wird die Rasierklinge in das Vibratom eingespannt und dieses mit Eis befüllt. Nach dem Antrocknen wird der stirnseitige Block und ein Block für die Seitenführung des Hirngewebes mit Histoacryl-Kleber auf dem Plexiglaseinsatz befestigt. Der dritte Agarblock wird erst nach Festkleben des Gehirns angebracht.

2.3.3 Präparation der OHSC

Die Methode zur Herstellung der OHSC ursprünglich von Stoppini entwickelt (Stoppini et al., 1991). Nach der Dekapitation 8 Tage alter Wistar Ratten wird der Skalp vom Nacken aus in der Mittellinie mit einer kleinen Schere durchtrennt und zu den Seiten hin komplett entfernt.

Der Kopf wird jetzt in eine große Gewebekulturschale unter der Sterilbank gelegt und der Schädel mit einer neuen kleinen Schere von kaudal nach rostral in der Mittellinie vorsichtig eröffnet. Die Kalottenhälften werden zu den Seiten möglichst weit abpräpariert. An dem eröffneten Schädel werden bei freier Sicht auf das

Gehirn einerseits das Frontalhirn, andererseits das Kleinhirn und der Hirnstamm mit einem scharfen Rundskalpell von dem den Hippocampus enthaltenden Hirnanteil abtrennt. Der den Hippocampus enthaltende Block wird mit einem Metallspatel in die mit Präparationsmedium gefüllte Gewebekulturschale überführt. Anschließend wird das Gehirn für 10 Sekunden mit der dorsalen Seite auf einen Rundfilter gelegt, wo es leicht antrocknet. Im nächsten Schritt wird das Gehirn mit Hilfe einer großen gebogenen Pinzette und einem Metallspatel in den vorbereiteten Plexiglaseinsatz überführt. Dort wird es mit seiner dorsalen Seite und dem rostralen Ende auf den Präparator zeigend in den Plexiglaseinsatz eingeklebt und durch Ankleben des verbleibenden Agarblocks U förmig stabilisiert. Von der verbleibenden offenen, nicht mit Agar eingebetteten Seite kann später die Rasierklinge des Vibratoms durch das Hirngewebe schneiden, das durch die Agarblöcke in seiner Position gehalten wird. Nachdem das Gehirn fixiert ist, wird der Plexiglaseinsatz sofort mit Präparationsmedium aufgefüllt, bis das Gewebe komplett bedeckt ist.

Am Vibratom werden jetzt 350 μm dicke Horizontalschnitte der Hippocampusregion angefertigt. Zu Anfang der Präparation können mindestens 500 μm Gewebe verworfen werden, bis die relevanten Schichten durch die Hippocampusformation erreicht werden. Jeder Schnitt wird sofort unter dem binokularen Mikroskop auf Schäden und Korrektheit der Schnittebene untersucht. Unter Mikroskopsicht werden auch die Temporallappen mit der Hippocampusformation durch ein Rundskalpell abgetrennt, um in eine mit eisgekühltem Präparationsmedium gefüllte Gewebekulturschale transferiert zu

werden. Durchschnittlich werden 6-8 Schnitte (12-16 Hippocampusformationen) pro Gehirn gewonnen. Nach Beendigung der Präparation werden die einzelnen Temporallappen mit der enthaltenden Hippocampusformation in Membraneinsätze (Porengröße: 0,4 µm) transferiert und mit diesen in mit Kulturmedium befüllte 6-Lochplatten eingesetzt. In den 6-Lochplatten werden die Schnitte in einen Brutschrank überführt, wo sie bei 35°C und 5% CO₂ Atmosphäre bis zur Fixierung 9 Tage lang kultiviert werden.

2.4 Experimentelle Gruppen

Nach der Präparation werden von jeder Ratte je die Hälfte der Schnittkulturen auf die Kontrollgruppe und die Mofetil-Gruppe verteilt:

Die Kontrollgruppe (CTL, Gruppe 1): Die Schnittkulturen der Kontrollgruppe werden vom 0 div bis zum 9 div in normalem Kulturmedium kultiviert.

Die Mofetilgruppe (Mofetil, Gruppe 2): Die Schnittkulturen der Mofetilgruppe werden vom 0 div bis 9 div mit Mofetil enthaltendem Kulturmedium kultiviert. Mofetil ist in einer Konzentration von 100 µg/ml im Kulturmedium enthalten.

2.5 Fixierung der Schnittkulturen

Zur Fixierung werden die Schnittkulturen in den 6-Lochplatten aus dem Brutschrank genommen. Nach Absaugen des Kulturmediums wird in die Löcher der 6-Lochplatte und in die Kultureinsätze reichlich die Kultur bedeckende 4% 0.1 M Paraformaldehydlösung gegeben. 4 Tage werden die Schnittkulturen dort belassen, bevor die Färbeprozedur beginnt.

2.6 Färbemethoden

2.6.1 Hämatoxylinfärbung

Für die Hämatoxylinfärbung werden am Kryostat angefertigte Gefrierschnitte der OHSC verwendet. Zu dieser Schneidetechnik siehe unter 2.8.6. Die Hämatoxylinfärbelösung nach Mayer führt zur Anfärbung der Zellkerne. Gut 10 Minuten verbleiben die Objektträger mit den Schnitten in dieser Lösung. Darauf werden die Schnitte für 2 Minuten in Aqua dest. gespült, kurz in 3% Salzsäure-Alkohol zum Differenzieren eingetaucht und anschliessend unter fließendem Leitungswasser für 10 Minuten gewässert. Zur Entwässerung durchlaufen die Schnitte die aufsteigende Alkoholreihe. Begonnen wird für 2 Minuten in 70% Ethanol, gefolgt von 2 Minuten in 80% Ethanol, 2 Minuten in 90% Ethanol, 2 Minuten in 96% Ethanol und 2 x 2 Minuten in absolutem Ethanol. Nun folgen 2 x 2 Minuten in Xylol. Abschließend werden die Schnitte mit Entellan und einem Deckgläschen bedeckt.

2.6.2 Retrograde Markierung des Tractus perforans mit Dil

Das Ziel dieser Färbetechnik ist die Anfärbung des Tractus perforans ausgehend vom Stratum molekulare des Gyrus dentatus bis zu den entorhinalen Neuronen. Das Terminationsgebiet des Tractus perforans liegt in den äußeren zwei Dritteln der Molekularzellschicht des Gyrus dentatus. Er entspringt von Neuronen, deren Perikaryen im entorhinalen Kortex lokalisiert sind. Damit der Farbstoff retrograd vom Gyrus dentatus über den Tractus perforans bis zu den entorhinalen Neuronen gelangen kann, wird ein Dil-Kristall in die Hilusregion des Gyrus dentatus platziert. Dies geschieht an der vorfixierten Schnittkultur in der 6-

Lochplatte. Die Fixierungsflüssigkeit wurde zuvor abgesaugt. Ein Dil-kristall wird zwischen zwei Objektträgern zerrieben, um die Kristallgröße zu verringern. Wegen der starken Färbekraft von Dil werden die Kristalle sehr klein gewählt. Mit der Spitze einer Kanüle wird ein Dil Kristall unter dem Mikroskop aufgenommen. Mit bloßem Auge ist das Dil Kristall an der Spitze nicht zu erkennen. Ebenfalls unter dem Mikroskop wird das Kristall in der Hilusregion des Gyrus dentatus im Gewebe versenkt (Abb. 2A). Für die durchschnittliche Laufzeit von 10 Tagen wird die Lochplatte wieder mit 4% Paraformaldehyd befüllt. Wohlgedenkt wird dieses nicht mehr in die Kultureinsätze gegeben, sondern in die die Einsätze umgebende Vertiefung, um die Kristalle nicht wegzuwaschen oder über die gesamte OHSC zu verteilen. Das Fixativ muß also zur Immersion des Schnittes von unten durch die Membran des Kultureinsatzes diffundieren. Nach 10 Tagen wird der Schnitt auf einen gelatinierten Objektträger überführt und mit einem Fluoreszenzeinbettungsmedium (DAKO) eingedeckelt.

2.6.3 NeuN-Färbung

Für die NeuN-Färbung wird das Fixativ aus der 6-Lochplatte abgesaugt. Dieses wird durch 1ml einer Lösung ersetzt, die den Erstantikörper gegen NeuN in der Verdünnung 1:1000 enthält. Die Antikörperlösung verbleibt in der 6-Lochplatte für 7 Tage und auch hier geschieht die Immersion des Schnittes nur durch die Membran des Kultureinsatzes. Nach 7 Tagen wird die NeuN Lösung abgesaugt, der Schnitt wird mit Phosphatpuffer über 2x10 Minuten gespült und für 3 Tage mit dem Zweitantikörper Alexa 488 Ziege-anti-Maus 1:200 verdünnt inkubiert. Nach Entfernung der Antikörperlösung wird für 2x10 min mit Phosphatpuffer

gespült. Nach 10 Tagen wird die OHSC auf einen gelatinierten Objektträger überführt und mit einem Fluoreszenzeinbettungsmedium eingedeckelt

2.6.4 Dil/NeuN Doppelfärbung

Diese Färbung beginnt ebenfalls mit der Absaugung des Fixativs. Darauf folgt die Markierung des Tractus perforans durch Dil nach obigem Schema. Anschliessend wird die NeuN Antikörperlösung in die 6-Lochplatte gegeben und nach dem NeuN Färbungsprotokoll verfahren. Nach 10 Tagen wird die OHSC auf einen gelatinierten Objektträger überführt und mit einem Fluoreszenzeinbettungsmedium eingedeckelt.

2.7 Auswertung

2.7.1 Darstellung der retrograden Markierung des Tractus perforans

Die Darstellung erfolgt bei 160facher Vergrößerung mit dem Ölimmersionsobjektiv am Konfokalen Laser Scanning Mikroskop (LSM 510, Zeiss). An diesem Mikroskop können Fluoreszenzsignale mit Hilfe von Laserlicht in einer konfokalen Ebene dargestellt werden. Die Laserbank des LSM 510 enthält zwei Helium/Neon Laser, die Laserlicht der Wellenlängen 543 nm und 633 nm erzeugen, sowie einen Argon Laser, der Laserlicht der Wellenlängen 458 nm und 488 nm emittiert. Die einzelnen Module werden zentral von einem Rechner gesteuert, der ebenfalls die digitale Bildaufnahme übernimmt. Für die Visualisierung Dil-positiver Strukturen wird monochromatisches Licht der Wellenlänge 543 nm unter Verwendung eines Bandpassfilters von 585-615 nm eingesetzt. Strukturen, die mit dem Sekundär-Antikörper Alexa 488 markiert sind, werden mit monochromatischem Licht der Wellenlänge 488 nm unter

Verwendung eines Farbteilers (FT 488/543) und eines Bandpassfilters von 505-530 nm angeregt. Für die Dokumentation des Tractus perforans wurden die Präparate optisch in ca. 2 µm dicke Scheiben zerlegt.

2.7.2 Erfassung Dil-NeuN doppelmarkierter Zellen und Dil gefärbter

Axone

Die Erfassung der Dil-NeuN doppelmarkierten Zellen erfolgt in einem Bereich, der den gesamten entorhinalen Kortex sowie Teile des Subiculum, das Parasubiculum und das Praesubiculum umfasst (Abb. 2A und B). Bei 630facher Vergrößerung wird unter Verwendung eines Ölimmersionsobjektives am konfokalen Laser Scanning Mikroskop jede Dil-NeuN doppelmarkierte Zelle im oben genannten Areal gezählt. Eine adäquate Darstellung des Tractus perforans und Dil-NeuN doppelmarkierter Zellen gelingt in den Versuchen mit Doppelfluoreszenz nur bei 630facher Vergrößerung.

2.7.3 Statistische Methoden

In OHSC wird unter dem konfokalen Laser Scanning Mikroskop die Zahl der Dil/NeuN doppelmarkierten Zellen im oben beschriebenen Areal bestimmt. In der Kontrollgruppe werden 28 OHSC und in der MMF-Gruppe 20 OHSC untersucht. Die OHSC stammen aus der Präparation von insgesamt 6 Rattenhirnen. Die Verteilung der OHSC aus der Präparation jeweils eines Rattenhirnes auf die zwei Versuchsgruppen erfolgt zufällig. Die OHSC werden bei jeder Präparation, wie oben beschrieben, in einer Kulturschale mit Präparationsmedium gesammelt und von dort aus in die zwei Versuchsgruppen aufgeteilt.

In jeder Versuchsgruppe wird der Mittelwert der pro entorhinalem Kortex erfassten Zahl Dil/NeuN doppelmarkierter Zellen gebildet. Der Vergleich der Gruppen untereinander erfolgt im T-Test, p-Werte $< 0,05$ werden als signifikant betrachtet.

2.8 Versuche zur retrograden Markierung des Tractus perforans mit Mini Ruby

2.8.1 Mini Ruby

Mini Ruby ist ein Rhodamin-konjugiertes, biotinyliertes Dextranamin mit einem Molekulargewicht von 10 kD. Durch die Konjugation mit Biotin kann es mittels einer DAB-Färbung sichtbar gemacht werden. Mini Ruby wurde wie Dil eingesetzt, um den Tractus perforans retrograd zu markieren. Dieser Ansatz führte allerdings nicht zu dem gewünschten Erfolg. Im Unterschied zu Dil, das passiv durch seine Lipophilie in die Membranen diffundiert, wird Mini Ruby aktiv transportiert. Der aktive retrograde Transport erfolgt langsamer und setzt die Applikation während der Kulturphase voraus.

2.8.2 Versuchsmodell

Für die Versuche werden OHSC verwendet wie oben beschrieben verwendet (siehe Abschnitt 2.3.3). In Präparation und Kultivierung bestehen keine Unterschiede.

2.8.3 Experimentelle Gruppen

Die Experimente mit Mini Ruby werden nur in einer Gruppe durchgeführt.

Gruppe 1: Kultivierung vom 0 div bis 9 div in normalem Kulturmedium.

2.8.4 Retrograde Markierung des Tractus perforans mit Mini Ruby

Die retrograde Markierung des Tractus perforans mit Mini Ruby erfolgt wie die Markierung mit Dil in der Hilusregion des Gyrus dentatus mit den gleichen Hilfsmitteln und wird am ersten Tag in Kultur (1 div) durchgeführt.

2.8.5 Fixierung

Nach 9 Tagen in Kultur (9 div) wird das Kulturmedium abgesaugt und die Kulturen für 15 Minuten in einer Lösung aus 4% Paraformaldehyd, 15% Pikrinsäure und 0,1% Glutaraldehyd in 0,1 M PB fixiert, für 30 Minuten mit 0,1 M PB gespült und anschliessend für eine weitere Stunde ohne Glutaraldehyd fixiert. Die Kulturen werden danach so lange mit 0,1 M PB gespült, bis die gelbe Farbe der Pikrinsäure ausgewaschen ist. Mit einem Pinsel werden die Kulturen von der Membran des Kultureinsatzes abgelöst und in 0,8 M Saccharose-Lösung bei 4°C bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt.

2.8.6 Herstellung von Gefrierschnitten der fixierten Kulturen

Gefrierschnitte von 14µm Dicke werden am Kryostaten für die immunhistochemische Färbung angefertigt. Der Schneidetisch mit dem Messer des Kryostaten befindet sich in einer Box. Die Temperatur der Box und des Messers können unabhängig voneinander geregelt werden. Für unsere Bedürfnisse wird die Temperatur der Box auf -21°C und die des Messers auf -18°C eingestellt. Um horizontale Schnitte anzufertigen, wird zunächst ein Block aus Tissue Tek, einem Einbettungsmedium, welches bei Raumtemperatur flüssig ist, angefertigt. Auf diesen wird die fixierte Kultur aus der Saccharose-Lösung überführt, um sie dann mit Tissue Tek zu bedecken und einzufrieren. Der

gesamte Block wird auf dem Schneidetisch befestigt und in dem die Kultur enthaltenden Areal horizontal geschnitten. Die Gefrierschnitte werden auf gelatinierte Objektträger gezogen und bei -20°C gelagert.

2.8.7 Färbung der Gefrierschnitte mittels Histochemie

Die histochemische Färbung der Gefrierschnitte wird nach dem Avidin-Biotin-Komplex (ABC)-Protokoll durchgeführt. 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) dient als Chromogen. Um die Zytoarchitektur der Schnitte sichtbar zu machen wird mit Hämalaun gegengefärbt.

Die bei -20°C gelagerten Gefrierschnitte werden zu Beginn ca. 20 Minuten aufgetaut und im Anschluß für zwei Minuten in 70% Alkohol getaucht. Zum Blockieren der endogenen Peroxidase werden die Schnitte für 10 Minuten mit 200 ml Methanol und 3 ml 30% Wasserstoffperoxid (H_2O_2) sowie anschließend für drei Minuten mit 70% Alkohol behandelt. Im Anschluss werden sie drei mal 10 Minuten in PBS gespült und mit dem Extravidin-Peroxidase-Komplex in einer Verdünnung von 1:100 in PBS/Triton für 60 Minuten inkubiert. Dann werden sie für zwei mal 10 Minuten mit PBS und einmal 10 Minuten mit 0,05 M Tris-Puffer gespült. Nachdem der Extravidin-Peroxidase-Komplex an das Biotin gekoppelt ist, wird 0,1 g DAB in 200 ml Tris-Puffer gelöst, die Objektträger mit den Schnitten werden in die Lösung eingetaucht und die Reaktion mit $100\ \mu\text{l}\ \text{H}_2\text{O}_2$ gestartet. Die Reaktion wird auf einem Objektträger unter dem Mikroskop verfolgt und zum Zeitpunkt ausreichender Färbung durch 10 minütiges Eintauchen in Tris-Puffer und 10 minütiges Waschen in Aqua dest. abgebrochen.

Die sich anschließende Hämalaunfärbung beginnt mit dem Eintauchen der Objektträger in Hämalaunlösung nach Meyer für 10 Minuten, gefolgt von zwei Minuten in Aqua dest., um dann kurz in 3% Salzsäure-Alkohol differenziert zu werden. Darauf wird unter fließendem Leitungswasser gewässert. Zuletzt werden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe, beginnend mit 70% Alkohol, entwässert, zwei mal zwei Minuten in Xylol eingetaucht und mit Entellan eingedeckelt.

2.8.8 Auswertung

Die Auswertung der Färbung des Tractus perforans mit Mini Ruby erfolgt am Lichtmikroskop. Hierbei wird auf eine durchgängige Markierung des Tractus perforans von der Molekularzellschicht des Gyrus dentatus bis zum Zellkörper im entorhinalen Kortex geachtet.

