

Aus dem Institut für Klinische Neuroimmunologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. Martin Kerschensteiner

**Die Reorganisation von somatosensiblen Traktsystemen
nach Rückenmarksverletzungen im Mausmodell**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Julian Schwarting

aus Lübeck

2020

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

| | |
|--|--------------------------------------|
| Berichterstatter: | Prof. Dr. Martin Kerschensteiner |
| Mitberichterstatter: | PD Dr. Roman Schniepp |
| | Prof. Dr. Roman Haberl |
| | PD Dr. Max Wühr |
| Mitbetreuung durch die promovierte Mitarbeiterin: | PD Dr. Florence Bareyre |
| Dekan: | Prof. Dr. med. dent. Reinhard HICKEL |
| Tag der mündlichen Prüfung: | 09.07.2020 |

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|------------|---|------------|
| I | ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS | II |
| II | ABBILDUNGSVERZEICHNIS | VI |
| III | TABELLENVERZEICHNIS | VII |
| 1 | EINLEITUNG | 1 |
| 1.1 | Anatomie sensibler und motorischer Nervenbahnen | 1 |
| 1.2 | Definition von Rückenmarksverletzungen | 2 |
| 1.3 | Epidemiologie von Rückenmarksverletzungen | 2 |
| 1.4 | Klinisches Management von Rückenmarksverletzungen | 3 |
| 1.5 | Pathophysiologie von Rückenmarksverletzungen | 5 |
| 1.6 | Partielle Rückenmarksverletzungen (iSCI) | 10 |
| 1.7 | Plastizität neuronaler Netzwerke nach iSCI | 11 |
| 1.8 | Plastizität im somatosensiblen System | 16 |
| 1.9 | Techniken zur Bildgebung neuronaler Verbindungen | 18 |
| 1.10 | Fragestellungen | 21 |
| 2 | MATERIAL | 22 |
| 2.1 | Verwendete Materialien und Geräte | 22 |
| 2.2 | Versuchstiere | 28 |
| 2.3 | Viren | 28 |
| 3 | METHODEN | 31 |
| 3.1 | Operative Eingriffe | 31 |
| 3.2 | Aufarbeitung des Gewebes | 39 |
| 3.3 | Mikroskopie | 40 |
| 3.4 | Quantifizierung der Daten | 41 |
| 3.5 | Statistische Auswertung | 43 |
| 4 | ERGEBNISSE | 44 |
| 4.1 | Ergebnisse aus vorangegangenen Experimenten | 45 |
| 4.2 | Lokalisation der aussprossenden Axone | 46 |
| 4.3 | Injektionen in den <i>Nucleus cuneatus</i> | 49 |
| 4.4 | Verteilung der Interneurone im zervikalen Rückenmark | 58 |
| 4.5 | Kontakte der DRG-Axone auf Neurone mit Projektionen zum <i>Nucleus cuneatus</i> | 67 |
| 4.6 | Charakterisierung der NC-Neurone anhand von Signaltransmittern | 72 |
| 5 | DISKUSSION | 74 |
| 5.1 | Überblick der Ergebnisse | 74 |
| 5.2 | Methodik zur Darstellung von sensiblen Netzwerken | 76 |
| 5.3 | Spinale Neurone mit direkten Afferenzen zum <i>Nucleus cuneatus</i> | 80 |
| 5.4 | Komplettierung des Umgehungskreislaufs | 84 |
| 5.5 | Relevanz der Ergebnisse für die Entwicklung von Therapien | 86 |
| 5.6 | Abschließende Bemerkungen und Ausblick | 88 |
| 6 | LITERATURVERZEICHNIS | 90 |
| 7 | DANKSAGUNG | 103 |
| 8 | EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG | 104 |
| 9 | CURRICULUM VITAE | 105 |
| 10 | PUBLIKATIONSVERZEICHNIS | 107 |

I Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------------------------|--|
| # | Anzahl |
| AAV | Adeno-assoziierte Viren |
| Abb. | Abbildung |
| AG | Arbeitsgruppe |
| AMPA | α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure |
| ASIA | <i>American Spinal Cord Injury Association</i> (Amerikanische Rückenmarks-Gesellschaft) |
| BDA | <i>Biotinylated Dextran Amine (Biotiniliertes Dextran Amin)</i> |
| C2, C3, C4, C5, C6 | Zervikales spinales Segment (2,3,4,5,6) |
| CAG | CAG-Promotor |
| CFP | Cyan fluorescent protein (cyan fluoreszierendes Protein) |
| CSPG | <i>Chondroitin sulfate proteoglycan</i> (Chondroitinsulfat-Proteoglycan) |
| CST | <i>Corticospinal tract</i> (Pyramidenbahn) |
| CT | Computertomograph |
| CTB | Choleratoxin B |
| CVS | CVS-Promotor |
| DC | <i>Dorsal column</i> (Hinterstrang) |
| Dil | 1,1'- Dioctadecyl-3,3,3',3'-Tetramethyl-Indocarbocyanin Perchlorat |
| DNA | Deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure) |
| dpi | <i>Days post injury</i> (Tage nach Läsion) |
| DRG | Dorsal root ganglion (Spinalganglion) |
| Dura | <i>Dura mater</i> (harte Hirnhaut) |
| eGFP | <i>Enhanced green fluorescent protein</i> (verstärkt grün fluoreszierendes Protein) |
| EMG | Elektromyografie |
| et al. | <i>Et alter</i> (und andere) |