3 Ergebnisse

3.1 Zytoarchitektur der OHSC

Die Betrachtung der mit Hämalaun gefärbten OHSC unter dem Lichtmikroskop zeigt einen guten Erhalt der Zytoarchitektur der hippocampalen-entorhinalen Formation. Die Körnerzellschicht des Gyrus dentatus stellt sich intakt dar. Die Felder CA1, CA2 und CA3 des Cornu ammonis (CA) sind abgrenzbar und die Schichtung des entorhinalen Kortex ist erkennbar (Abb. 2B)

3.2 Retrograde Anfärbung des Tractus perforans mit Dil

In den OHSC der Kontrollgruppe ist deutlich der Verlauf von Axonen, Dendriten mit zugehörigen Neuronen zu erkennen. Axone terminieren im Gyrus dentatus und stellen eine ununterbrochene Verbindung zwischen dem Gyrus dentatus und dem entorhinalen Kortex dar. In Abb. 3A können wir ein Axon mit Neuron und kompletter Projektion in den Gyrus dentatus sicher identifizieren. Die Länge dieses Axons beträgt ca. 400 μm . Die Dicke schwankt zwischen 2,5 und 5 μm . Das Perikaryon des Neurons hat einen Durchmesser von ca. 25 μm . Ca. 15 weitere Fasern, die dem Gyrus dentatus zustreben, sind zu erkennen. Ihnen kann kein Perikaryon zugeordnet werden. Auch können sie über den Bildausschnitt nicht weiter verfolgt werden. Das Dil-Signal ist bei diesen Axonen intermittierend sehr schwach bis unterbrochen. Das Kaliber dieser Fasern ist sehr viel geringer und kann durchaus nur noch 1 μm betragen. Hier muss aber klargestellt werden, dass die Bilder, die durch ein konfokales Laser Scanning Mikroskop generiert werden, aus mehreren Ebenen bestehen. Bei der Bildbearbeitung kann auf einzelne Ebenen fokussiert werden, um ein bestimmte

Struktur besser darzustellen. Hier wurde das anfänglich beschriebene Neuron mit intakter Projektion in den Gyrus dentatus verstärkt herausgearbeitet. Eine direkte Vergleichbarkeit der Strukturen ist somit nicht möglich (Abb. 3A).

In der mit MMF behandelten Gruppe sehen wir eine Fülle von Axonen und Dendriten, die mit Perikaryen in Verbindung stehen. Hier wird geradezu ein Netz aus Axonen, Dendriten und Neuronen sichtbar, wobei eine größere Anzahl von Axonen dem Gyrus dentatus entgegenstrebt und so die Verbindung zwischen diesem und den entorhinalen Neuronen deutlich macht (Abb. 3B). Ca. 25 Axone, die in Richtung Gyrus dentatus ziehen, werden sichtbar. Die beiden durchgehend dargestellten Axone haben eine Länge von ca. 315-550 μm . Die Dicke schwankt zwischen 2,5 und 5 μm . Die übrigen Axone sind keinem Perikaryon zuzuordnen, können über den Bildausschnitt nicht weiterverfolgt werden und weisen die gleichen Kalibersprünge wie die in 3A gezeigten Axone auf.

3.3 Doppelfärbung entorhinaler Neurone durch retrograde Anfärbung mit Dil und Gegenfärbung mit NeuN

Bei diesem Versuchsansatz geht es darum, mit Dil markierte Zellen durch einen spezifischen Marker als Neurone zu identifizieren. Zu diesem Zweck wird ein Antikörper gegen NeuN eingesetzt. Dieses Vorhaben gestaltet sich besonders schwierig, da die Dil-Färbung, wie unter Material und Methoden beschrieben, empfindlich auf Detergenzien reagiert, die die Permeabilität der Zellmembranen erhöhen und so Antikörpern das Durchdringen einer Zellmembran erleichtern (Triton), oder durch Spülvorgänge beeinträchtigt wird, die z.B. der Entfernung nichtgebundener Antikörper dienen. Detergenzien und Spülvorgänge sind aber

Bestandteil der Standard-Färbeprotokolle von immunhistochemischen Färbemethoden zum Nachweis von Proteinen, in diesem Fall NeuN. Bei Anwendung der standardisierten Protokolle kommt es zu einem übermäßigen Austritt von Dil aus angefärbten Strukturen mit flächiger Einfärbung der gesamten OHSC und damit verbundenem Kontrastverlust (Abb. 6A). Dieser Kontrastverlust betrifft nur die Dil-Färbung, nicht aber die NeuN-Färbung.

Bis zur Etablierung unseres individuellen Färbeprotokolls für die gleichzeitige Anfärbung mit Dil und NeuN waren viele Versuchsreihen erforderlich. Zunächst wurde die Triton-Konzentration in den Inkubationsmedien für die Markierung mit NeuN reduziert, später wurde auf Triton ganz verzichtet. Diese Maßnahme sollte verhindern, dass die Permeabilität der Zellmembranen gesteigert wird und Dil somit verstärkt in den Extrazellulärraum übertritt. Auch dieser Schritt führte nicht zum gewünschten Erfolg. Bei Betrachtung unter dem konfokalen Laser Scanning Mikroskop war wiederum nur eine im wesentlichen homogene rote Fläche sichtbar, aus der NeuN gefärbte Strukturen herausstachen (Abb. 6B). Einzelne Strukturen waren nicht deutlich abgrenzbar. Besonders Axone und Dendriten waren auf diese Weise nicht erkennbar. Anschließend wurden die Waschvorgänge auf ein Minimum reduziert und die Inkubation der Dil gefärbten OHSC mit Antikörpern gegen NeuN und dem Fluoreszenzantikörper Alexa 488 modifiziert (siehe Material und Methoden).

Erst das Färbeprotokoll, wie es unter Material und Methoden beschrieben ist, führte zu folgenden Ergebnissen:

In den OHSC der Kontrollgruppe sind insgesamt wenige mit Dil markierte Neurone zu beobachten, die eine komplette Projektion aus dem entorhinalen Kortex in den Gyrus dentatus zeigen. Die Anfärbung der Dendriten mit Dil gelingt genauso wie in der reinen Dil-Färbung (Abb. 4A). Zusätzlich zeigen die Neurone eine zytoplasmatische Anfärbung mit NeuN (Abb. 5A), die sich in der Mischfarbe Gelb aus dem roten Dil- und dem grünen NeuN-Signal ergibt (Abb. 7A). Somit ist gezeigt, dass es sich bei dem retrograd mit Dil markierten Perikaryon im entorhinalen Kortex um ein Neuron handelt, das in den Gyrus dentatus projiziert. Die Länge des Axons beträgt ca. 700 μm bei einem Durchmesser von 2,5-5 μm . Der Durchmesser des Perikaryons beträgt ca. 20 μm . Die Morphologie des Neurons zeigt die typischen Charakteristika einer multipolaren Nervenzelle, die einen ausgedehnten Dendritenbaum aufweist und deren Axon mehrere Kollateralen abgibt. Im Bereich der Axonendigung wird nochmals eine vielgliedrige Verzweigung sichtbar.

In den OHSC der Versuchsgruppe, die mit MMF behandelt wurde, sind mehr Dil markierte entorhinale Projektionen in den Gyrus dentatus nachweisbar (Abb. 4B) und auch die Zahl Dil-NeuN doppelt markierter Perikaryen ist höher (Abb. 5B und 7B). Hier erscheint das Fluoreszenzsignal von NeuN ebenfalls vorwiegend im Zytoplasma, zunehmend ist aber auch eine Anfärbung des Zellkerns zu beobachten. Die Dil positiven Axone und die Dil-NeuN doppelmarkierten Perikaryen liegen dichter. Das gekennzeichnete Axon hat eine Länge von ca. 400 μm und einen Durchmesser von 1,8-5 μm . Der Durchmesser des

zugehörigen Perikaryons beträgt ca. 16 μm . Auf Grund der Morphologie lässt sich das markierte Neuron als multipolare Nervenzelle charakterisieren.

3.4 Einfluss von Mofetil auf die Anzahl doppelmarkierter Neurone im entorhinalen Kortex

Das Areal, welches analysiert wurde, enthält den entorhinalen Kortex mit Prä- und Parasubiculum. In diesem Areal wurden alle Dil/NeuN doppelmarkierten Zellen gezählt. Es ergab sich für die Kontrollgruppe eine Anzahl von 1,29 doppelmarkierten Neuronen pro OHSC. In den mit MMF behandelten OHSC wurden 24,5 Neurone gezählt, die eine Fluoreszenz für Dil und NeuN aufwiesen (Abb. 8). Für die Kontrollgruppe wurden 28 OHSC ausgewertet, für die mit MMF behandelte Gruppe 20 OHSC.

3.5 Versuch der retrograden Markierung des Tractus perforans mit Mini Ruby in lebenden OHSC

Bei der Betrachtung der mit Mini Ruby gefärbten OHSC fielen vor allem Konglomerate dieses Farbstoffes auf, die sich in ihrer höchsten Dichte in der Nähe der Platzierungszone des Mini Ruby Kristalls fanden und deren Anzahl mit zunehmenden Abstand abnahmen. Bei diesen Konglomeraten könnte es sich um phagozytierende Zellen wie Mikrogliazellen in runder amöboider Konfiguration handeln.

Weiterhin waren vereinzelte angefärbte Axone zu beobachten, die vom Gyrus dentatus in den entorhinalen Kortex verliefen, plötzlich aber das Mini Ruby Signal verloren und deshalb nicht zum Ursprungperikaryon zurückverfolgt werden konnten. Häufig wurden axonale Strukturen sichtbar, die keine sichtbare

Verbindung zu einem Perikaryon zeigten. Seltener war ein Perikaryon mit positivem Mini Ruby Signal zu sehen. Die Morphologie der markierten Zellen zeigte einige charakteristische Eigenschaften von Nervenzellen. So konnte z.B. eindeutig ein Axonhügel dargestellt werden. An anderer Stelle war die typische Morphologie multipolarer Nervenzellen erkennbar, mit ausgedehntem und weit verzweigtem Dendritenbaum. Ein Axon konnte jedoch nicht zweifelsfrei identifiziert werden. Eine durchgehende Anfärbung des Tractus perforans mit Mini Ruby war nicht zu erreichen (Abb. 9, Abb. 10A-C, Abb. 11A-C).

4 Diskussion

4.1 Erfolgreiche retrograde Markierung des Tractus perforans mit Dil

In dieser Arbeit haben wir die OHSC als Versuchsmodell gewählt. Eine entscheidende Voraussetzung für unsere Versuche zur Etablierung der retrograden Markierung des Tractus perforans mit Dil ist, dass der Fasertrakt bei der Präparation der Schnittkultur erhalten bleibt (Amaral et al., 1995) und für Fragen, die die neuronale Konnektivität betreffen, herangezogen werden kann. Dil ist ein etablierter Farbstoff für die Markierung von Neuronen und Fasertrakten (Honig et al., 1989) und wurde in fixiertem ZNS-Gewebe für die anterograde und retrograde Markierung bereits erfolgreich eingesetzt (Godement et al., 1987). Die anterograde Markierung des Tractus perforans mit Dil ist in vivo (Tamamaki et al., 1999) und in vitro (Woodhams et al., 2000) nachgewiesen. Außerdem wurden hippocampale Cajal-Retzius-Zellen an ganzen fixierten Gehirnen embryonaler und postnataler Ratten anterograd und retrograd mit Dil angefärbt (Ceranik et al., 1999). Auch in unseren Experimenten hat sich Dil als geeigneter Farbstoff für die Markierung einzelner Fasertrakte und Neurone über weitere Strecken bewährt.

4.2 Diffusionswege von Dil

Dil breitet sich als lipophiler Farbstoff in fixiertem Gewebe ausschließlich durch Diffusion aus und kann den synaptischen Spalt zwischen Axonen und Dendriten oder Perikaryen direkt passieren (Fritsch et al., 1990; Amaral et al., 1995). Der Farbstoff reichert sich in allen Lipidmembranen gleich welcher Zelle an.

Betrachtet man die Anordnung unseres Versuchsmodells, haben diese Eigenschaften von Dil keinen negativen Einfluss auf das Versuchsergebnis. Erstens bestehen Axone aus hochkomplexen Lipidmembranen, die dem Farbstoff Dil als Leitschiene dienen und zu einer Akkumulation in diesen Strukturen führen. Zweitens gibt es nur eine Projektion aus dem entorhinalen Kortex in den Gyrus dentatus: den Tractus perforans (Amaral et al., 1995). Wird Dil in unserem Modell im Hilus des Gyrus dentatus in Kristallform platziert, kann Dil nur retrograd entlang des Tractus perforans diffundieren und zur retrograden Anfärbung entorhinaler Neurone führen. Eine Anfärbung entorhinaler Neurone wäre natürlich auch durch polysynaptische Verbindungen denkbar. So verbinden die sogenannten Moosfasern den Gyrus dentatus mit dem Unterfeld CA3 des Cornu ammonis. Dazu existiert eine Projektion aus dem entorhinalen Kortex in das Unterfeld CA3 des Cornu ammonis. Über die sogenannten Schaffer Kollateralen besteht von CA3 eine efferente Verbindung zu dem Unterfeld CA1 des Cornu ammonis. CA1 ist wiederum über afferente und efferente Projektionen mit dem entorhinalen Kortex verbunden. Zusätzlich besteht eine Efferenz von CA1 zum Subiculum, das über direkte oder indirekte Efferenzen über Para- und Praesubiculum mit dem entorhinalen Kortex verbunden ist. Theoretisch wäre also bei unserer Versuchsanordnung, mit Platzierung des Dil-Kristalls im Hilus des Gyrus dentatus, eine anterograde Färbung des Tractus perforans über die soeben beschriebenen Verschaltungen innerhalb der hippocampalen Formation möglich. Die retrograde Anfärbung des Tractus perforans ist aber

wahrscheinlicher, da sie den kürzesten Weg darstellt und keine synaptischen Verbindungen passieren muß.

4.3 Identifizierung retrograd mit Dil angefärbter entorhinaler Neurone mit dem Antikörper NeuN

Der Einsatz von Dil bei retrograden Färbetechniken in geschnittenem Gewebe kann problematisch sein. Ist eine große Anzahl von Neuronen oder Axonen durch die Schnittfläche beschädigt und sind die Membranen in ihrer Integrität gestört, kann die Diffusion von Dil außerhalb von Membranen das Färbeergebnis negativ beeinflussen. Dieses Phänomen tritt in der Regel selten auf, wenn die Schichtdicke im Verhältnis zu den Strukturen, die gefärbt werden, ausreichend ist (Honig et al., 1989) und die Strukturen im Inneren der OHSC unversehrt bleiben. Diese Bedingungen waren bei unseren retrograden Anfärbungen des Tractus perforans erfüllt. Die Schichtdicke der verwendeten OHSC lag bei 350 µm und somit weit über dem Durchmesser von Axonen und Neuronen.

Probleme traten jedoch bei der Kombination von Dil-Markierung und NeuN-Färbung auf. Die ersten Bilder der Dil/NeuN-Doppelfärbung legten eine zu starke Diffusion von Dil nahe. Daraufhin wurde das Versuchsprotokoll modifiziert, mit dem im Methodenteil geschilderten Ergebnis kontrastreicher Anfärbungen von Axonen und Neuronen. Alle Faktoren, die eine starke Dil-Diffusion begünstigen könnten wurden in der Folge auf ein Minimum reduziert. Dazu gehört die Verwendung von Triton bei jeglichen Inkubationsschritten, da Triton die Membranpermeabilität steigert und möglicherweise Dil aus den Zellmembranen löst. Zusätzlich wurden die Antikörperlösungen von NeuN und Alexa 488

räumlich durch die permeable Membran der Kultureinsätze von den OHSC getrennt und die obligatorischen Spülvorgänge einer immunhistologischen Färbung auf ein Minimum reduziert. Während der 10 Tage andauernden Färbeprozedur war die OHSC also nicht von Antikörperlösung bedeckt, sondern einseitig der Membran aufliegend von Raumluft umgeben. Dies verhinderte das Austreten und ungerichtete Verteilen von Dil durch Lösungs- und Spüleffekte. Der Erfolg des endgültigen Versuchsprotokolls hat die Wirksamkeit dieser Maßnahmen bestätigt.

4.4 Mofetil führt zu einer erhöhten Anzahl doppelmarkierter Neurone im entorhinalen Kortex

Unsere Versuche sollten den Effekt von MMF auf den Erhalt neuronaler Strukturen untersuchen. Zu diesem Zweck wurde die Zahl doppelmarkierter Neurone in der Kontroll-Gruppe und der MMF-Gruppe miteinander verglichen. Die Hypothese lautete, dass die Zahl der doppelmarkierten Neurone durch die Behandlung mit MMF im Vergleich zur Kontrolle zunehmen würde, da die Behandlung mit MMF den Erhalt des Tractus perforans fördern sollte. Dieser Gedanke stützte sich auf Untersuchungen, die den Einfluß von MMF (Dehghani et al., 2003) und Clodronat (Kohl et al., 2003) auf die Anzahl aktivierter Mikrogliazellen und in der Folge auf das neuronale Überleben im Gyrus dentatus in zuvor NMDA-geschädigten OHSC analysiert haben. Der Einsatz von Clodronat führte zur weitgehenden Ablation der Mikrogliazellen-Population und beeinflusste das neuronale Überleben negativ. MMF hat zwar auf die Mikrogliazellen einen geringeren hemmenden Effekt als Clodronat, steigert aber

die Anzahl überlebender Neurone im Sinne eines neuroprotektiven Effektes von MMF. In Versuchen an neuronalen Einzelzellkulturen konnte eine rezeptormodulierende Eigenschaft von MMF festgestellt werden (Yabaluri et al., 1995). Die Verringerung des intrazellulären Guanosin triphosphat (GTP)-Pools führte zu einer deutlichen Erhöhung der Bindungsaffinität des Agonisten am μ -selektiven Opioid-Rezeptor, während die Bindungsaffinität des Antagonisten nicht verändert wurde. In diesem Zusammenhang wäre eine durch MMF veränderte Reaktion neuronaler Zellen auf inflammatorische Prozesse im Rahmen des Sekundärschadens denkbar. Untersuchungen mit MMF an Neuroblastomzelllinien zeigten, dass MMF vor allem bei dopaminergen Zelllinien die Differenzierung zu neuronalen Zellen fördert, aber gleichzeitig einen antiproliferativen Effekt mit abnormalem Neuritenwachstum hat (Messina et al., 2005). In unseren Experimenten hat sich die Vermutung bestätigt, dass MMF einen positiven Effekt auf das neuronale Überleben hat, da die Anzahl doppelmarkierter Neurone im entorhinalen Kortex der MMF-Gruppe deutlich höher war als in der Kontrollgruppe.

4.5 Rolle der Mikrogliazellen und Makrophagen nach Schädigung des ZNS

Ergebnisse experimenteller Studien geben unterschiedliche Antworten auf die Frage, ob die Aktivierung von Mikrogliazellen und Makrophagen innerhalb der pathophysiologischen Abläufe nach einer Schädigung des Nervensystems das neuronale Überleben positiv oder negativ Effekte hat.

Es gibt eine ganze Reihe von Untersuchungen, die auf eine positive Wirkung von Mikrogliazellen und Makrophagen nach Schädigung des ZNS hinweisen:

Aktiviert Mikroglia haben in der akuten und postakuten Phase von Erkrankungen des ZNS die Aufgabe, Debris zu phagozytieren oder eingedrungene Krankheitserreger abzuwehren. Besonders wichtig sind die antigenpräsentierenden Eigenschaften und die Fähigkeit der Phagozytose der Mikrogliazellen für die Bekämpfung von infektiösen Erkrankungen des ZNS (Schlüter et al., 1998). Verschiedene Versuchsmodelle bedienten sich des Einsatzes von in vitro prästimulierten Mikrogliazellen oder Makrophagen. Diese Zellen zeichneten sich durch verstärkte Phagozytose und Freisetzung des zytotoxischen Stickstoffmonoxid (NO) aus (Zeev-Brann et al., 1998; Zhao et al., 1998). Durch die Applikation von mit peripherem Nervengewebe inkubierten Makrophagen wurde bei der Ratte eine Regeneration des vorher durchtrennten Nervus opticus erzielt (Lazarov-Spiegler et al., 1996; Lazarov-Spiegler et al., 1998). Waren die Makrophagen hingegen mit Gewebe des Nervus opticus vorinkubiert, blieb der regenerative Effekt aus. In vivo wurde Ratten, die eine spinale Läsion erhalten hatten, mit peripherem Nervengewebe präinkubierte Makrophagen implantiert. Nach Applikation der Makrophagen in das Läsionsgebiet zeigte sich auch hier eine verstärkte Regeneration der Axone und eine damit verbundene Verbesserung der motorischen Funktion der betroffenen Gliedmaßen (Rapalino et al., 1998). Weitere Experimente haben die Einbringung von Mikrogliazellen in lädiertes ZNS Gewebe untersucht. Die Implantation von Mikrogliazellen an den Läsionsort der durchtrennten spinalen Hinterwurzel hat

eine verstärkende Wirkung auf die Regeneration sensorischer Axone gezeigt (Prewitt et al., 1997). Die Implantation von kultivierten Mikrogliazellen in verletztes Rückenmark von adulten Ratten verstärkte ebenfalls das Neuritenwachstum (Rabchevsky et al., 1997).

Dies wurde auf die mikrogliale Freisetzung von Laminin, einem Baustein der Extrazellulärmatrix, zurückgeführt. Andere Untersuchungen haben sich mit der Sekretion neurotropher Substanzen durch Gliazellen beschäftigt. Dabei könnten das Neurotrophin (NT)-3 oder die neurotrophen Faktoren Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) und Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) Substanzen darstellen, mit denen Mikrogliazellen axonales Wachstum unterstützen (Nakajima et al., 2001).

TNF- α , ein proinflammatorisch wirkendes Zytokin, das von Mikrogliazellen und Makrophagen sezerniert wird, kann scheinbar auch eine protektive Wirkung auf neuronales Gewebe haben. Versuche zum neuronalen Schaden nach Ischämie, die mit TNF- α knockout Mäusen durchgeführt wurden, hatten im Vergleich zur Kontrolle einen verstärkten Untergang neuronaler Zellen zur Folge (Bruce et al., 1996). Untersuchungen an IL-1/TNF- α single und double knockout Mäusen zeigten bei TNF- α defizienten Tieren eine durch neurotoxisches NO induzierte, deutlich stärker ausgeprägte neuronale Schädigung als bei normalen Mäusen (Turrin & Rivest, 2006).

Andere Untersuchungen weisen hingegen auf eine negative Wirkung von Mikrogliazellen und Makrophagen auf den Erhalt von Neuronen bzw. die Regeneration von Axonen in geschädigtem ZNS Gewebe hin.

In diesem Zusammenhang wird unter anderem die zytotoxische Wirkung von Mikrogliazellen/Makrophagen diskutiert. Beobachtungen, die ein zeitliches Zusammenfallen der Demyelinisierung noch unbeschädigter Axone und der maximalen Einwanderung von Makrophagen in das geschädigte ZNS beschreiben, unterstützen diese Sichtweise und weisen auf eine Beteiligung von Mikrogliazellen/Makrophagen an der Sekundärschädigung des Nervengewebes hin (Blight, 1992). Die Hemmung der inflammatorischen Prozesse, getragen durch Mikrogliazellen/Makrophagen, und in der Folge die Reduzierung der Anzahl dieser Zellen, führte zu einer verminderten Schädigung im ZNS (Carlson et al., 1998; Chopp et al., 1994). Ein weiteres Experiment, welches die Beteiligung von Makrophagen an der Sekundärschädigung unterstützt, zeigte eine erhöhte Anzahl myelinisierter Axone im Schädigungsgebiet nach Makrophagen-eliminierung (Blight et al., 1992). Proinflammatorische Zytokine wie $\text{TNF-}\alpha$, IL-1 (Frei et al., 1987; Acarin et al., 2000; Eriksson et al., 2000), NO oder freie Radikale (Chao et al., 1992; Possel et al., 2000) sind die Instrumente, mit denen Mikrogliazellen und Makrophagen im Konzert der Sekundärschädigung aufspielen. Kokulturen von Neuronen und Mikrogliazellen haben die schädigende Wirkung von Mikrogliazellen im Rahmen der Sekundärschädigung unterstrichen (Kim et al., 1998). $\text{TNF-}\alpha$ zeigte in vitro eine zerstörende Wirkung auf Oligodendrozyten und Myelin und führte zu einem

verstärkten neuronalen Schaden nach Ischämie (Selmaj et al., 1988; Barone et al., 1997). Eine Reihe von Experimenten, die den Sekundärschaden durch Unterdrückung und Eliminierung von Mikrogliazellen und Makrophagen zu vermindern versuchen - und folglich auch die Produktion schädigender Zytokine und Mediatoren verhindern - unterstützen die Hypothese der schädlichen Wirkung monozytärer Zellen in der Pathologie des spinalen Traumas.

Exzitotoxisch geschädigte Schnittkulturen wurden mit dem Immunsuppressivum MMF behandelt. Dieser pharmakologischen Intervention folgte eine starke Reduktion der Mikrogliazellzahl mit einer erhöhten neuronalen Überlebensrate (Dehghani et al., 2003). Die Behandlung geschädigter Schnittkulturen mit dem Überstand von Astrozyten führte zu verminderter mikroglialer Aktivität und reduziertem neuronalem Schaden (Hailer et al., 2001). Astrozytäre Faktoren induzieren in kultivierten Mikrogliazellen den Ruhezustand. Es kam zur Ramifizierung der Mikrogliazellen, zur verminderten Expression von Adhäsionsmolekülen sowie zur eingeschränkten Sekretion proinflammatorischer Zytokine (Eder et al., 1999; Schilling et al., 2001). Ähnliche Untersuchungen an kultivierten Mikrogliazellen haben gezeigt, dass nur Astrozytenüberstand in der Lage ist, Mikrogliazellen in den inaktiven Zustand zu überführen, der mit einer ramifizierten Morphologie und verminderter Expression von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1 und Zytokinen wie IL-1 β und TNF- α einhergeht. Zytokine, wie IL-4, IL-10 und der IL-1-ra, hingegen haben nur eine ramifizierende Wirkung auf kultivierte Mikrogliazellen, ohne zu einer Sekretionsminderung proinflammatorischer Zytokine zu führen (Wirjatijasa et al., 2002). Hier wird

deutlich, wie kompliziert die molekularen Steuerungs-mechanismen im Einzelnen sind. Der Versuch, die Aktivität der Mikrogliazellen durch einen Eingriff in selektierte Signalkaskaden zu steuern, muß kritisch gesehen werden.

Experimente, in denen mit NMDA geschädigte OHSC mit MMF (Dehghani et al., 2003) oder Clodronat (Kohl et al., 2003) behandelt wurden, führten unter Clodronat zur vollständigen Ablation der Mikrogliazellen, unter MMF nur zur partiellen Unterdrückung der Mikrogliazellen. Unter Clodronat kam es im Vergleich zur Behandlung mit MMF zu einem schlechteren neuronalen Strukturerehalt (Dehghani et al., 2003).

Wie in den Versuchen von Dehghani et al. haben wir unsere OHSC mit MMF inkubiert, um nur eine partielle Unterdrückung der Mikrogliazellen zu erreichen. Allerdings haben wir keine exzitotoxische Schädigung der OHSC vorgenommen, sondern die Präparation als schädigendes Ereignis angenommen und die OHSC über die gesamte Kulturdauer mit MMF inkubiert. Die Ergebnisse unserer Arbeit unterstützen die These, dass eine maßvolle Hemmung der Mikrogliazellen dem neuronalen Erhalt zuträglich ist.

Es ist sicherlich unlogisch, Makrophagen und Mikrogliazellen als verzichtbar im Rahmen der pathophysiologischen Abläufe der spinalen Kompression anzusehen. Sie gehören zu den wichtigen Zellen, die ein günstiges Milieu für das Nervengewebe schaffen, im Falle eines Schadens an der Debrisbeseitigung entscheidend beteiligt sind, neurotrophe Faktoren sezernieren und nach einem Schaden die Homöostase wiederherstellen. Andererseits zeigen sie in aktivierter

Form schädigendes Potential im Rahmen des Sekundärschadens und ihre teilweise Hemmung führte zu einem besseren strukturellem Erhalt der OHSC

4.6 Versuche der retrograden Markierung des Tractus perforans mit Mini Ruby

Die retrograde Markierung des Tractus perforans mit Mini Ruby gelingt in OHSC nicht. Obwohl vorausgegangene Experimente bei der anterograden Anfärbung des Tractus perforans vom entorhinalen Kortex in den Gyrus dentatus Erfolg zeigten (Kluge et al., 1998), gelingt eine durchgängige Anfärbung und die Darstellung entorhinaler Neurone auf retrogradem Wege nicht. In diesem Zusammenhang muß auf den Mechanismus der Färbung mit Mini Ruby hingewiesen werden. Mini Ruby wird durch axonale Transportvorgänge aktiv transportiert. Da die anterograden Transportvorgänge im Axon wesentlich schneller ablaufen als die retrograden, ist hier die Problematik des Versuchansatzes mit retrograder Färbung zu sehen.

4.7 Schlussfolgerung und Ausblicke

Die retrograde Anfärbung des Tractus perforans mit Dil in der OHSC wurde in unserem Versuchsmodell erfolgreich etabliert. Die Behandlung dieser Kulturen mit MMF zeigte einen positiven Effekt auf das neuronale Überleben. Die Untersuchung des Tractus perforans und entorhinaler Neurone in der OHSC unter Verwendung von MMF bietet weitere interessante Ansätze. So wäre es denkbar, den entorhinalen Kortex durch einen Schnitt vom Hippocampus zu trennen, um beide Teile aneinander gefügt zu kultivieren. Regenerationsexperimente mit MMF und einer retrograden Markierung ließen

auf diese Weise Rückschlüsse auf den Strukturerhalt und Regenerationstendenzen in der Kontroll- bzw. der MMF-Gruppe zu.

Ein weiterer Versuchsansatz, der speziell auf die Regeneration corticospinaler Bahnen abzielt, wäre die Kokultivierung von kortikalen mit spinalen Schnitten, kombiniert mit der Gabe von MMF.

Schließlich müssen in vivo Experimente durchgeführt werden, in denen Versuchstiere nach Läsion mit MMF behandelt werden und anschließend mit den hier beschriebenen Techniken untersucht werden. Bei diesem Versuchsansatz wäre es möglich, funktionelle Veränderungen am lebenden Organismus und strukturelle Veränderungen von komplexen Fasertrakten am histologisch aufgearbeiteten Nervengewebe zu verschiedenen Zeitpunkten zu betrachten.

5 Anhang

5.1 Abbildungen

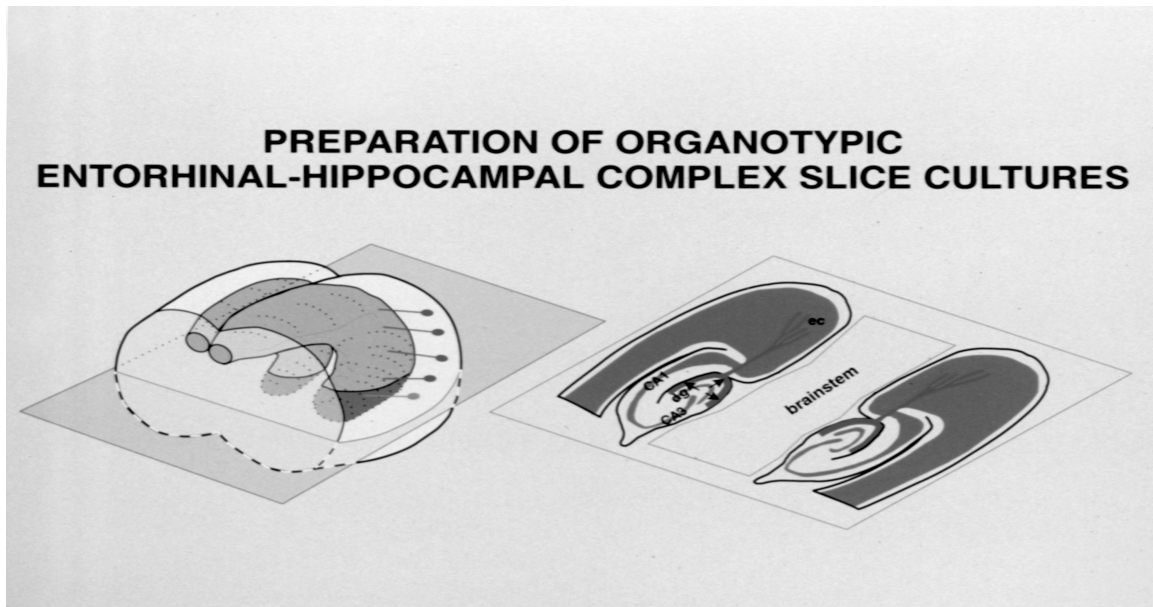


Abb. 1 (nach Kluge et al., 1998, Hippocampus 8, 57-68): In dieser Abbildung wird die Schnittebene deutlich, die für Herstellung der OHSC zur Anwendung kommt. Das Frontalhirn und das Kleinhirn sind rechts bereits abgetrennt. Die verbleibenden Hirnanteile enthalten somit unter anderem den Hippocampus, den entorhinalen Kortex sowie den Tractus perforans. Bei der Präparation werden Schnitte mit einer Dicke von 350 μm angefertigt, wobei die Schnittebene in posterior-anteriorer Richtung einen parallel zum Tractus perforans verlaufenden Neigungswinkel von ca. 10° aufweist. Die Stecknadeln im linken Bildteil sollen die Schnittebene veranschaulichen. Weit ventral und dorsal gelegene Schnittebenen müssen verworfen werden, da sie den Tractus perforans nur in angeschnittener Form enthalten.

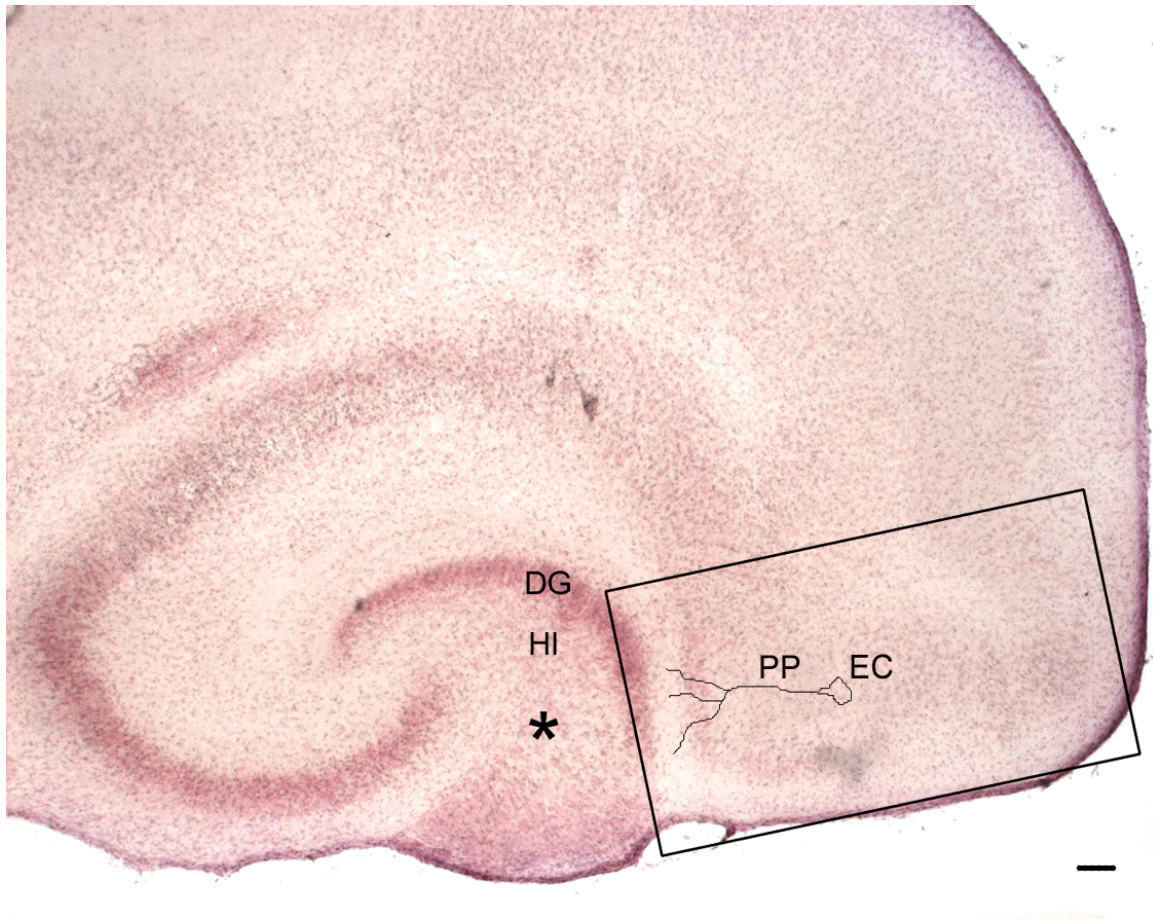


Abb. 2A: Übersicht über eine am Kryostat geschnittene und mit Hematoxylin gefärbte OHSC. Der Schwarze Kasten umrahmt das Areal in dem der Tractus perforans untersucht wurde. Dil/NeuN doppelmarkierte Neurone wurden innerhalb dieses Kastens mit Hilfe des Laser Scanning Mikroskops dargestellt und ausgezählt. DG, Gyrus dentatus; EC, entorhinaler Kortex; HI, Hilus; PP, Tractus perforans; *, Platzierungsstelle des Dil-Kristalls; Skalierung: 100 μm .