| | |
|--------|---|
| FGF-22 | Fibroblasten Wachstumsfaktor 22 |
| Fiji | <i>Fiji is just ImageJ</i> (Fiji ist nur ImageJ) |
| fMRT | Funktionelle Magnetresonanztomographie |
| g | Gramm |
| GFP | <i>Green fluorescent protein</i> (grün fluoreszierendes Protein) |
| GlyT2 | <i>Glycine transporter Typ 2</i> (Glyzin-Transporter Typ 2) |
| GmbH | Gesellschaft mit beschränkter Haftung |
| h | Stunde |
| HRP | <i>Horseradish Peroxidase</i> (Meerrettichperoxidase) |
| HSV-1 | Herpes-simplex-Virus Typ I |
| HWS | Halswirbelsäule |
| I.E. | Injektionseinheit |
| ires | <i>Internal ribosomal entry site</i> (interne ribosomale Eintrittsstelle) |
| iSCI | <i>Incomplete spinal cord injury</i> (inkomplette Rückenmarksverletzung) |
| IVC | <i>Individual ventilated cage</i> (Individuell ventilierter Käfig) |
| jew. | Jeweils |
| kDA | Kilodalton |
| LPSN | <i>Long propriospinal Neurons</i> (Lange propriospinale Neurone) |
| mg | Milligramm |
| min. | Minuten |
| mind. | Mindestens |
| ml | Milliliter |
| mm | Millimeter |
| MRT | Magnetresonanztomographie |
| n | Anzahl |
| NaCl | Natrium Chlorid |
| NC | <i>Nucleus cuneatus</i> |
| NC- | Zum <i>Nucleus cuneatus</i> projizierendes Interneuron im zervikalen Rückenmark |

| | |
|--------------|---|
| Neuron | |
| Ncl. | <i>Nucleus</i> |
| NG2 | Neural/glial antigen 2 (Neurales/Gliales Antigen 2) |
| nm | Nanometer |
| NMDA | N-Methyl-D-Aspartat |
| Nogo-A | Neurite outgrowth inhibitor (Neuriten Wachstums Inhibitor) |
| OP | Operation |
| p | Irrtumswahrscheinlichkeit |
| pc | Polycarbonat |
| PFA | Paraformaldehyd |
| pH | <i>Potentia Hydrogenii</i> (Stärke des Wasserstoffs) |
| PNS | Peripheres Nervensystem |
| PrV | Pseudorabies-Virus |
| rAAV | Rekombinante Adenoviren |
| RABV | Rabiesvirus |
| RHOA | <i>Ras homolog gene family, member A</i> (Rattensarkom homologe Genfamilie, Mitglied A) |
| RITC | Rhodamin-Isothiocyanat |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| S4, S5 | Sakrales Spinales Segment (4,5) |
| SAD | <i>Street alabama dufferin</i> (Alabama Dufferin Straße) |
| SCI | <i>Spinal cord injury</i> (Rückenmarksverletzung) |
| SPSN | <i>Short propriospinal Neurons</i> (Kurze propriospinale Neurone) |
| T2A | <i>Thosea asigna virus 2A self-cleaving peptides</i> (Vom thosea asigna virus abstammendes, selbstabspaltendes Peptid 2A) |
| Tab. | Tabelle |
| TGF- β | <i>Transforming Growth Factor-β</i> (Transformierender Wachstumsfaktor- β) |
| USA | <i>United States of America</i> (Vereinigte Staaten von Amerika) |
| vgl | vergleiche |

| | |
|-----|---|
| WGA | <i>Wheat germ agglutinin</i> (Weizenkeim-Agglutinin) |
| YFP | <i>Yellow fluorescent protein</i> (gelb-fluoreszierendes Protein) |
| ZNS | Zentrales Nervensystem |
| Δ | Delta, fehlend |
| Δ G | fehlendes Protein G |
| μg | Mikrogramm |
| μl | Mikroliter |
| μm | Mikrometer |

II Abbildungsverzeichnis

| | | |
|-----------|---|----|
| Abb. 1.1 | Bildgebung bei Traumata der Halswirbelsäule | 4 |
| Abb. 1.2 | Akutphase nach Rückenmarksverletzung | 5 |
| Abb. 1.3 | Subakutphase nach Rückenmarksverletzung | 7 |
| Abb. 1.4 | Chronische Phase Rückenmarksverletzung | 8 |
| Abb. 1.5 | Plastizität nach Rückenmarksläsionen im motorischen System | 14 |
| Abb. 3.1 | Injektionskanüle aus Glas für Virensuspension | 32 |
| Abb. 3.2 | OP Setup für C2-Läsion, sowie Injektion in DRG und NC | 33 |
| Abb. 3.3 | OP-Situs bei Hinterstrangbahnläsion auf Höhe C2 | 34 |
| Abb. 3.4 | OP-Situs bei Injektion in das Spinalganglion C6 | 36 |
| Abb. 3.5 | OP-Situs bei stereotaktischer Injektion in den Nucleus cuneatus | 38 |
| Abb. 3.6 | Zielkoordinaten der stereotaktischen Injektion in den <i>Nucleus cuneatus</i> | 39 |
| Abb. 4.1 | Kollateralenbildung von DRG-Axonon nach Verletzung des Rückenmarks..... | 46 |
| Abb. 4.2 | Lokalisation der aussproßenden Axone nach C2-Läsion | 48 |
| Abb. 4.3 | Illustration eines Spinalganglions nach Injektion von AAV eYFP | 49 |
| Abb. 4.4 | Lokalisation der Injektionen in den NC vor dem Beginn der Arbeit | 51 |
| Abb. 4.5 | Auswertung der Präzision der Injektion ohne Stereotaxie | 53 |
| Abb. 4.6 | Auswertung der Präzision der Injektion mit stereotaktischer Steuerung | 54 |
| Abb. 4.7 | Präzision verwendeter Injektionsmethoden | 55 |
| Abb. 4.8 | Experimentalaufbau zur Injektion des Rabiesvirus in den <i>Nucleus cuneatus</i> | 56 |
| Abb. 4.9 | Axialer Schnitt des <i>Nucleus cuneatus</i> nach Virusinjektion | 56 |
| Abb. 4.10 | Experimentalaufbau zur Kontrolle der Rabiesvirus-Injektion im Hirnstamm | 57 |
| Abb. 4.11 | Verteilung des Rabies-Virus und des AAV-Virus im Hirnstamm | 58 |
| Abb. 4.12 | Experimentalaufbau zur Analyse der Verteilung zervikaler NC-Neurone..... | 59 |
| Abb. 4.13 | Verteilung der Neurone mit NC-Projektionen im zervikalen Rückenmark..... | 60 |
| Abb. 4.14 | Longitudinale Darstellung der NC-Neurone im zervikalen Rückenmark | 60 |
| Abb. 4.15 | Evaluation der Verteilung von NC-Neuronen nach Hinterstrangbahnläsion | 62 |
| Abb. 4.16 | Longitudinale Darstellung der zervikalen NC-Neurone 21 Tage nach Läsion | 63 |
| Abb. 4.17 | Verteilung der NC-Neurone nach einer Hinterbahnstrangläsion | 65 |
| Abb. 4.18 | Axiale Darstellung der NC-Neurone im Überblick..... | 66 |
| Abb. 4.19 | Quantifizierung der Verteilung von NC-Neuronen 21 und 84 dpi | 67 |
| Abb. 4.20 | Analyse der Axonkontakte auf NC-Neurone nach einer C2-Läsion | 68 |
| Abb. 4.21 | Kontakte der aussproßenden Axone auf Interneurone mit Kontakt zum NC..... | 69 |
| Abb. 4.22 | DRG-Axone kontaktieren nach iSCI verstärkt zervikale NC-Neurone..... | 71 |
| Abb. 4.23 | Experimentalaufbau zur Analyse von Neurotransmittern in NC-Neuronen..... | 73 |
| Abb. 4.24 | Darstellung von NC-Interneuronen in einem GlyT2-Tier | 74 |
| Abb. 5.1 | Überblick der Ergebnisse der Promotion | 76 |
| Abb. 5.2 | Verteilung von NC-Neuronen im zervikalen Rückenmark im Affenmodell | 82 |

III Tabellenverzeichnis

| | | |
|---------|---|----|
| Tab. 1 | Einteilung von Querschnittslähmungen nach ASIA..... | 3 |
| Tab. 2 | Materialien zur Anästhesie der Versuchstiere..... | 23 |
| Tab. 3 | Instrumente für mikrochirurgische Eingriffe..... | 25 |
| Tab. 4 | Technische Geräte für die Operationen..... | 26 |
| Tab. 5 | Materialien für die Perfusion..... | 27 |
| Tab. 6 | Materialien zur Gewebeaufarbeitung..... | 28 |
| Tab. 7 | Technische Geräte zur Gewebeaufarbeitung..... | 28 |
| Tab. 8 | Mikroskopie..... | 28 |
| Tab. 9 | Verwendete Viren..... | 31 |
| Tab. 10 | Verwendete Virussuspensionen..... | 31 |
| Tab. 11 | Übersicht der verwendeten Fluorophore..... | 41 |

1 Einleitung

1.1 Anatomie sensibler und motorischer Nervenbahnen

Grundsätzlich können im zentralen Nervensystem sensible und motorische Signalwege unterschieden werden (Trepel, 2012). Motorische Signale entstehen im Kortex um den Gyrus praecentralis im Frontallappen. Sie werden über die Pyramidenbahn (*Tractus corticospinalis*) und den *Tractus corticonuclearis* in den Hirnstamm bzw. die Vorderhörner des Rückenmarks weitergeleitet (Bähr und Frotscher, 2009, Trepel, 2012). Hier wird segmental auf das zweite Neuron verschaltet. Ein Großteil der Fasern wechselt dabei bereits im Hirnstamm an der Pyramidenbahnkreuzung die Seite. Die restlichen Fasern kreuzen auf Segmentebene (Bähr und Frotscher, 2009).

Sensible Signale werden peripher wahrgenommen und über afferente (zuleitende) Nervenfasern, deren Perikarya in den Spinalganglien lokalisiert sind, in das ZNS fortgeleitet (Bähr und Frotscher, 2009). Bereits auf Segmentebene erfolgt die Verschaltung auf das zweite Neuron. Auf unterschiedlicher Höhe kreuzen die Neurone auf die Gegenseite, bis sie im Thalamus auf das dritte Neuron verschaltet werden (Bähr und Frotscher, 2009, Trepel, 2012). Diese Neuronen projizieren von hier aus zu den Kortexarealen, insbesondere zum *Gyrus postcentralis* zur Verarbeitung auf höherer Ebene (Bähr und Frotscher, 2009).