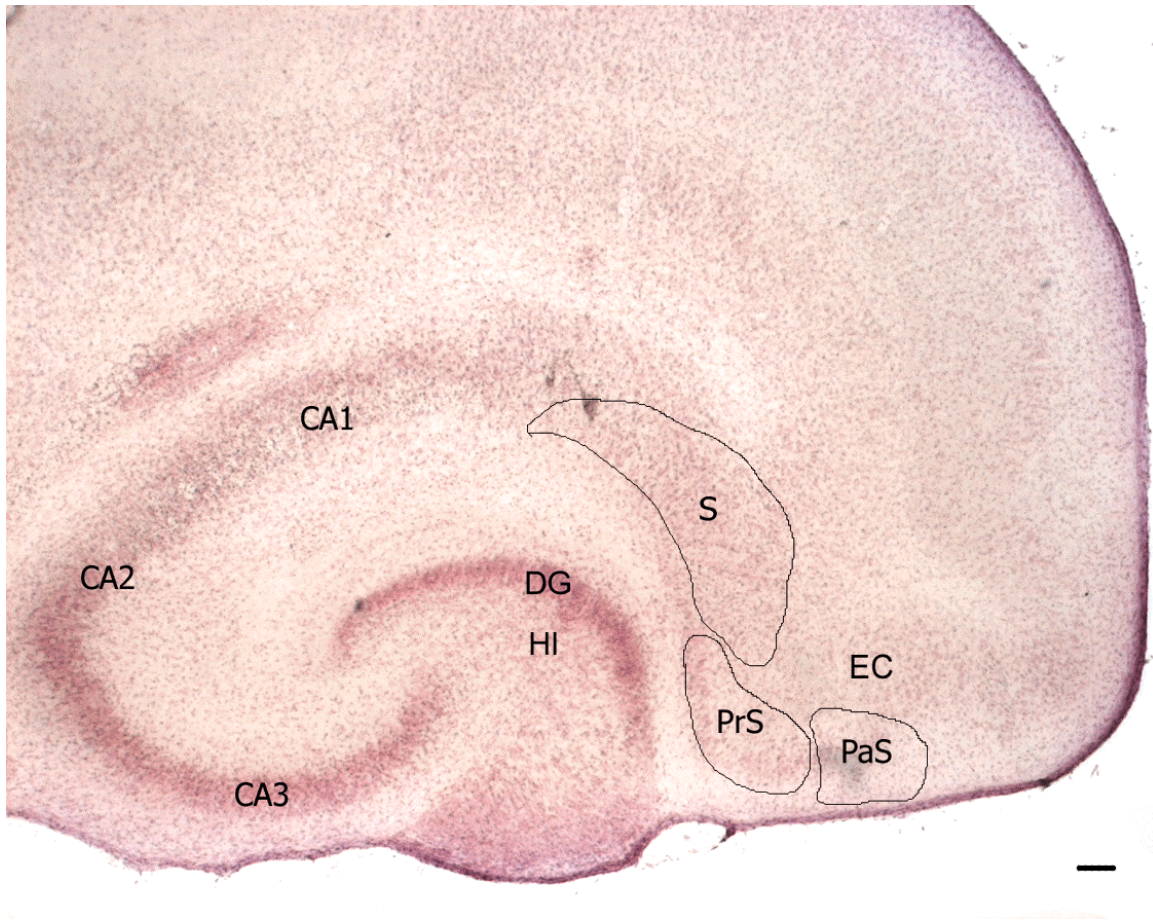


Abb. 2B: Die Hematoxylinfärbung dieser Kontroll-OHSC zeigt, dass die Zytoarchitektur der entorhinalen-hippokampalen Formation gut erhalten ist. Die Körnerzellschicht des Gyrus dentatus ist intakt und die Felder CA1, CA2 und CA3 des Cornu ammonis sind abgrenzbar. Die Schichtung des entorhinalen Kortex ist ebenfalls erhalten. DG, Gyrus dentatus; HI, Hilus; EC, entorhinaler Kortex; S, Subiculum; PrS, Praesubiculum; PaS, Parasubiculum; CA1, CA2 und CA3, Felder des Cornu ammonis; Skalierung: 100 μ m.

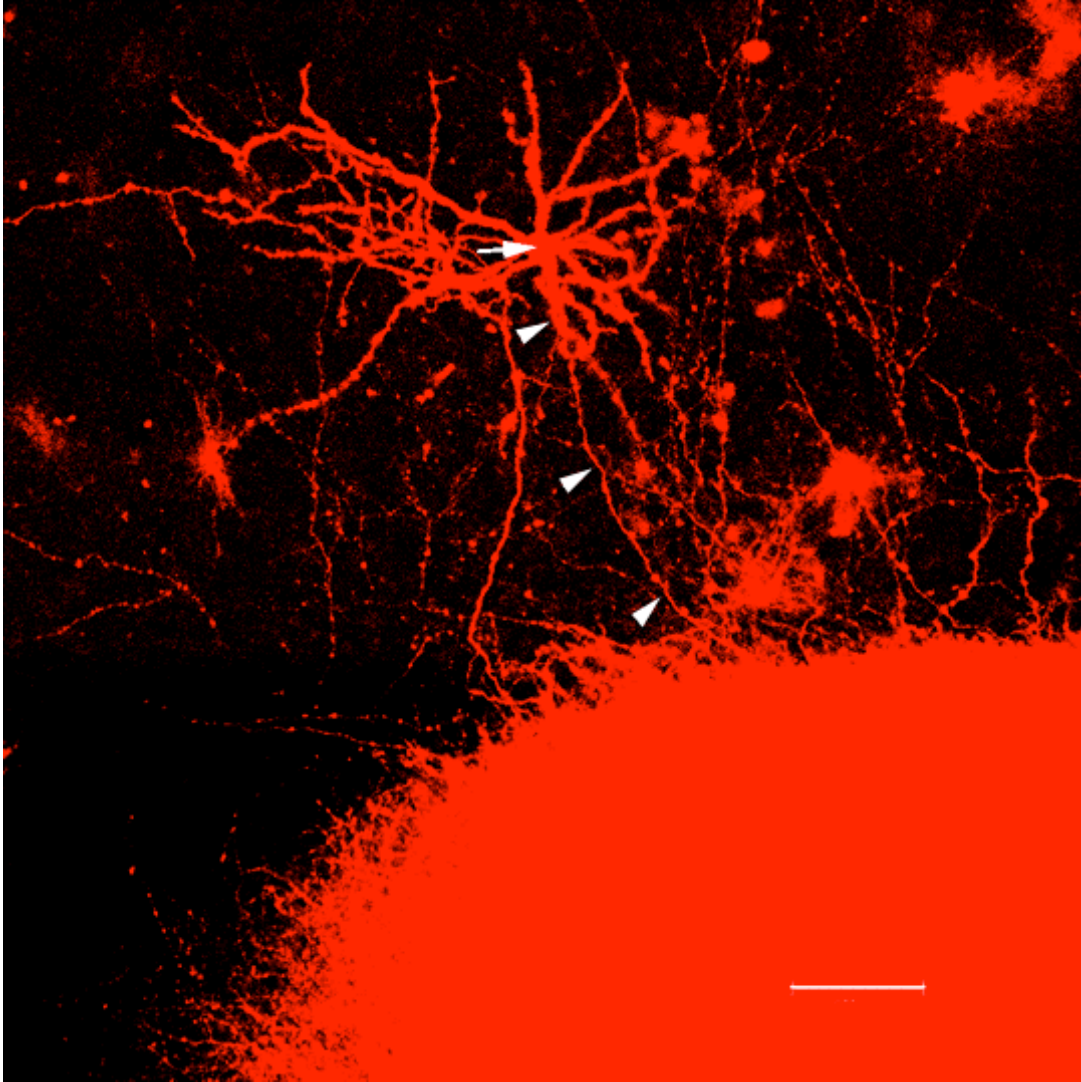


Abb. 3A: OHSC, die für 9 div in Kontrollmedium kultiviert wurde. Anschließend wurde ein Dil Kristall im Hilus des Gyrus dentatus platziert, um den Tractus perforans retrograd anzufärben. Deutlich ist ein mit Dil markiertes entorhinales Neuron (Pfeil) mit dem dazugehörigen Axon (Pfeilspitzen) sichtbar. Die homogene rote Fläche im rechten unteren Bildquadranten zeigt die Ausbreitung des Dil Kristalles im Gyrus dentatus. Der Hilus, das Areal, in dem das Dil Kristall aufgetragen wurde, ist hier nicht abgebildet. Skalierung: 100 μm .

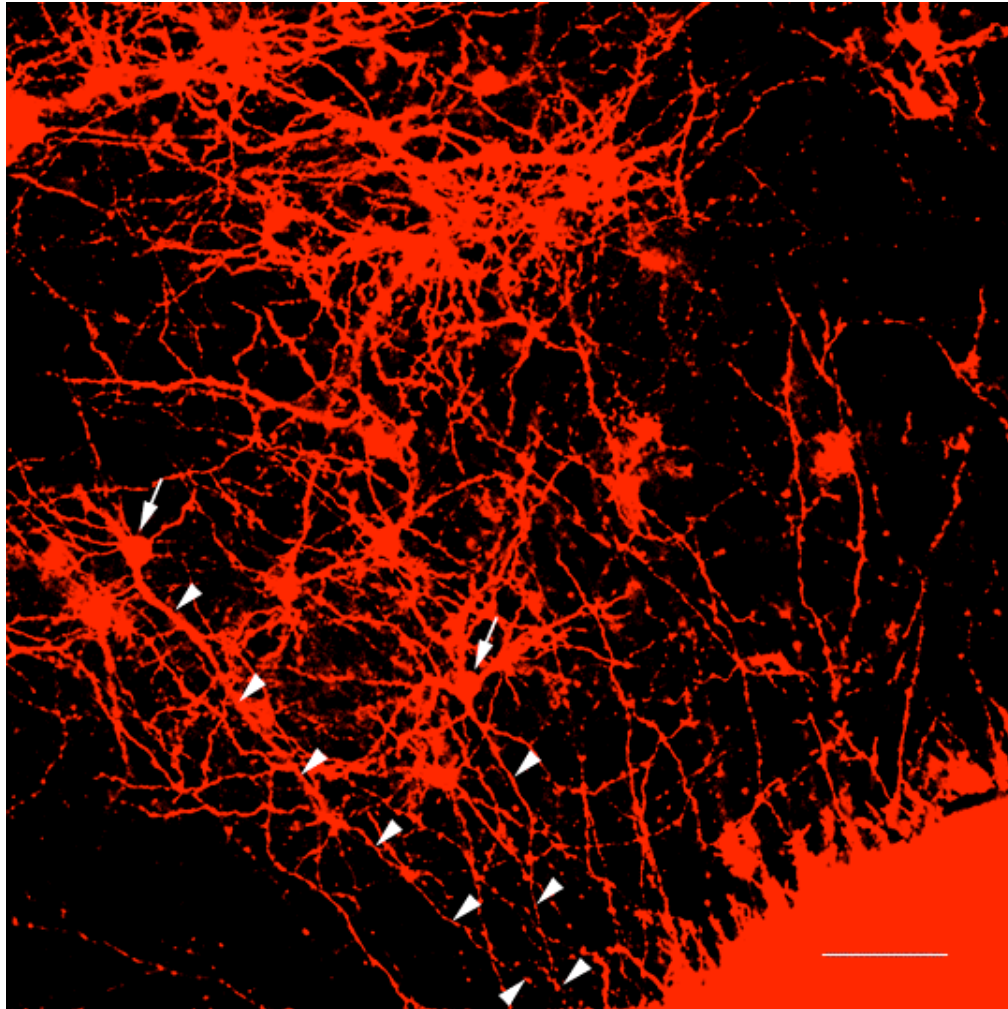


Abb. 3B: OHSC, die für 9 div in Kulturmedium mit MMF (100 $\mu\text{g/ml}$) kultiviert wurde. Auch hier ist eine retrograde Markierung des Tractus perforans mit Dil auf die gleiche Weise wie in 2A vorgenommen worden. Zwei Neurone sind mit Pfeilen markiert, die Axone mit Pfeilspitzen. Gut erkennbar ist das dichte Netzwerk aus Axonen und Dendriten. Die homogene rote Fläche im rechten unteren Bildquadranten zeigt einen Teil des Gyrus dentatus. Der Hilus, das Areal, in dem das Dil Kristall aufgetragen wurde, ist hier nicht abgebildet. Skalierung: 100 μm .

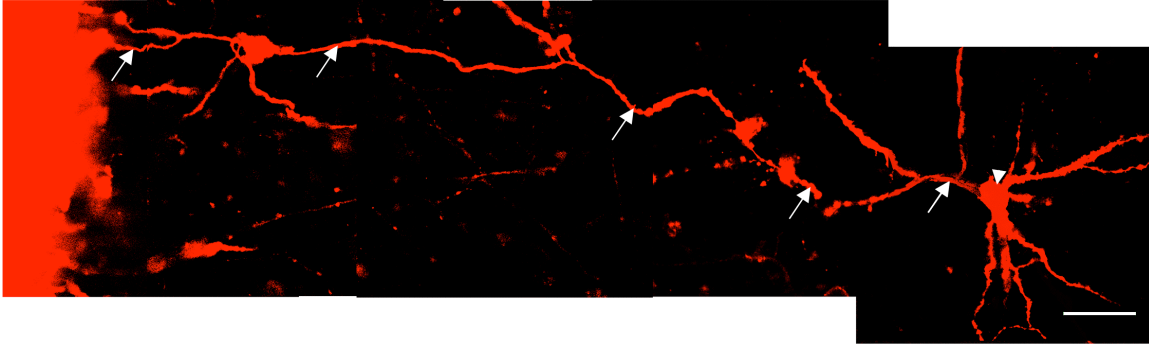


Abb. 4A: OHSC, die für 9 div in Kontrollmedium kultiviert wurde. Der Tractus perforans wurde retrograd mit Dil angefärbt. Ein mit Dil markiertes Axon (Pfeile) kann ausgehend vom Gyrus dentatus bis zu seinem Dil markierten Perikaryon (Pfeilspitze) zurückverfolgt werden. Am linken Bildrand wird in Form einer homogenen roten Fläche ein kleiner Teil des Gyrus dentatus sichtbar. Der Hilus, das Areal, in dem das Dil Kristall aufgetragen wurde, ist hier nicht abgebildet. Skalierung: 50 μm .

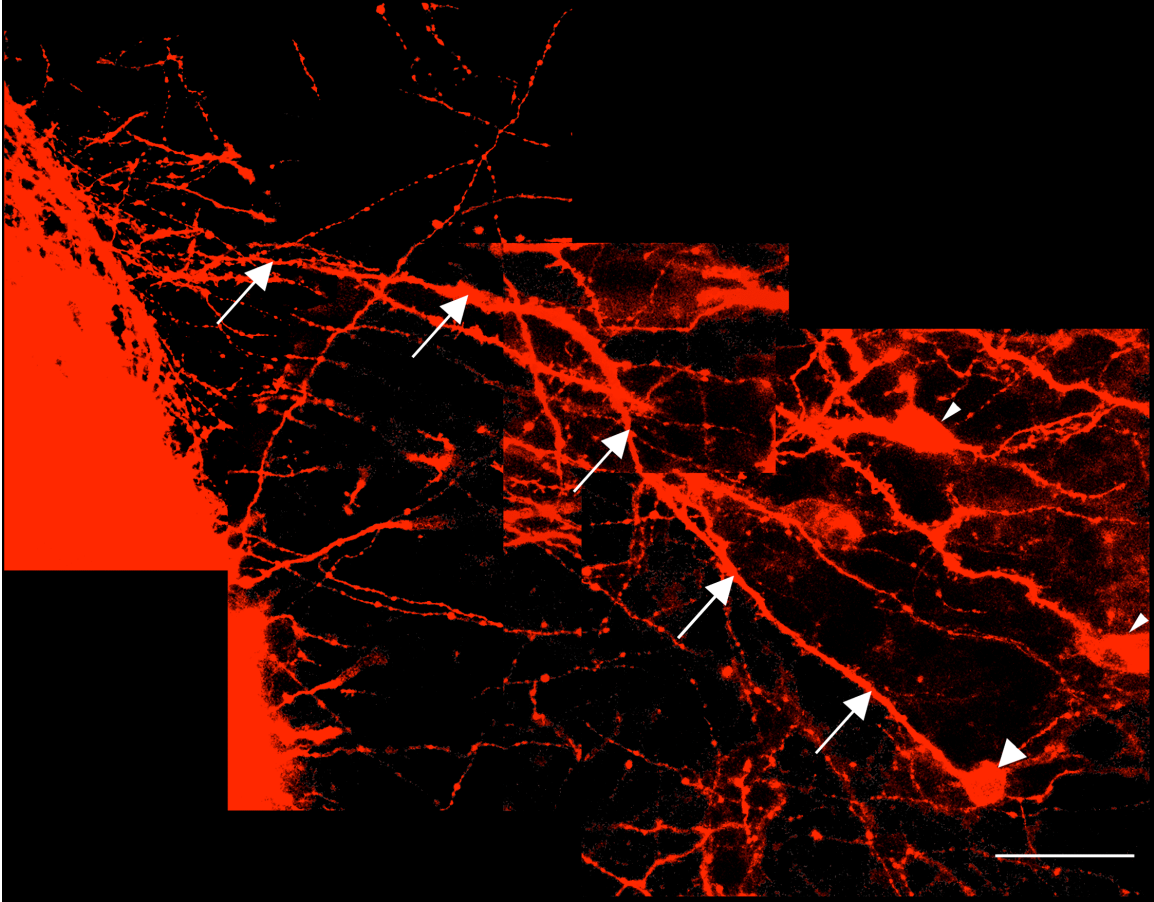


Abb. 4B: OHSC, die für 9 div in Kulturmedium mit MMF (100 $\mu\text{g/ml}$) kultiviert wurde. Die retrograde Markierung des Tractus perforans mit Dil markierte ein Perikaryon (Pfeilspitze) und ein durchgehendes Axon (Pfeile), das zum Gyrus dentatus zieht. Hier sind zusätzlich viele beieinander liegende Axone und zwei weitere Dil positive Perikaryen (kleine Pfeilspitzen) zu sehen. Am linken Bildrand wird in Form einer homogenen roten Fläche ein kleiner Teil des Gyrus dentatus sichtbar. Der Hilus, das Areal, in dem das Dil Kristall aufgetragen wurde, ist hier nicht abgebildet. Skalierung: 50 μm .