Ein wichtiger Teil dieser sensiblen Afferenzen sind die Hinterstrangbahnen, bestehend aus dem *Fasciculus gracilis* und *cuneatus*. Diese übermitteln vor allem Signale der Propriozeption und Wahrnehmung der Hautrezeptoren: Vibration, Druck, Tastsinn, Berührung (Bähr und Frotscher, 2009). Über pseudounipolare Zellen, deren Perikarya in den Spinalganglia sitzen, werden die Reize unverändert bis in die ipsilateralen Hinterstrangkern (*Nucleus cuneatus* und *Nucleus gracilis*) fortgeleitet. Dabei werden die Signale der oberen Körperhälfte vor allem im *Fasciculus cuneatus* und die Signale der unteren Körperhälfte im Wesentlichen im *Fasciculus gracilis* projiziert (Trepel, 2012). Erst in den Hinterstrangkernen erfolgt die Umschaltung auf das zweite Neuron. Über den *Lemniscus medialis* erfolgt die Kreuzung zur Gegenseite und die Fortleitung zum Thalamus (Bähr und Frotscher, 2009, Trepel, 2012).

1.2 Definition von Rückenmarksverletzungen

Rückenmarksverletzungen (Englisch: *spinal cord injury*, SCI) sind definiert als Verletzungen, die zu vorübergehenden oder dauerhaften Schädigungen des Rückenmarks führen. Man unterscheidet hierbei traumatische und atraumatischen Ätiologien. Während die traumatische Form durch akute äußere Einflüsse, wie beispielsweise Verkehrsunfälle oder im Rahmen von Stürzen auftritt, entstehen atraumatische Verletzungen im Rahmen von akuten oder chronischen Pathologien, wie beispielsweise Tumorerkrankungen, Infektionen oder degenerativen Wirbelsäulenveränderungen (Ahuja *et al.*, 2017).

1.3 Epidemiologie von Rückenmarksverletzungen

Die Epidemiologie von traumatischen Verletzungen des Rückenmarks unterscheidet sich weltweit erheblich (Ohne Verfasser, 2014, Hansebout, 2018). Während die Inzidenz in Nordamerika mit 39 Fällen pro 1 Million Einwohner pro Jahr am höchsten ist, treten in Europa und Australien nur etwa 15 bzw. 16 Fälle pro 1 Million Einwohner auf. Es wird postuliert, dass dieses im Wesentlichen auf höhere Kriminalitätszahlen und Selbstverletzungsdelikte zurückzuführen sei (Cripps *et al.*, 2011). Darüber hinaus sind Männer deutlich häufiger betroffen als Frauen: 79,8% vs. 20,02% (Chen *et al.*, 2016). Das Altersprofil der Verletzungen zeigt zwei Häufigkeitsgipfel: Zwischen 15 und 29 Jahren treten die meisten Verletzungen auf. Eine weitere Kumulation der Fälle ist ab einem Alter von 50 Jahren zu beobachten. In den letzten 40 Jahren nimmt dabei der prozentuale Anteil von Patienten über 60 Jahren deutlich zu (Ahuja *et al.*, 2017, Devivo, 2012, Sekhon und Fehlings, 2001).

Häufigste Ursachen für traumatische Verletzungen des Rückenmarks sind dabei Verkehrsunfälle. In den USA konnten 38% der Fälle zwischen 2010 und 2014 auf diese zurückgeführt werden (Chen *et al.*, 2016). Weitere häufige Ursachen sind Sportunfälle und Stürze. Letztere spielen vor allem bei älteren Patienten eine große Rolle (Chen *et al.*, 2016, Ahuja *et al.*, 2017). Verletzungen treten am häufigsten im zervikalen Rückenmark auf (60%). Thorakal (32%) und lumbosakral (9%) sind diese deutlich seltener (Chen *et al.*, 2016).

1.4 Klinisches Management von Rückenmarksverletzungen

Patienten mit Verletzungen des Rückenmarks präsentieren sich häufig mit starken Schmerzen im Bereich der Fraktur der Wirbelsäule. Verletzungen des Rückenmarks sind dabei häufig mit Schädel-Hirn-Traumata oder Extremitätenverletzungen assoziiert, sodass die klinische Diagnostik teilweise schwerfällt (Hasler *et al.*, 2012, Sekhon und Fehlings, 2001). Das neurologische Verletzungsmuster wird dabei nach der anatomischen Höhe des Schadens, sowie dem Ausmaß neurologischer Defizite in der ASIA-Skala klassifiziert (vgl. Tab. 1) (Waters *et al.*, 1991, Frankel *et al.*, 1969, Roberts *et al.*, 2017).

| American Spinal Injury Association Scale (ASIA) | |
|---|--|
| A | Komplett: Keine motorische oder sensible Funktion ist in den sakralen Segmenten S4-S5 erhalten. |
| B | Inkomplett: Sensible Funktion ist erhalten, aber keine motorische Funktion ist unterhalb des neurologischen Niveaus erhalten und dehnt sich bis in die sakralen Segmente S4/S5 aus. |
| C | Inkomplett: Motorische Funktion ist unterhalb des neurologischen Niveaus erhalten und über 50% der Kennmuskeln unterhalb des neurologischen Niveaus haben einen Muskelkraftgrad < 3 (nach Janda). |
| D | Inkomplett: Motorische Funktion ist unterhalb des Schädigungsniveaus erhalten und über 50% der Kennmuskeln unterhalb des neurologischen Niveaus haben einen Muskelkraftgrad ≥ 3 (nach Janda). |
| E | Normal: Sensible und motorische Funktionen sind normal. |

Tab. 1 Einteilung von Querschnittslähmungen nach ASIA

modifiziert nach Roberts *et al.* (2017)

Die initiale Evaluation und das klinische Management am Unfallort erfolgt nach dem ABCDE-Schema der Notfallmedizin (*Airway* (Atemweg), *Breathing* (Beatmung), *Circulation* (Kreislauf), und *Disability* (Defizit, neurologisches), *Environment* (Exploration)), sowie der klinischen Evaluation des Verletzungsausmaßes (American College of Surgeons, 2018). Darüber hinaus sollte bei Verdacht auf eine Verletzung des Rückenmarks die Halswirbelsäule des Patienten mittels Hals-Krawatte bis zum bildmorphologischen Ausschluss spinaler Verletzungen immobilisiert werden, um Folgeverletzungen zu vermeiden (Hadley *et al.*, 2002). Zeitnah sollte eine spinale Bildgebung mittels Röntgen oder CT-Bildgebung erfolgen und bei Verdacht auf eine Schädigung umgehend eine Feinschicht-CT-

Diagnostik der betroffenen Region ergänzt werden. Eine Magnetresonanztomographie-Diagnostik kann zudem bei stabilen Patienten hilfreich sein, um das Ausmaß der Schädigung zu evaluieren. Patienten mit Verletzungen im Bereich der Wirbelsäule sollten einem Neurochirurgen zur Evaluation einer operativen Dekompression und Stabilisierung vorgestellt werden (Deutsche Gesellschaft für Orthopädie und orthopädische Chirurgie + Berufsverband der Ärzte für Orthopädie, 2002). Eine Steroidtherapie ist nur bei Patienten ohne Risikofaktoren, wie beispielsweise Penetration des Rückenmarks, Polytrauma oder ausgeprägtem Schädelhirntrauma indiziert. Patienten mit akuter Querschnittssymptomatik sollten auf einer Intensivstation überwacht werden, um potentiell lebensbedrohliche Komplikationen im Sinne einer kardiovaskulären Instabilität oder eines respiratorischen Versagens behandeln zu können (Hansebout, 2018, Deutsche Gesellschaft für Orthopädie und orthopädische Chirurgie + Berufsverband der Ärzte für Orthopädie, 2002).

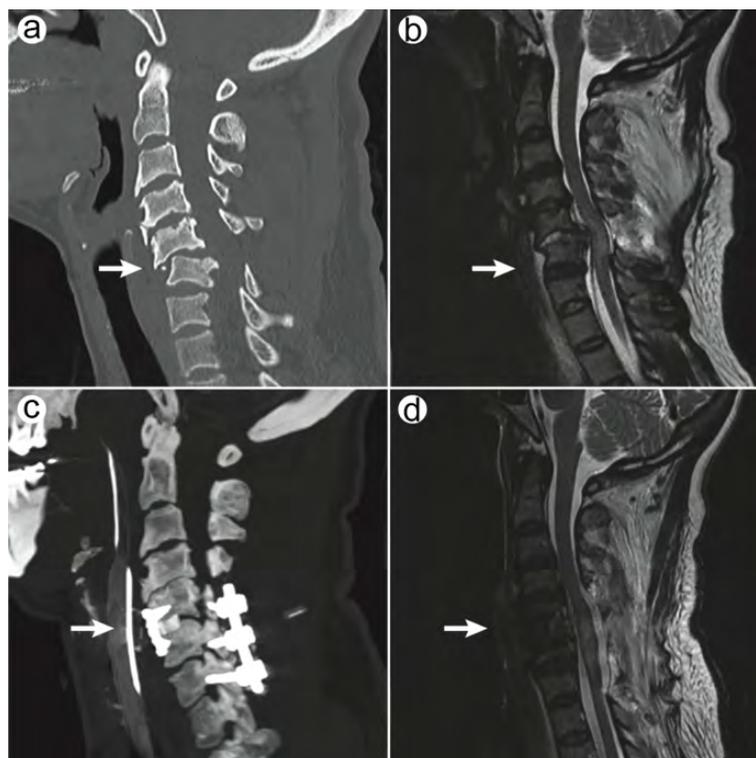


Abb. 1.1 Bildgebung bei Traumata der Halswirbelsäule

CT (a,c) und MRT (b,d)-Bildgebung einer Rückenmarksverletzung auf Höhe C5/C6 (a,b) mit Zustand nach operativer Versorgung mittels Stabilisierung (c,d), modifiziert aus Ahuja *et al.* (2017)

1.5 Pathophysiologie von Rückenmarksverletzungen

Die traumatische Verletzung des Rückenmarks kann grundsätzlich in Primär- und Sekundärschädigungen eingeteilt werden. Man unterscheidet zusätzlich zwischen einer Akutphase (<48 Stunden), einer Subakutphase (48 Stunden bis 14 Tage), einer Intermediärphase (14 Tage bis 6 Monate) und einer chronischen Phase (>6 Monate) (Ahuja *et al.*, 2017).