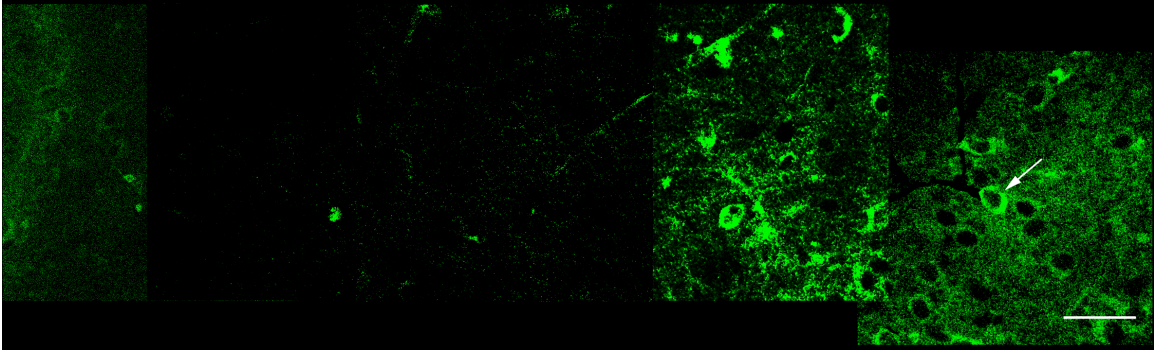


Abb. 5A: OHSC, die für 9 div mit Kontrollmedium kultiviert wurde. Die Färbung mit Antikörpern gegen NeuN resultierte in einer starken zytoplasmatischen Färbung von entorhinalen Neuronen (Pfeil). Am linken Bildrand wird ein kleiner Teil des Gyrus dentatus sichtbar. Es handelt sich um das selbe Präparat wie in 4A und 6A. Skalierung: 50 μm .

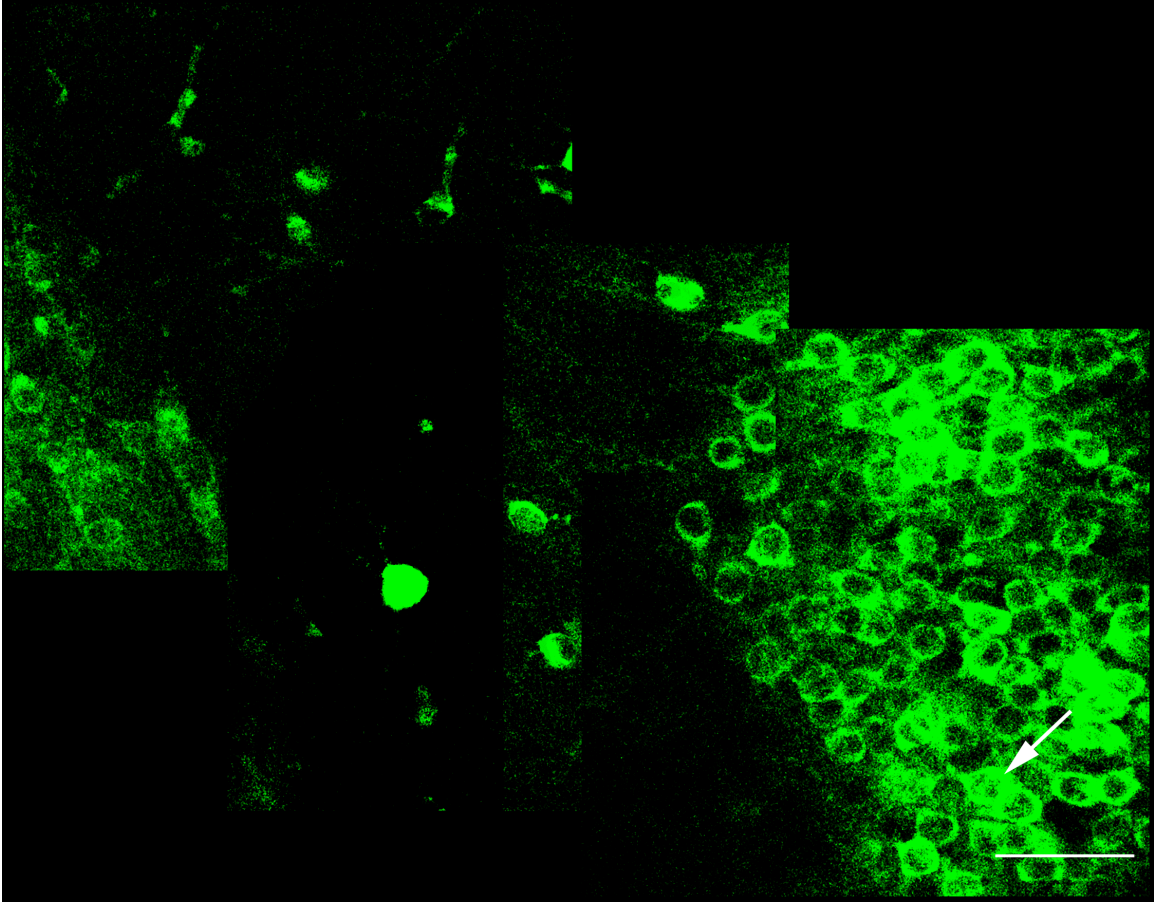


Abb. 5B: OHSC, die für 9 div in Kulturmedium mit MMF (100 $\mu\text{g/ml}$) kultiviert wurde. Die NeuN Immunfärbung resultierte in einer starken zytoplasmatischen Fluoreszenz entorhinaler Perikaryen (Pfeil). Am linken Bildrand wird ein kleiner Teil des Gyrus dentatus sichtbar. Es handelt sich um das selbe Präparat wie in 4B und 6B. Skalierung: 50 μm .

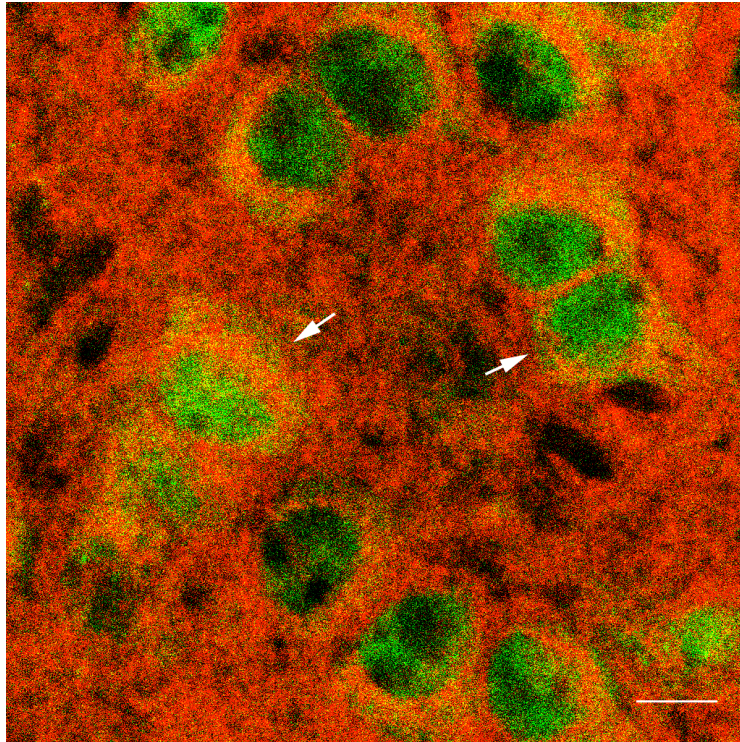


Abb. 6A: OHSC, die einer NeuN/Dil Doppelfärbung unterzogen wurde. Die immunhistologische Färbung für NeuN (grün im Bild) wurde nach den gängigen Färbeprotokollen durchgeführt (unser speziell entwickeltes Färbeprotokoll kam hier noch nicht zur Anwendung). Deutlich ist die flächenhafte Rotfärbung des Hintergrundes durch Dil (rot im Bild) zur erkennen. Für diese flächige Verteilung von Dil werden Auswasch- und permeabilitätssteigernde Effekte während der immunhistologischen Färbung für NeuN verantwortlich gemacht, die die Diffusion von Dil durch die Membranen von Neuronen und ihren Axonen sowie die Verteilung über die gesamte OHSC beschleunigen. Das Resultat ist eine völlig konturlose Dil-Färbung, aufgrund derer allein weder Neurone noch Axone abgrenzbar sind. Dies gelingt hier einzig durch die NeuN-Färbung (Pfeile). Skalierung: 10 μm .

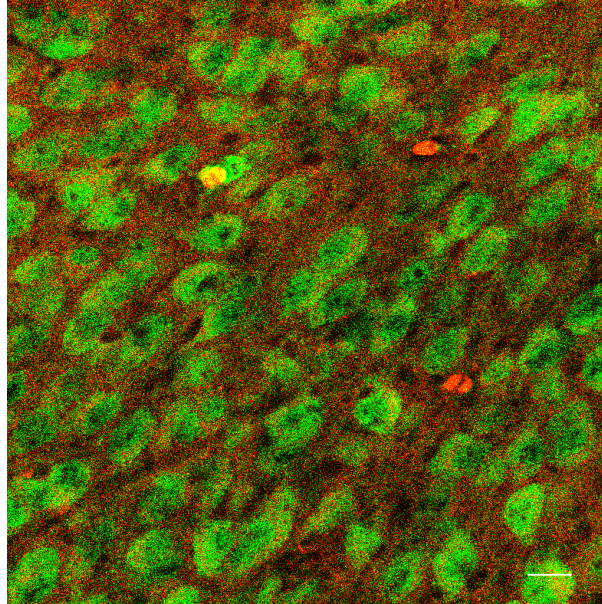


Abb. 6B: OHSC, die einer NeuN/Dil Doppelfärbung unterzogen wurde. Die immunhistologische Färbung für NeuN (grün im Bild) wurde nach den gängigen Färbeprotokollen durchgeführt, auf den Einsatz von Triton wurde allerdings verzichtet (unser speziell entwickeltes Färbeprotokoll kam hier noch nicht zur Anwendung). Im Vergleich zu 6 B ist die flächenhafte Rotfärbung des Hintergrundes durch Dil (rot im Bild) schwächer ausgeprägt. Dennoch ist auch hier kein mit Dil angefärbtes Neuron erkennbar. Für die flächige Verteilung von Dil werden Auswascheffekte während der immunhistologischen Färbung für NeuN verantwortlich gemacht, die die Diffusion von Dil durch die Membranen von Neuronen und ihren Axonen sowie die Verteilung über die gesamte OHSC beschleunigen. Das Resultat ist eine völlig konturlose Dil-Färbung, aufgrund derer allein weder Neurone noch Axone abgrenzbar sind. Dies gelingt auch hier einzig durch die NeuN-Färbung (Pfeile). Skalierung: 20 μm .

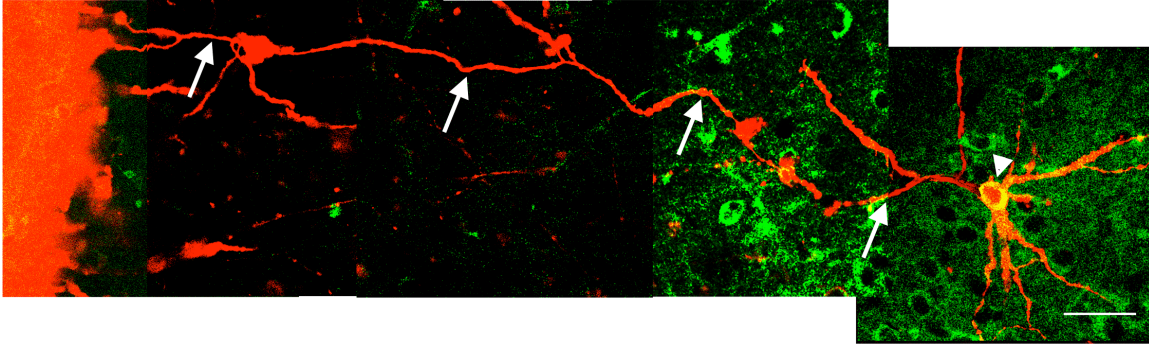


Abb. 7A: Kombination von Dil Färbung und NeuN Immunhistochemie, die nach dem von uns entwickelten Färbeprotokoll durchgeführt wird. Das Resultat zeigt die retrograde Anfärbung des Tractus perforans mit Dil und die Gegenfärbung mit NeuN-Antikörpern. Dort, wo entorhinale Neurone mit Dil und NeuN doppelt markiert sind, kommt es zu einer gelben Fluoreszenz. Am linken Bildrand ist ein kleiner Teil des Gyrus dentatus sichtbar. Der Hilus, das Areal, in dem das Dil Kristall aufgetragen wurde, ist hier nicht abgebildet.

Kontrollgruppe; Pfeile: Axon, das zum Gyrus dentatus zieht; Pfeilspitze: Dil/NeuN doppelmarkiertes entorhinales Perikaryon

Skalierung: 50 μm .

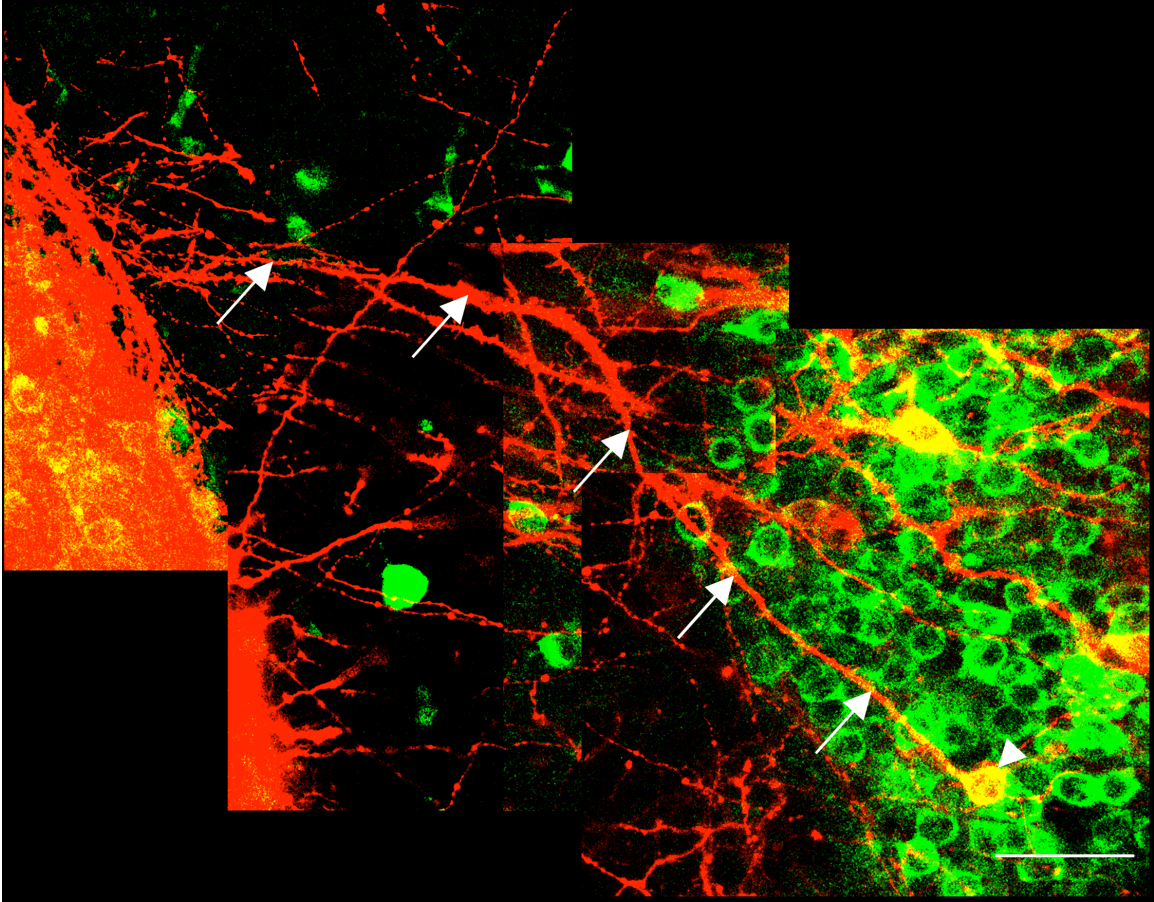


Abb. 7B: Kombination aus Dil Färbung und NeuN Immunhistochemie, die nach dem von uns entwickelten Färbeprotokoll durchgeführt wird. Das Resultat zeigt die retrograde Anfärbung des Tractus perforans mit Dil und die Gegenfärbung mit NeuN-Antikörpern. Dort, wo entorhinale Neurone mit Dil und NeuN doppelt markiert sind, kommt es zu einer gelben Fluoreszenz. Am linken Bildrand ist ein kleiner Teil des Gyrus dentatus sichtbar. Der Hilus, das Areal, in dem das Dil Kristall aufgetragen wurde, ist hier nicht abgebildet.

MMF Gruppe; Pfeile: Axon, das zum Gyrus dentatus zieht; Pfeilspitze: Dil/NeuN doppelmarkiertes Perikaryon

Skalierung: 50 μm .

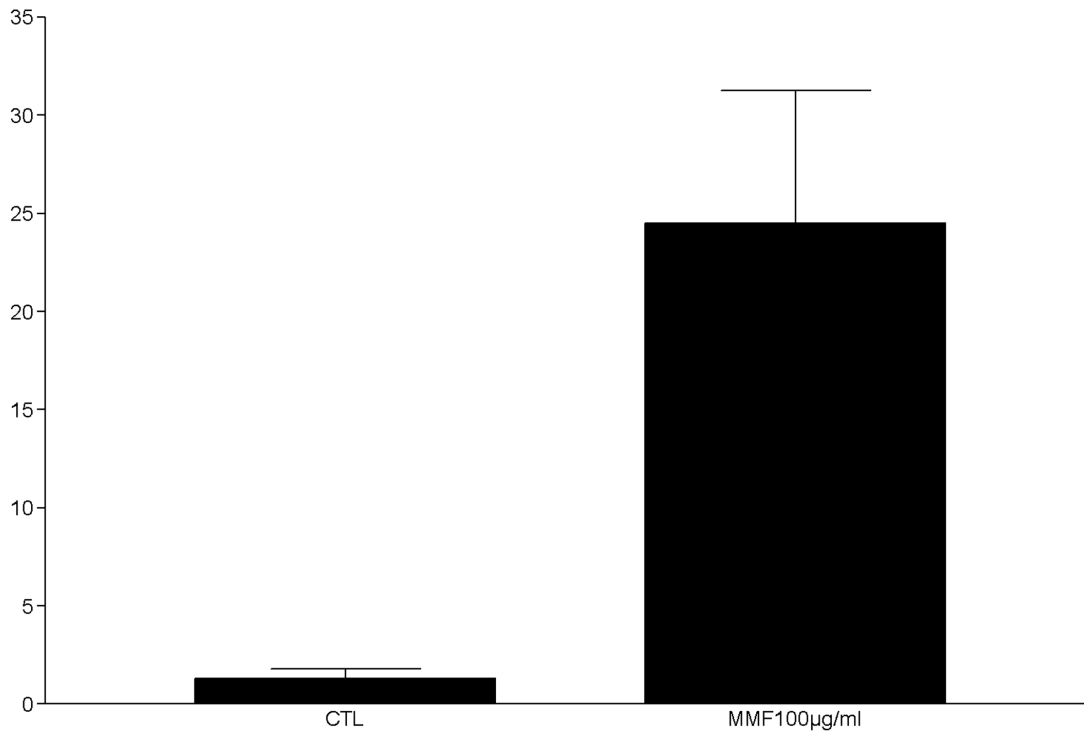


Abb. 8: Quantitative Analyse der Anzahl Dil/NeuN doppelmarkierter entorhinaler Neurone. In der Kontrollgruppe (CTL) wurden die OHSC für 9 Tage in Kulturmedium kultiviert. Hier wurden 28 OHSC ausgewertet. Die OHSC der behandelten Gruppe (MMF) wurden für 9 Tage in Kulturmedium mit MMF (100µg/ml) kultiviert. Hier wurden 20 OHSC ausgewertet. Die Behandlung mit MMF resultierte in einer signifikanten Erhöhung der Anzahl Dil/NeuN doppelmarkierter entorhinaler Neurone.