Im Moment des Traumas kommt es zu einer Zerstörung und Dislokation der knöchernen Anteile der Wirbelsäule, sodass es zu einer starken Kompression und starken Scherkräften auf das Rückenmark kommt (Ahuja *et al.*, 2017). Fokal werden dort Neurone und Oligodendrozyten verletzt, die vaskuläre Versorgung gestört und die Blut-Rückenmarks-Schranke durchbrochen (Ahuja *et al.*, 2017, Figley *et al.*, 2014). Zusammenhängend wird hierdurch eine Kaskade initiiert, welche zu sekundären Schädigungen des Rückenmarks und neurologischen Funktionseinschränkungen führt. Häufig sind diese sekundären Schädigungen dabei deutlich ausgeprägter als die initiale mechanische Schädigung (Ahuja *et al.*, 2017, Alizadeh *et al.*, 2019). Die Mechanismen der akuten Phase werden in Abb. 1.2 veranschaulicht.

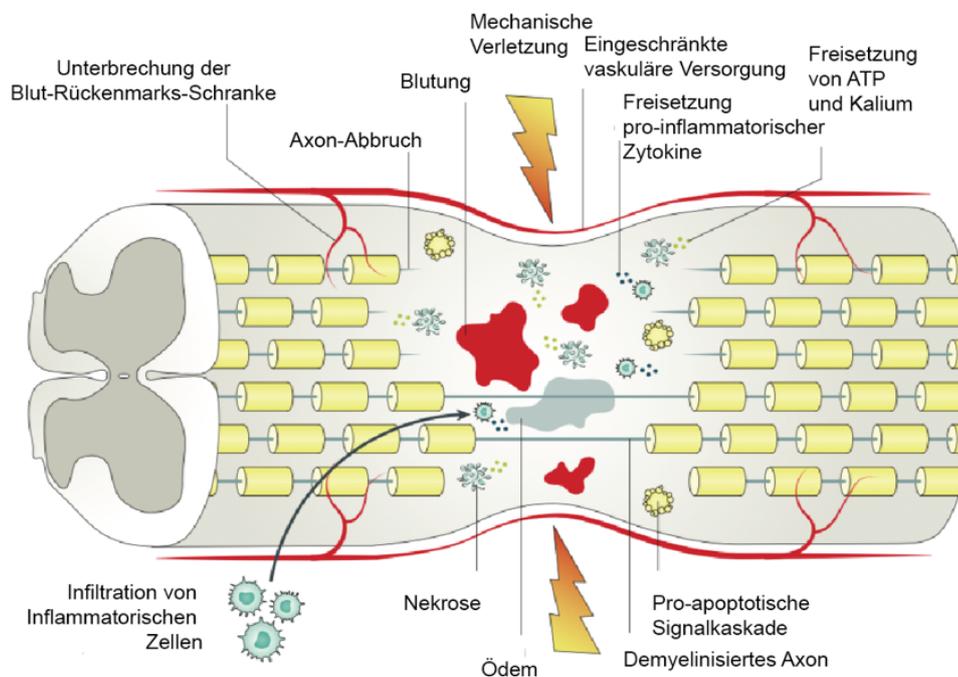


Abb. 1.2 Akutphase nach Rückenmarksverletzung
modifiziert aus Ahuja *et al.* (2017)

Durch die fehlende mikrovaskuläre Versorgung entstehen innerhalb von Minuten nach dem Trauma Ischämie, Erhöhung der Zellpermeabilität und proapoptotische Signalwege (Ahuja *et al.*, 2017). Zusätzlich kann die Verletzung von Gefäßen zu Einblutungen führen, sodass inflammatorische Zellen, Zytokine und vasoaktive Peptide ausgeschüttet werden können (Choo *et al.*, 2007).

Dieses zeigt sich beispielsweise durch den Nachweis von inflammatorischen Zytokinen, wie TNF und IL-1beta (Pineau und Lacroix, 2007). Inflammatorische Zellen, wie Makrophagen, neutrophile Granulozyten und Lymphozyten erreichen den Ort der Läsion und können weit über die Subakutphase hinaus nachgewiesen werden (Beck *et al.*, 2010). Die inflammatorische Reaktion in der akuten und subakuten Phase der Verletzung führt zusammen mit der gestörten Blut-Rückenmark-Schranke zu einer starken Ödembildung mit Schwellungsreaktion. Diese führt wiederum zu einer weiteren langstreckigen Kompression von bisher unbeteiligten Rückenmarksanteilen, was wiederum zu einer zusätzlichen Schädigung führen kann (Ahuja *et al.*, 2017, Alizadeh *et al.*, 2019).

In der Subakutphase kommt es durch Ischämie und Exzitotoxizität zu gravierenden Veränderungen des intra- und extrazellulären Ionenhaushalts (Alizadeh *et al.*, 2019). Eine wesentliche Rolle hierbei spielt insbesondere der starke Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration in Neuronen und insbesondere auch in deren Mitochondrien: NMDA(N-Methyl-D-Aspartat)-Rezeptor-Aktivierung verursacht mitochondrialen „Kalzium-Overload“, welcher wiederum apoptotischen oder nekrotischen Zelltod auslösen kann (Kwon *et al.*, 2004, Schanne *et al.*, 1979, Ahuja *et al.*, 2017, Pivovarova und Andrews, 2010, Alizadeh *et al.*, 2019).