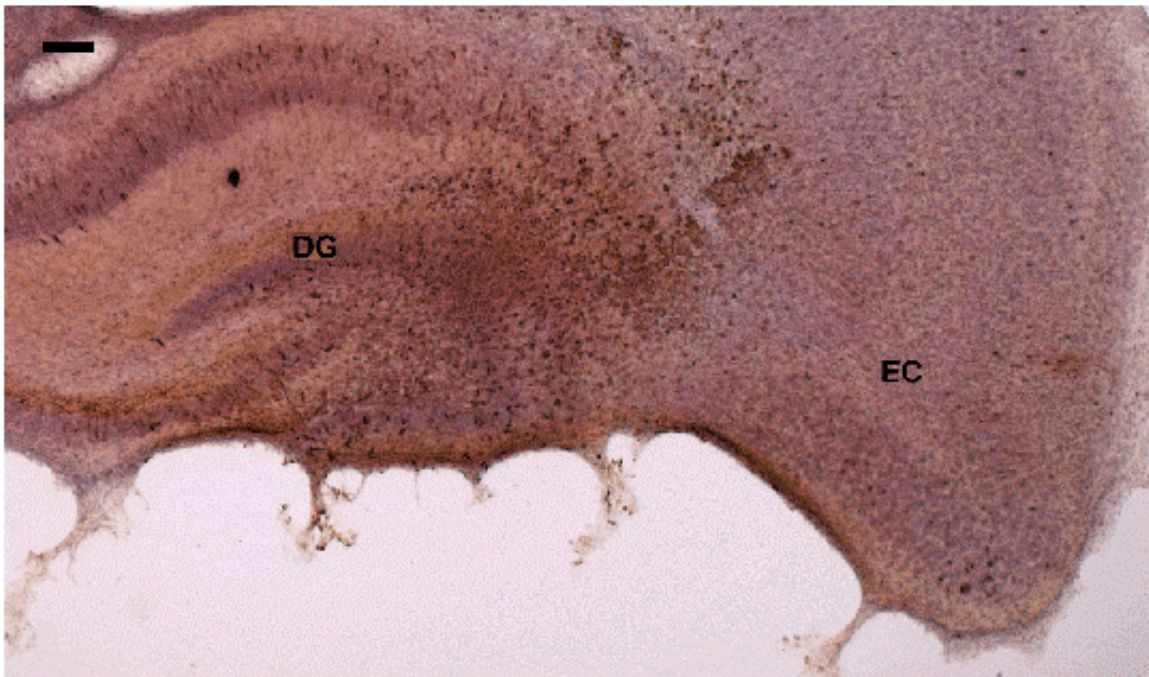


Abb. 9: OHSC, die für 9 Tage in Kontrollmedium kultiviert, am Kryostaten geschnitten und mit Hämalaun gefärbt wurde. Hier wurde eine Markierung mit Mini Ruby vorgenommen, die zu einer retrograden Anfärbung des Tractus perforans führen sollte. Der Auftragungsort von Mini Ruby entspricht dem von Dil im Hilusbereich des Gyrus dentatus (Abb. 2A). Braun gefärbte Strukturen resultieren aus der Färbung mit Mini Ruby. Die Zytoarchitektur der hippocampalen Formation ist gut erhalten. DG, Gyrus dentatus; EC, Entorhinaler Kortex; Skalierung: 100 μm .

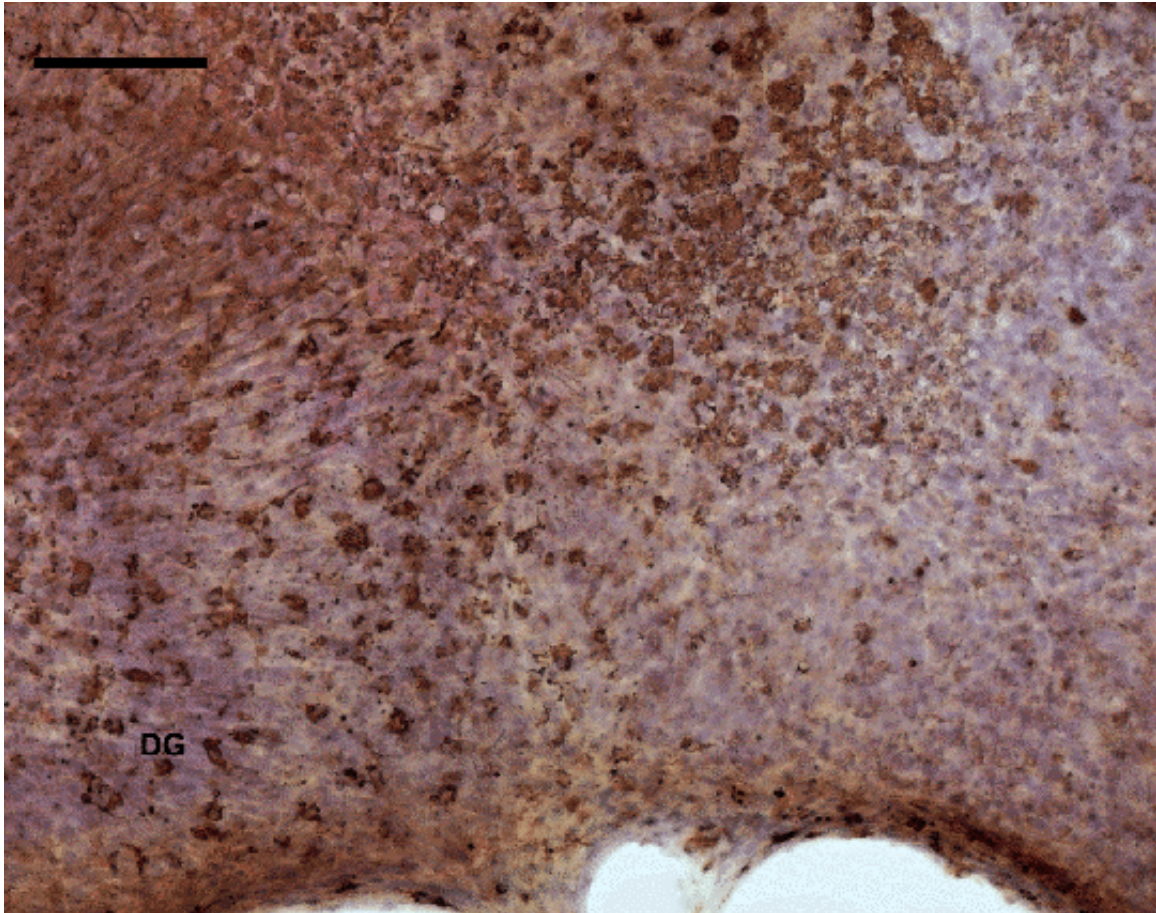


Abb. 10A: Dieses Bild stellt eine Vergrößerung der OHSC aus Abb. 9 dar. Links im Bild sind Teile des Gyrus dentatus (DG) zu sehen. Die Aggregate aus Mini Ruby stellen phagozytierende Zellen, vermutlich Mikrogliazellen dar, an denen kaum Zellfortsätze zu beobachten sind. Skalierung: 100 μm .

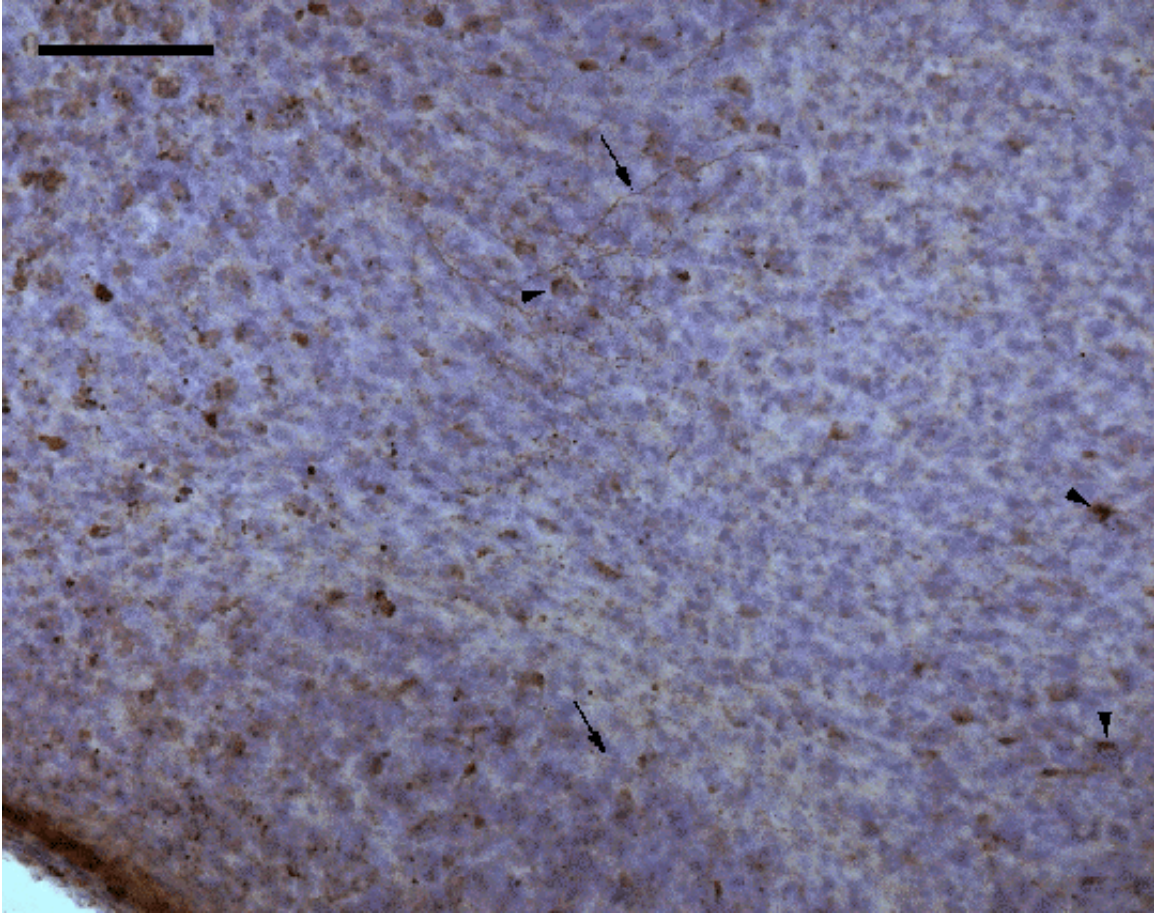


Abb. 10B: Dieses Bild stellt eine Vergrößerung der OHSC aus Abb. 9 dar. Dieser Bildausschnitt zeigt einen Teil des entorhinalen Kortex. Mit Pfeilen gekennzeichnet sind angefärbte Axone. Die Pfeilspitzen weisen auf Zellen, die Mini Ruby gespeichert haben. Neuronale Zellkörper, die retrograd gefärbt sind, können allerdings nicht identifiziert werden. Skalierung: 100 μm .

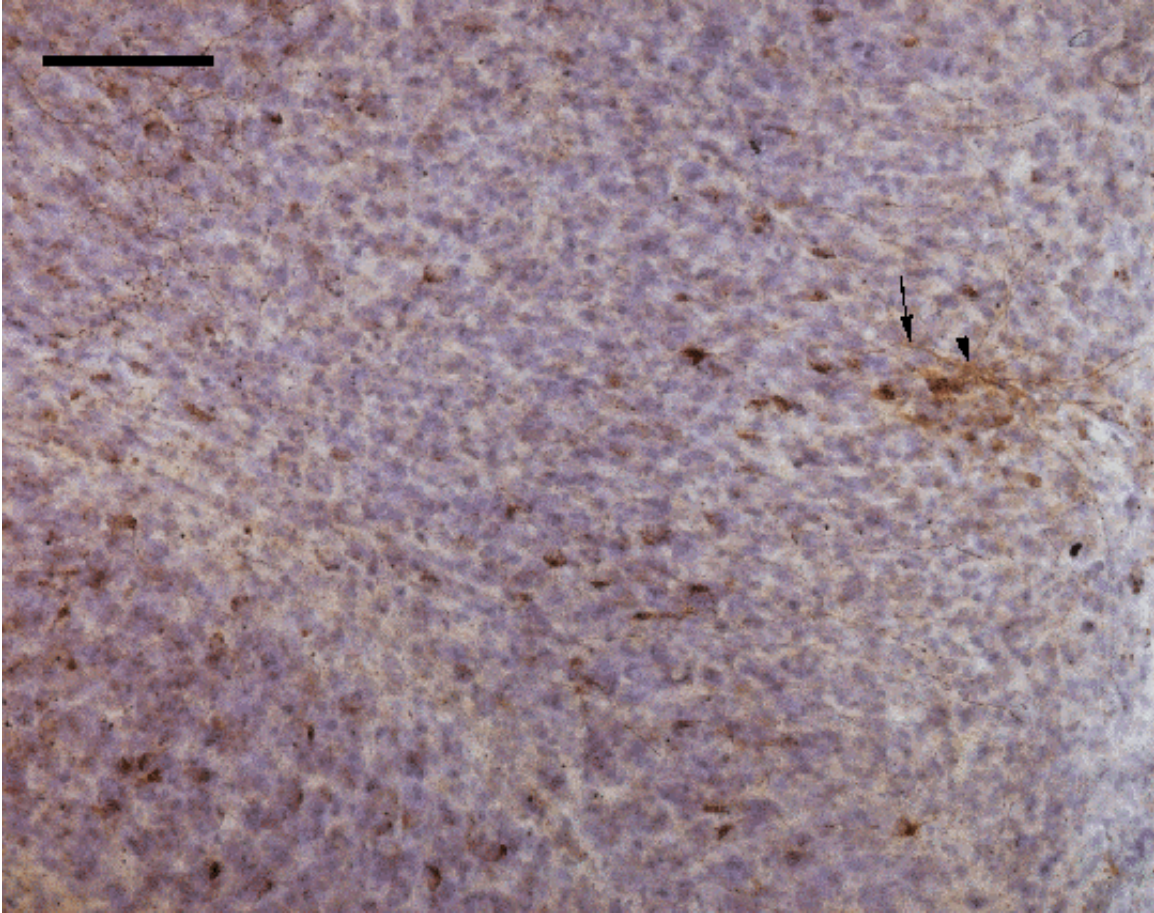


Abb. 10C: Dieses Bild stellt eine Vergrößerung der OHSC aus Abb. 9 dar. Dieser Bildausschnitt zeigt einen Teil des entorhinalen Kortex. Die Pfeilspitze deutet auf eine Zelle, die Mini Ruby gespeichert hat und von der etliche dendritische Strukturen ausgehen (Pfeil). Skalierung: 100 μm .

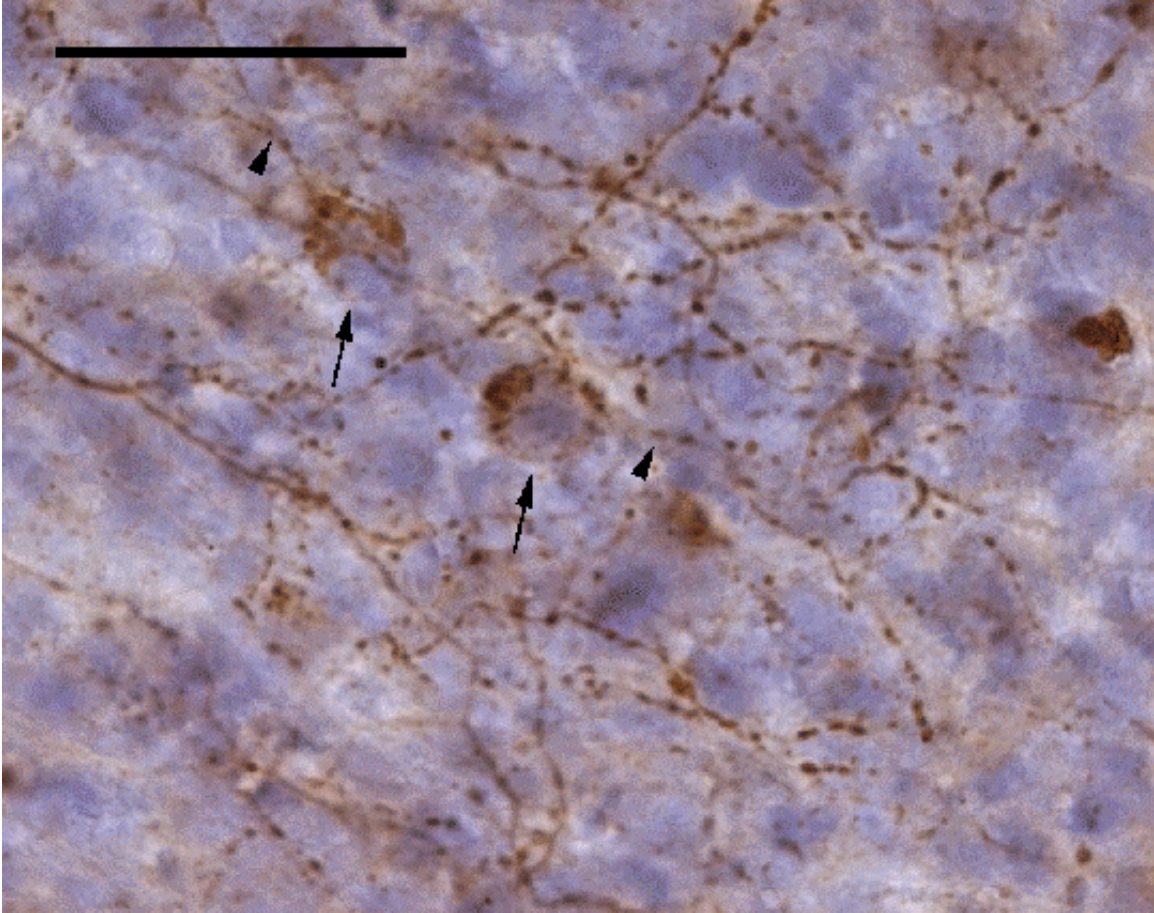


Abb. 11A: Dieses Bild zeigt eine Vergrößerung der Strukturen aus der Abb. 10B. Dieser Bildausschnitt zeigt einen Teil des entorhinalen Kortex. Die Pfeile zeigen zwei Zellen, die in zytoplasmatischen Vesikeln gespeichertes Mini Ruby aufweisen und von denen ein Axon ausgeht (Pfeilspitze). Skalierung: 50 μm .