Die Nekrose der Neurone und Gliazellen führt wiederum durch Ischämie, Inflammation und Exzitotoxizität zur Freisetzung von ATP, DNA und Kalium, sodass Mikrogliazellen aktiviert werden (Alizadeh *et al.*, 2019). Diese infiltrieren zusammen mit anderen inflammatorischen Zellen, wie aktivierten Makrophagen, Granulozyten und Lymphozyten den Ort der Verletzung, wo sie die inflammatorische Antwort beschleunigen und zur Apoptose der Neuronen und Oligodendrozyten weiter beitragen (Alizadeh *et al.*, 2019, Ahuja *et al.*, 2017). Mononukleäre Phagozyten, wie Makrophagen und Mikrogliazellen, sind in der Lage freies Myelin zu eliminieren, können jedoch auch weitere Schäden durch das Freisetzen von zytotoxischen Nebenprodukten, wie freien Sauerstoffradikalen

auslösen. Letztere verursachen zum Beispiel durch Peroxidation von Lipiden, oxidativen DNA Schäden und Oxygenierung von Proteinen zusätzlichen verspätet zusätzliche Nekrose und Apoptose (Ahuja *et al.*, 2017, Hausmann, 2003). Untergehende Neurone setzen zudem große Mengen an Glutamat frei (Alizadeh *et al.*, 2019). Da dieses nur unvollständig durch die überlebenden Astrozyten gepuffert werden kann, führt es zu NMDA (*N*-Methyl-D-Aspartat), AMPA (α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure) und Kainat-Rezeptor-Überaktivierung. Dies führt wiederum zum exzitoxischen Zelluntergang und zum Beginn von weiteren Sekundärkaskaden (Li *et al.*, 1999, Li und Stys, 2000, Ahuja *et al.*, 2017).

Die Schädigung der Autoregulation der Durchblutung im Bereich der Verletzung, sowie systemische Effekte, wie zum Beispiel die respiratorische Insuffizienz und Hypotension führen zu einer Tage bis Wochen andauernden Ischämie des betroffenen Gewebes und einer Vervielfachung des neurologischen Schadens, sodass hier die Grundlage für neuroprotektive Interventionen liegt (Ahuja *et al.*, 2017). Abb. 1.3 fasst die wichtigsten Mechanismen zusammen.

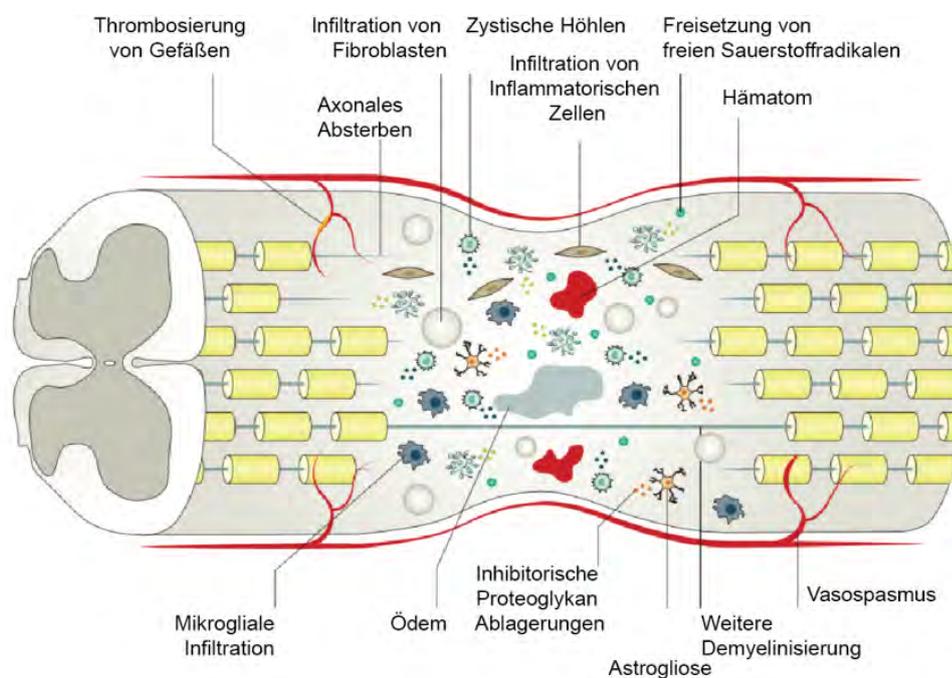


Abb. 1.3 Subakutphase nach Rückenmarksverletzung
modifiziert aus Ahuja *et al.* (2017)

Während bei der akuten und subakuten Phase die mechanische Verletzung und die inflammatorische Reaktion im Vordergrund stehen, kommt es in den späteren Phasen zur Reorganisation von langen Leitungsbahnen sowie zu Versuchen der Remyelinisierung, vaskulären Reorganisation und Veränderungen bei der Zusammensetzung der extrazellulären Matrix (Kwon *et al.*, 2004, Ahuja *et al.*, 2017). Beim Menschen kommt es nach dem Untergang von einer großen Anzahl von Neuronen und Gliazellen zur Bildung von zystischen Raumforderungen, die mit extrazellulärer Flüssigkeit, Makrophagen und einzelnen Bindegewebsbrücken gefüllt sind. Sie stellen ein Hindernis für das axonale Wachstum und die Zellmigration dar (Norenberg *et al.*, 2004, Ahuja *et al.*, 2017).

Zwei wesentliche Mechanismen tragen dazu bei, dass die axonale Regeneration im zentralen Nervensystem nur eingeschränkt stattfindet: Myelinisierung und die Entstehung einer Glianarbe.