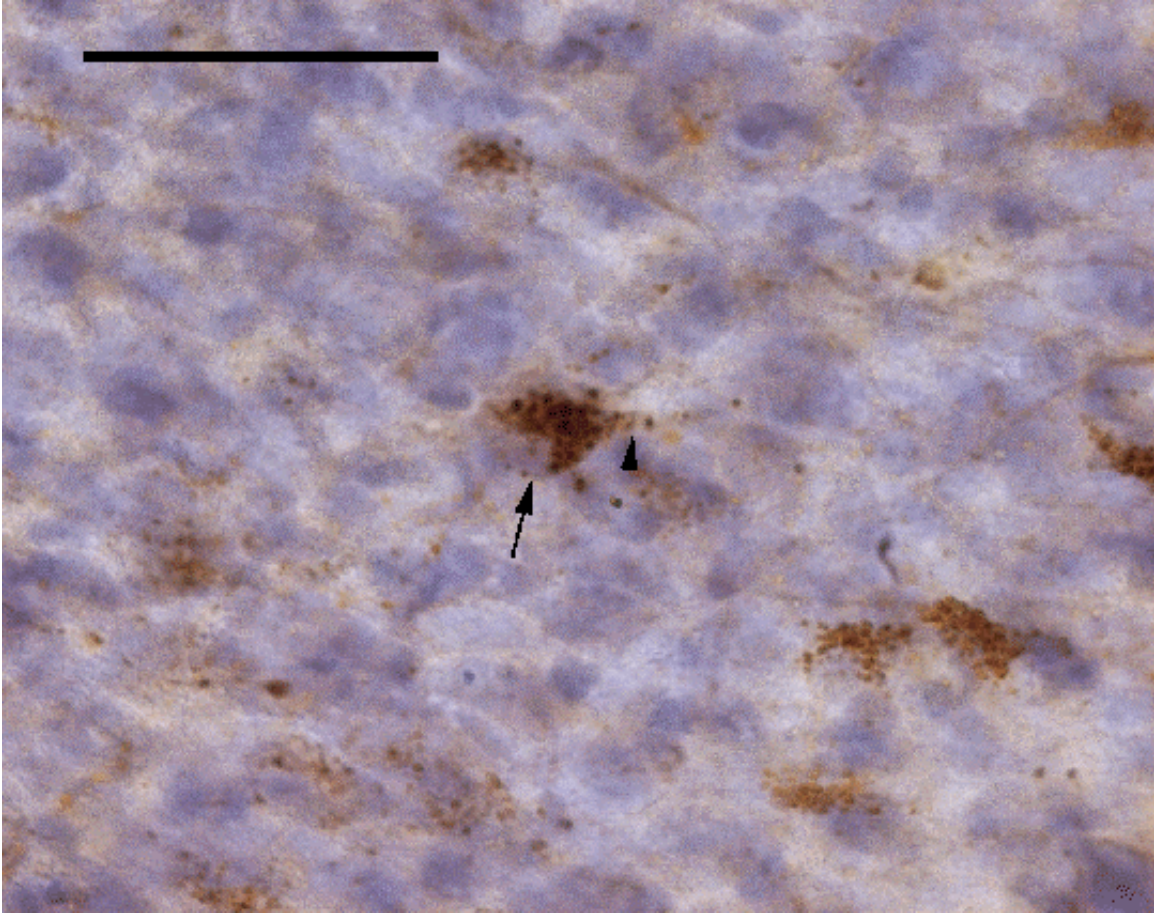


Abb. 11B: Vergrößerung der Strukturen aus Abb. 10B. Dieser Bildausschnitt zeigt einen Teil des entorhinalen Kortex. Eine Zelle enthält dichtgepackte zytoplasmatische Vesikel. In diesen Vesikeln befindet sich der Farbstoff Mini Ruby. Von der Zelle ausgehend, ist der Ursprung des apikalen Dendriten zu erkennen (Pfeilspitze). Skalierung: 50 μm .

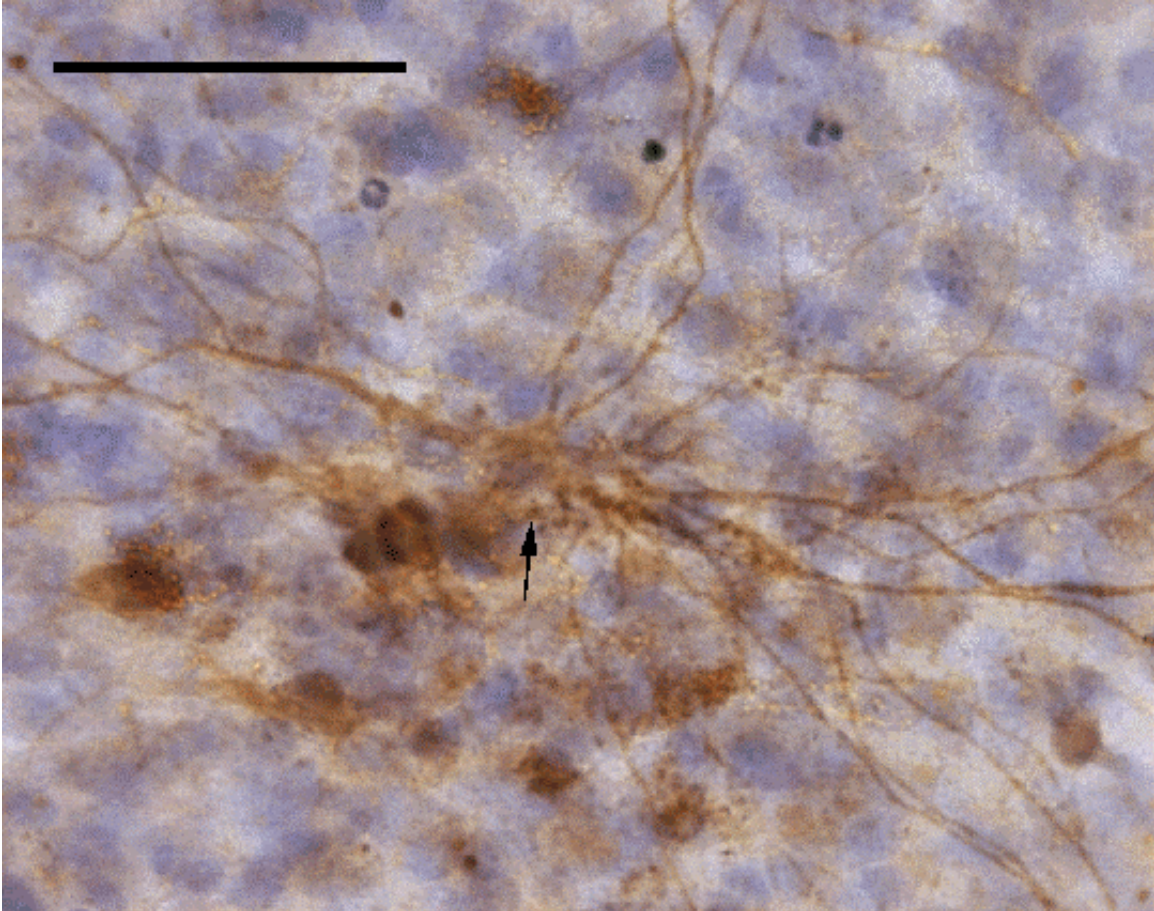


Abb. 11C: Zu sehen ist die Vergrößerung der Struktur aus Abb. 10C. Dieser Bildausschnitt zeigt einen Teil des entorhinalen Kortex. Der Pfeil weist auf eine mit Mini Ruby markierte Zelle. Etliche dendritische Strukturen nehmen ihren Ursprung von dieser Zelle. Das Axon lässt sich jedoch nicht genau identifizieren. Die Morphologie zeigt aber die typischen Charakteristika einer multipolaren Nervenzelle. Skalierung: 50 μm .

5.2 Abkürzungsverzeichnis

CA	Cornu ammonis
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
Dil	1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindo-Carbocyanin
div	days in vitro
EC	entorhinaler Cortex
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HI	Hilus
GD	Gyrus dentatus
ICAM	Intercellular Adhesion molecule
IL	Interleukin
IMP	Inosinmonophosphat
MHC	Major histocompatibility Complex
MMF	Mycophenolat Mofetil
NHS	Normal Horse Serum
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NO	Stickstoffmonoxid
OHSC	Organotypische hippocampale Schnittkultur
PaS	Parasubiculum
PB	Phosphatpuffer
PBS	Phosphate Buffered Saline
PrS	Praesubiculum
S	Subiculum

5.3 Literaturverzeichnis

1. Acarin L, Gonzalez B, Castellano B (2000) Neuronal, astroglial and microglial cytokine expression after an excitotoxic lesion in the immature rat brain. *Eur J Neurosci* 12: 3505-3520.
2. Akiyama H, Itagaki S, McGeer PL (1988) Major histocompatibility complex antigen expression on rat microglia following epidural kainic acid lesions. *J Neurosci Res* 20: 147-157.
3. Allison AC, Eugui EM (1993) Immunosuppressive and other effects of mycophenolic acid and an ester prodrug, mycophenolate mofetil. *Immunol Rev* 136:5-28.
4. Allison AC, Eugui EM (1996) Purine metabolism and immunosuppressive effects of mycophenolate mofetil (MMF). *Clin Transplant* 10: 77-84.
5. Allison AC, Eugui EM (2001) Mycophenolate mofetil and its mechanisms of action. *Immunopharmacology* 47: 85-118.
6. Amaral DG, Witter MP (1995) Hippocampal formation. In: Paxinos G, ed. *The rat nervous system*. San Diego: Academic Press: 443-493.

7. Banati RB, Gehrmann J, Schubert P, Kreutzberg GW (1993) Cytotoxicity of microglia. *Glia* 7: 111-8.
8. Barone FC, Arvin B, White RF, Miller A, Webb CL, Willette RN, Lysko PG, Feuerstein GZ (1997) Tumor necrosis factor-alpha. A mediator of focal ischemic brain injury. *Stroke* 28: 1233-1244.
9. Bavetta S, Hamlyn PJ, Burnstock G, Liebermann AR, Anderson PN (1999) The effects of FK506 on dorsal column axons following spinal cord injury in adult rats: neuroprotection and local regeneration. *Exp Neurol* 158(2): 382-393.
10. Bechmann I, Nitsch R (1997) Astrocytes and microglial cells incorporate degenerating fibers following entorhinal lesion. A light, confocal, and electron microscopical study using a phagocytosis-dependent labeling technique. *Glia* 20: 145-154.
11. Berger T, Frotscher M (1994) Distribution and morphological characteristics of oligodendrocytes in the rat hippocampus in situ and in vitro: an immunocytochemical study with the monoclonal Rip antibody. *J Neurocytol* 23: 61-74.
12. Bethea JR, Dietrich WD (2002) Targeting the host inflammatory response in traumatic spinal cord injury. *Curr Opin Neurol* 15: 355-360.

13. Blaheta RA, Leckel K, Wittig B, Zenker D, Oppermann E, Harder S, Scholz M, Weber S, Schuldes H, Encke A, Markus BH (1998) Inhibition of endothelial receptor expression and of T-cell ligand activity by mycophenolate mofetil. *Transpl Immunol* 6: 251-259.
14. Blight AR (1992) Macrophages and inflammatory damage in spinal cord injury. *J Neurotrauma* 9 Suppl 1:S83-91.
15. Bonhoeffer F, Huf J (1980) Recognition of cell types by axonal growth cones in vitro. *Nature* 288: 162-164.
16. Boulton CL, Haebler Dv, Heinemann U (1992) Tracing of axonal connections by rhodamine-dextran-amine in the rat hippocampal-entorhinal cortex slice preparation. *Hippocampus* 2: 99-106.
17. Bracken MB, Shepard MJ, Holford TR, Leo-Summers L, Aldrich EF, Fazl M, Fehlings M, Herr DL, Hitchon PW, Marshall LF, Nockels RP, Pascale V, Perot PL, Jr., Piepmeier J, Sonntag VK, Wagner F, Wilberger JE, Winn HR, Young W (1997) Administration of methylprednisolone for 24 or 48 hours or tirilazad mesylate for 48 hours in the treatment of acute spinal cord injury. Results of the Third National Acute Spinal Cord Injury Randomized Controlled Trial. National Acute Spinal Cord Injury Study. *JAMA* 277: 1597-1604.

18. Bracken MB (2001) Methylprednisolone and acute spinal cord injury: an update of the randomized evidence. *Spine* 26: S47-S54.
19. Bruce AJ, Boling W, Kindy MS, Peschon J, Kraemer PJ, Carpenter MK, Holtsberg FW, Mattson MP (1996) Altered neuronal and microglial responses to excitotoxic and ischemic brain injury in mice lacking TNF receptors. *Nat Med* 2: 788-794.
20. Carlson SL, Parrish ME, Springer JE, Doty K, Dossett L (1998) Acute inflammatory response in spinal cord following impact injury. *Exp Neurol* 151: 77-88.
21. Ceranik K, Deng J, Heimrich B, Lubke J, Zhao S, Forster E, Frotscher M (1999) Hippocampal Cajal-Retzius cells project to the entorhinal cortex: retrograde tracing and intracellular labelling studies. *Eur J Neurosci* 11: 4278-4290.
22. Chabot S, Williams G, Yong VW (1997) Microglial production of TNF-alpha is induced by activated T lymphocytes. Involvement of VLA-4 and inhibition by interferonbeta-1b. *J Clin Invest* 100: 604-612.
23. Chao CC, Hu S, Close K, Choi CS, Molitor TW, Novick WJ, Peterson PK (1992) Cytokine release from microglia: differential inhibition by pentoxifylline and dexamethasone. *J Infect Dis* 166: 847-853.

24. Chopp M, Zhang RL, Chen H, Li Y, Jiang N, Rusche JR (1994) Postischemic administration of an anti-Mac-1 antibody reduces ischemic cell damage after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke* 25: 869-875.
25. Dehghani F, Hischebeth GT, Wirjatijasa F, Kohl A, Korf HW, Hailer NP (2003) The immunosuppressant mycophenolate mofetil attenuates neuronal damage after excitotoxic injury in hippocampal slice cultures. *Eur J Neurosci* 18: 1061-1072.
26. del Rio JA, Heimrich B, Soriano E, Schwegler H, Frotscher M (1991) Proliferation and differentiation of glial fibrillary acidic protein-immunoreactive glial cells in organotypic slice cultures of rat hippocampus. *Neuroscience* 43: 335-347.
27. Deller T (1998) The anatomical organization of the rat fascia dentata: new aspects of laminar organization as revealed by anterograde tracing with Phaseolus vulgaris-Luecoagglutinin (PHAL). *Anat Embryol (Berl)* 197: 89-103.
28. Diaz-Ruiz A, Rios C, Duarte I, Correa D, Guizar-Sahagun G, Grijalva I, Ibarra A (1999) Cyclosporin-A inhibits lipid peroxidation after spinal cord injury in rats. *Neurosci lett* 266: 61-64.

29. Diekmann S, Nitsch R, Ohm TG (1994) The organotypic entorhinal-hippocampal complex slice culture of adolescent rats. A model to study transcellular changes in a circuit particularly vulnerable in neurodegenerative disorders. *J Neural Transm Suppl* 44: 61-71.
30. Dolorfo CL, Amaral DG (1998) Entorhinal cortex of the rat: topographic organization of the cells of origin of the perforant path projection to the dentate gyrus. *J Comp Neurol* 398: 25-48.
31. Drager UC (1983) Coexistence of neurofilaments and vimentin in a neurone of adult mouse retina. *Nature* 303: 169-172.
32. Eder C, Schilling T, Heinemann U, Haas D, Hailer NP, Nitsch R (1999) Morphological, immunophenotypical and electrophysiological properties of resting microglia in vitro. *Eur J Neurosci* 11: 4251-4261.
33. Eriksson C, Nobel S, Winblad B, Schultzberg M (2000) Expression of interleukin 1 alpha and beta, and interleukin 1 receptor antagonist mRNA in the rat central nervous system after peripheral administration of lipopolysaccharides. *Cytokine* 12: 423-431.
34. Fawcett JW, Asher RA (1999) The glia scar and central nervous system repair. *Brain Research Bulletin* 49 (6): 377-391.

35. Fink RP, Heimer L (1967) Two methods for selective silver impregnation of degenerating axons and their synaptic endings in the central nervous system. *Brain Res* 4: 369-374.
36. Flaris NA, Densmore TL, Molleston MC, Hickey WF (1993) Characterization of microglia and macrophages in the central nervous system of rats: definition of the differential expression of molecules using standard and novel monoclonal antibodies in normal CNS and in four models of parenchymal reaction. *Glia* 7: 34-40.
37. Frei K, Siepl C, Groscurth P, Bodmer S, Schwerdel C, Fontana A (1987) Antigen presentation and tumor cytotoxicity by interferon-gamma-treated microglial cells. *Eur J Immunol* 17: 1271-1278.
38. Fritsch B, Wilm C (1990) Dextran amines in neuronal tracing. *Trends Neurosci* 13: 14.
39. Fritsch B (1993) Fast axonal diffusion of 3000 molecular weight dextran amines. *J Neurosci Methods* 50: 95-103.
40. Frotscher M, Zafirov S, Heimrich B (1995) Development of identified neuronal types and of specific synaptic connections in slice cultures of rat hippocampus [corrected and republished in *Prog Neurobiol* 1995 Apr;45(6):vii- xxviii]. *Prog Neurobiol* 45: 143-164.

41. Gähwiler BH, Capogna M, Debanne D, McKinney RA, Thompson SM (1997) Organotypic slice cultures: a technique has come of age. *Trends Neurosci* 20: 471-477.
42. Gerfen CR, Sawchenko PE (1984) An anterograde neuroanatomical tracing method that shows the detailed morphology of neurons, their axons and terminals: immunohistochemical localization of an axonally transported plant lectin, Phaseolus vulgaris leucoagglutinin (PHA-L). *Brain Res* 290: 219-238.
43. Glomsda BA, Blaheta RA, Hailer NP (2003) Inhibition of monocyte/endothelial cell interactions and monocyte adhesion molecule expression by the immunosuppressant mycophenolate mofetil. *Spinal Cord* 41: 610-619.
44. Glover JC, Petursdottir G, Jansen JK (1986) Fluorescent dextran-amines used as axonal tracers in the nervous system of the chicken embryo. *J Neurosci Methods* 18: 243-254.
45. Godement P, Vanselow J, Thanos S, Bonhoeffer F (1987a) A study in developing visual systems with a new method of staining neurones and their processes in fixed tissue. *Development* 101: 697-713.

46. Gould VE, Lee I, Wiedenmann B, Moll R, Chejfec G, Franke WW (1986) Synaptophysin: a novel marker for neurons, certain neuroendocrine cells, and their neoplasms. *Hum Pathol* 17: 979-983.
47. Hailer NP, Järhult JD, Nitsch R (1996) Resting microglial cells in vitro: Analysis of morphology and adhesion molecule expression in organotypic hippocampal slice cultures. *Glia* 18: 319-331.
48. Hailer NP, Wirjatijasa F, Roser N, Hischebeth GTR, Korf H-W, Dehghani F (2001) Astrocytic factors protect neuronal integrity and reduce microglial activation in an in vitro model of N-methyl-D-aspartate-induced excitotoxic injury in organotypic hippocampal slice cultures. *Eur J Neurosci* 14: 315-326.
49. Hall ED, Braughler JM (1993) Free radicals in CNS injury. *Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis* 71: 81-105.
50. Hall ED, Yonkers PA, Andrus PK, Cox JW, Anderson DK (1992) Biochemistry and pharmacology of lipid antioxidants in acute brain and spinal cord injury. *J Neurotrauma* 9 Suppl 2: S425-S442.
51. Hamada Y, Ikata T, Katoh S, Nakauchi K, Niwa M, Kawai Y, Fukuzawa K (1996) Involvement of an intercellular adhesion molecule 1-dependent

pathway in the pathogenesis of secondary changes after spinal cord injury in rats. *J Neurochem* 66: 1525-1531.

52. Hayes NV, Holmes FE, Grantham J, Baines AJ (1995) A60, an axonal membrane-skeletal spectrin-binding protein. *Biochem Soc Trans* 23: 54-58.
53. Hendrickson A, Edwards SB (1978) The use of axonal transport for autoradiographic tracing of pathways in the central nervous system. In Thompson RF, editor. *Methods in Physiological Psychology - Neuroanatomical Research Techniques*, Vol. 2. New York: 241-90.
54. Hickey WF, Kimura H (1988) Perivascular microglial cells of the CNS are bone marrow-derived and present antigen in vivo. *Science* 239: 290-292.
55. Honig MG, Hume RI (1986) Fluorescent carbocyanine dyes allow living neurons of identified origin to be studied in long-term cultures. *J Cell Biol* 103: 171-187.
56. Honig MG, Hume RI (1989a) Carbocyanine dyes. Novel markers for labelling neurons. *Trends Neurosci* 12: 336-338.
57. Honig MG, Hume RI (1989b) Dil and diO: versatile fluorescent dyes for neuronal labelling and pathway tracing. *Trends Neurosci* 12: 333-341.

58. Hsu SM, Raine L, Fanger H (1981) The use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: A comparison between ABC and unlabeled antibody (peroxidase) procedures. *J Histochem Cytochem* 29: 577-590.
59. Hulsebosch CE (2002) Recent advances in pathophysiology and treatment of spinal cord injury. *Adv Physiol Educ* 26: 238-255.
60. Hume DA, Perry VH, Gordon S (1983) Immunohistochemical localization of a macrophage-specific antigen in developing mouse retina: phagocytosis of dying neurons and differentiation of microglial cells to form a regular array in the plexiform layers. *J Cell Biol* 97: 253-257.
61. Hurlbert RJ (2006) Strategies of medical intervention in the management of acute spinal cord injury. *Spine* 31: S16-S21.
62. Kaneko T, Saeki K, Lee T, Mizuno N (1996) Improved retrograde axonal transport and subsequent visualization of tetramethylrhodamine (TMR) - dextran amine by means of an acidic injection vehicle and antibodies against TMR. *J Neurosci Methods* 65: 157-165.
63. Kaur C, Hao AJ, Wu CH, Ling EA (2001) Origin of Microglia. *Microsc Res Tech* 54(1):2-9.

64. Kim WK, Ko KH (1998) Potentiation of N-methyl-D-aspartate-mediated neurotoxicity by immunostimulated murine microglia. *J Neurosci Res* 54: 17-26.
65. Kluge A, Hailer NP, Horvath TL, Bechmann I, Nitsch R (1998) Tracing of the entorhinal-hippocampal pathway in vitro. *Hippocampus* 8: 57-68.
66. Kohl A, Dehghani F, Korf H, Hailer NP (2003) The bisphosphonate clodronate depletes microglial cells in excitotoxically injured organotypic hippocampal slice cultures. *Exp Neurol* 181: 1-11.
67. Kreutzberg GW (1996) Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci* 19: 312-318.
68. Landmesser L (1978) The distribution of motoneurons supplying chick hind limb muscles. *J Physiol* 284: 371-389.
69. Landmesser L, Honig MG (1986) Altered sensory projections in the chick hind limb following the early removal of motoneurons. *Dev Biol* 118: 511-531.
70. Laurent AF, Dumont S, Poindron P, Muller CD (1996) Mycophenolic acid suppresses protein N-linked glycosylation in human monocytes and their

adhesion to endothelial cells and to some substrates. *Exp Hematol* 24: 59-67.

71. Lawrence CB, Allan SM, Rothwell NJ (1998) Interleukin-1beta and the interleukin-1 receptor antagonist act in the striatum to modify excitotoxic brain damage in the rat. *Eur J Neurosci* 10: 1188-1195.
72. Lazarov-Spiegler O, Solomon AS, Zeev-Brann AB, Hirschberg DL, Lavie V, Schwartz M (1996) Transplantation of activated macrophages overcomes central nervous system regrowth failure. *FASEB J* 10: 1296-1302.
73. Lazarov-Spiegler O, Solomon AS, Schwartz M (1998) Peripheral nerve-stimulated macrophages simulate a peripheral nerve-like regenerative response in rat transected optic nerve. *Glia* 24: 329-337.
74. Lewin MG, Hansebout RR, Pappius HM (1974) Chemical characteristics of traumatic spinal cord edema in cats. Effects of steroids on potassium depletion. *J Neurosurg* 40: 65-75.
75. Ling EA, Wong WC (1993) The origin and the nature of ramified and amoeboid microglia: a historical review and current concepts. *Glia* 7(1): 9-18.

76. Loddick SA, Wong ML, Bongiorno PB, Gold PW, Licinio J, Rothwell NJ (1997) Endogenous interleukin-1 receptor antagonist is neuroprotective. *Biochem Biophys Res Commun* 234: 211-215.
77. Mathew RC, Gupta SK, Katayama I, Curtis J, Turk JL (1983) Macrophage specific antigen is expressed by resting microglia in the CNS but not by Langerhans cells in the skin. *J Pathol* 141: 435-440.
78. Medina L, Veenman CL, Reiner A (1997) Evidence for a possible avian dorsal thalamic region comparable to the mammalian ventral anterior, ventral lateral, and oral ventroposterolateral nuclei. *J Comp Neurol* 384: 86-108.
79. Messina E, Micheli V, Giacomello A (2005) Guanine nucleotide depletion induces differentiation and aberrant neurite outgrowth in human dopaminergic neuroblastoma lines: a model for basal ganglia dysfunction in Lesch-Nyhan disease. *Neurosci Lett* 375: 97-100.
80. Miller DC, Koslow M, Budzilovich GN, Burstein DE (1990) Synaptophysin: a sensitive and specific marker for ganglion cells in central nervous system neoplasms. *Hum Pathol* 21: 271-276.
81. Mullen RJ, Buck CR, Smith AM (1992) NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development* 116: 201-211.

82. Munoz DG, Kobylinski L, Henry DD, George DH (1990) Chromogranin A-like immunoreactivity in the human brain: distribution in bulbar medulla and cerebral cortex. *Neuroscience* 34: 533-543.
83. Nakajima K, Honda S, Tohyama Y, Imai Y, Kohsaka S, Kurihara T (2001) Neurotrophin secretion from cultured microglia. *J Neurosci Res* 65: 322-331.
84. Nauta WJ, Gyax PA (1954) Silver impregnation of degenerating axons in the central nervous system: a modified technic. *Stain Technol* 29: 91-93.
85. Nolan JA, Trojanowski JQ, Hogue-Angeletti R (1985) Neurons and neuroendocrine cells contain chromogranin: detection of the molecule in normal bovine tissues by immunochemical and immunohistochemical methods. *J Histochem Cytochem* 33: 791-798.
86. Perry VH, Gordon S (1988) Macrophages and microglia in the nervous system. *Trends Neurosci* 11: 273-277.
87. Possel H, Noack H, Putzke J, Wolf G, Sies H (2000) Selective upregulation of inducible nitric oxide synthase (iNOS) by lipopolysaccharide (LPS) and cytokines in microglia: in vitro and in vivo studies. *Glia* 32: 51-59.

88. Prewitt CM, Niesman IR, Kane CJ, Houle JD (1997) Activated macrophage/microglial cells can promote the regeneration of sensory axons into the injured spinal cord. *Exp Neurol* 148: 433-443.
89. Rabchevsky AG, Streit WJ (1997) Grafting of cultured microglial cells into the lesioned spinal cord of adult rats enhances neurite outgrowth. *J Neurosci Res* 47: 34-48.
90. Rapalino O, Lazarov-Spiegler O, Agranov E, Velan GJ, Yoles E, Fraidakis M, Solomon A, Gepstein R, Katz A, Belkin M, Hadani M, Schwartz M (1998) Implantation of stimulated homologous macrophages results in partial recovery of paraplegic rats. *Nat Med* 4: 814-821.
91. Renno T, Krakowski M, Piccirillo C, Lin JY, Owens T (1995) TNF-alpha expression by resident microglia and infiltrating leukocytes in the central nervous system of mice with experimental allergic encephalomyelitis. Regulation by Th1 cytokines. *J Immunol* 154: 944-953.
92. Rita P, Illis LS (1993) Spinal shock: possible role of receptor plasticity and non synaptic transmission. *Paraplegia* 31: 82-87.
93. Rosenstiel P, Schramm P, Isenmann S, Brecht S, Eickmeier C, Bürger E, Herdegen T, Sievers J, Lucius R (2003) Differential effects of immuophilin-ligands (FK506 and V-10,367) on survival and regeneration

of rat retinal ganglion cells and after optic nerve crush in vivo. *J Neurotrauma* 20(3): 297-307.

94. Sandler AN, Tator CH (1976) Review of the effect of spinal cord trauma on the vessels and blood flow in the spinal cord. *J Neurosurg* 45: 638-646.
95. Schilling T, Nitsch R, Heinemann U, Haas D, Eder C (2001) Astrocyte-released cytokines induce ramification and outward K⁺ channel expression in microglia via distinct signalling pathways. *Eur J Neurosci* 14: 463-473.
96. Schlaepfer WW (1987) Neurofilaments: structure, metabolism and implications in disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 46: 117-129.
97. Schlüter D, Bertsch D, Frei K, Hubers SB, Wiestler OD, Hof H, Fontana A, Deckert-Schlüter M (1998) Interferon-gamma antagonizes transforming growth factor-beta2-mediated immunosuppression in murine *Toxoplasma encephalitis*. *J Neuroimmunol* 81: 38-48.
98. Schmechel DE (1985) Gamma-subunit of the glycolytic enzyme enolase: nonspecific or neuron specific? *Lab Invest* 52: 239-242.

99. Schmid KW, Weiler R, Xu RW, Hogue-Angeletti R, Fischer-Colbrie R, Winkler H (1989) An immunological study on chromogranin A and B in human endocrine and nervous tissues. *Histochem J* 21: 365-373.
100. Schnell L, Fearn S, Klassen H, Schwab ME, Perry VH (1999) Acute inflammatory responses to mechanical lesions in the CNS: differences between brain and spinal cord. *Eur J Neurosci* 11: 3648-3658.
101. Schwab ME, Bartholdi D (1996) Degeneration and regeneration of axons in the lesioned spinal cord. *Physiol Rev* 76: 319-370.
102. Selmaj KW, Raine CS (1988) Tumor necrosis factor mediates myelin and oligodendrocyte damage in vitro. *Ann Neurol* 23: 339-346.
103. Shaw G, Osborn M, Weber K (1981) An immunofluorescence microscopical study of the neurofilament triplet proteins, vimentin and glial fibrillary acidic protein within the adult rat brain. *Eur J Cell Biol* 26: 68-82.
104. Somogyi P, Hodgson AJ, DeP Potter RW, Fischer-Colbrie R, Schober M, Winkler H, Chubb IW (1984) Chromogranin immunoreactivity in the central nervous system. Immunohistochemical characterisation, distribution and relationship to catecholamine and enkephalin pathways. *Brain Res* 320: 193-230.

105. Stoppini L, Buchs PA, Müller D (1991) A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *J Neurosci Methods* 37: 173-182.
106. Suzumura A, Mezitis SG, Gonatas NK, Silberberg DH (1987) MHC antigen expression on bulk isolated macrophage-microglia from newborn mouse brain: induction of Ia antigen expression by gamma-interferon. *J Neuroimmunol* 15: 263-278.
107. Tamamaki N (1999) Development of afferent fiber lamination in the infrapyramidal blade of the rat dentate gyrus. *J Comp Neurol* 411: 257-266.
108. Tator CH (1995) Update on the pathophysiology and pathology of acute spinal cord injury. *Brain Pathol* 5: 407-413.
109. Teichner A, Morselli E, Buttarelli FR, Caronti B, Pontieri FE, Venturini G, Palladini G (1993) Treatment with cyclosporine A promotes axonal regeneration in rats submitted to transverse section of the spinal cord. *J Hirnforsch* 34: 343-349.
110. Toulmond S, Rothwell NJ (1995) Interleukin-1 receptor antagonist inhibits neuronal damage caused by fluid percussion injury in the rat. *Brain Res* 671: 261-266.

111. Trojanowski JQ (1987) Neurofilament proteins and human nervous system tumors. *J Histochem Cytochem* 35: 999-1003.
112. Turrin NP, Rivest S (2006) Tumor necrosis factor alpha but not interleukin 1 beta mediates neuroprotection in response to acute nitric oxide excitotoxicity. *J. Neurosci* 26:143-151.
113. Veenman CL, Reiner A (1996) Ultrastructural morphology of synapses formed by corticostriatal terminals in the avian striatum. *Brain Res* 707: 1-12.
114. Veenman CL, Reiner A, Honig MG (1992) Biotinylated dextran amine as an anterograde tracer for single- and double-labeling studies. *J Neurosci Methods* 41: 239-254.
115. Vinores SA, Bonnin JM, Rubinstein LJ, Marangos PJ (1984) Immunohistochemical demonstration of neuron-specific enolase in neoplasms of the CNS and other tissues. *Arch Pathol Lab Med* 108: 536-540.
116. Wirjatijasa F, Dehghani F, Blaheta RA, Korf HW, Hailer NP (2002) Interleukin-4, interleukin-10, and interleukin-1-receptor antagonist but not transforming growth factor-beta induce ramification and reduce adhesion molecule expression of rat microglial cells. *J Neurosci Res* 68: 579-587.

117. Witter MP, Groenewegen HJ, Lopes da Silva FH, Lohman AH (1989) Functional organization of the extrinsic and intrinsic circuitry of the parahippocampal region. *Prog Neurobiol* 33: 161-253.
118. Woodhams PL, Terashima T (2000) Aberrant trajectory of entorhino-dentate axons in the mutant Shaking Rat Kawasaki: a Dil-labelling study. *Eur J Neurosci* 12: 2707-2720.
119. Yabaluri N, Medzihradsky F (1995) Reversible modulation of opioid receptor binding in intact neural cells by endogenous guanosine triphosphate. *Molecular Pharmacology* 48: 690-695.
120. Zeev-Brann AB, Lazarov-Spiegler O, Brenner T, Schwartz M (1998) Differential effects of central and peripheral nerves on macrophages and microglia. *Glia* 23: 181-190.
121. Zhao B, Schwartz JP (1998) Involvement of cytokines in normal CNS development and neurological diseases: recent progress and perspectives. *J Neurosci Res* 52: 7-16.
122. Zimmer J, Gähwiler BH (1984) Cellular and connective organization of slice cultures of the rat hippocampus and fascia dentata. *J Comp Neurol* 228: 432-446.

5.4 Danksagung

Ich danke Herrn PD Dr. med. Nils Hailer für die Überlassung des Dissertationsthemas.

Für die ausgezeichnete Betreuung der Arbeit danke ich Herrn PD Dr. med. Faramarz Dehghani und Herrn PD Dr. med. Nils Hailer.

Herrn Prof. Dr. med. Horst-Werner Korf und Herrn Dr. med. Ludwig Zichner danke ich für die Bereitstellung der Laborarbeitsplätze samt apparativer und materieller Ausstattung.

Für die hervorragende Unterstützung im Rahmen der Versuchsabläufe danke ich Herrn Chalid Ghadban und Frau Nadine Roser-Bloh.

Eine große Freude war mir die gemeinsame Zeit mit meinen Freunden und Mit-Doktoranden, die für mich Inspiration und Motivation in vielerlei Hinsicht waren.

Meiner Familie danke ich für das stetige Interesse am Fortschreiten des gesamten Schaffensprozesses und die damit verbundene Unterstützung.

5.5 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel

„Neuroprotektive Effekte des Immunsuppressivums MMF: Studien zur retrograden Markierung des Tractus perforans in der organotypischen hippocampalen Schnittkultur“

in der Orthopädischen Universitätsklinik Stiftung Friedrichsheim unter der Leitung von PD Dr. med. Nils Hailer und mit Unterstützung durch Herrn Prof. Dr. med. H.-W. Korf und Herrn PD Dr. med. F. Dehghani in der Dr. Senckenbergischen Anatomie, Institut für Anatomie II, ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen medizinischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Teile der vorliegenden Arbeit wurden in folgenden Publikationsorganen veröffentlicht:

Originalarbeit:

Oest TM, Dehghani F, Korf HW, Hailer NP (2006) The immunosuppressant mycophenolate mofetil improves preservation of the perforant path in organotypic

hippocampal slice cultures: A retrograde tracing study. Hippocampus 16: 437-442.

Tagungsbeitrag:

Posterbeitrag auf der 20. Arbeitstagung der Anatomischen Gesellschaft in Würzburg vom 01.10.03 – 03.10.03.

Oest TM, Korf HW, Hailer NP, Dehghani F (2003) Retrograde tracing of the perforant path in organotypic hippocampal slice cultures with Dil demonstrates neuroprotective effects of mycophenolate mofetil.

Neustadt i.H., den 11.05.2009

Tilman Oest