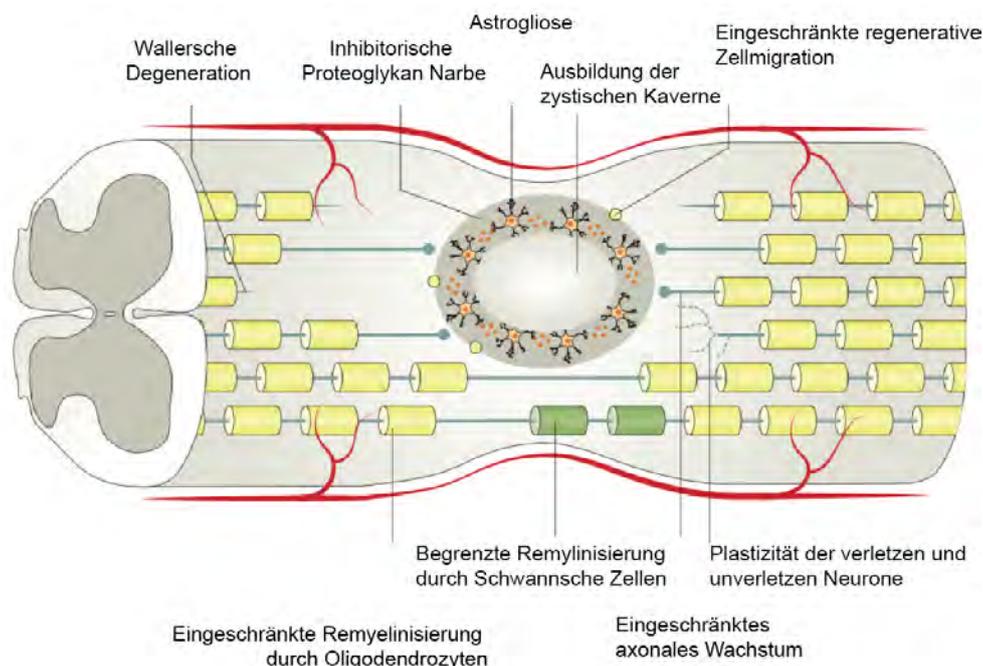


Abb. 1.4 Chronische Phase Rückenmarksverletzung

modifiziert aus Ahuja *et al.* (2017)

Nachdruck mit Genehmigung von Springer Nature: Nature Reviews Disease Primers, Traumatic spinal cord injury, Christopher S. Ahuja et al. © 2017

Im peripheren Nervensystem degenerieren die Axone distal der Verletzung (Wattersche Degeneration). Das Wachstum hemmende Myelin und Überreste der beschädigten Axone werden durch Makrophagen eliminiert. Die Schwann'schen Zellen dedifferenzieren und die Biosynthese von Myelin wird

heruntergeregelt, sodass die Axone regenerieren können (Stoll und Muller, 1999, Trepel, 2012). Im Anschluss bilden die Schwann'schen Zellen die Bänder, die den Axonen als Leitstruktur zu den distalen Nervenendigungen dienen. Zuletzt wird die Synthese von Myelin durch Alteration der Genexpression wieder hochreguliert, sodass die neuen Nervenscheiden gebildet werden (Stoll und Muller, 1999, Conforti *et al.*, 2014, Rojas-Vite *et al.*, 2019).

Im ZNS wird Myelin durch Oligodendrozyten produziert (Butt *et al.*, 2019). Während diese dasselbe Myelin wie die Schwannschen Zellen im PNS produzieren, sind sie nicht in der Lage, die Synthese von Myelin nach axonalem Schaden zu drosseln. Des Weiteren eliminieren sie auch nicht das freie Myelin an der Verletzung, sodass das axonale Wachstum weiterhin inhibiert wird (Filbin, 2003, Ahuja *et al.*, 2017).

Myelin hat also deutlich inhibierende Effekte auf das axonale Wachstum. Dies wird unter anderem durch das Protein „Nogo“ vermittelt (Schnell und Schwab, 1990). Monoklonale Antikörper gegen dieses Antigen induzieren eine deutliche Verbesserung des axonalen Wachstums *in vitro* und im Tiermodell (Caroni und Schwab, 1988, Schnell und Schwab, 1990, Kucher *et al.*, 2018, Chen *et al.*, 2017, Schneider *et al.*, 2019).

Nach Verletzung der Blut-Rückenmark-Schranke kommt es bereits in der Akutphase zur Ausschüttung von Molekülen wie Interleukin-1, TGF- β und Fibrinogen, die eine Narbenbildung auslösen (Cregg *et al.*, 2014). Die bereits angesprochenen zystischen Läsionen formieren sich im Zentrum der Läsion. Um dieses Zentrum kommt es zu einer engen netzartigen Anordnung der Astrozyten (Faulkner *et al.*, 2004, Silver und Miller, 2004). Abhängig davon, ob es sich um eine Kontusionsverletzung ohne Verletzung der Meningen oder um eine Stichverletzung mit meningealem Bezug handelt, organisieren sich die Astrozyten kugel- oder keilförmig um die Läsion (Silver und Miller, 2004). Durch aktivierte Mikroglia-Zellen, Astrozyten und Makrophagen werden Proteine der extrazellulären Matrix sezerniert, die das axonale Wachstum von Nervenzellen inhibieren. Zu diesen Proteinen gehören beispielsweise Chondroitin Sulfat (CSPG)-Proteoglykane und Neural/glial antigen 2 (Neurales/Gliales Antigen 2, NG2)-Proteoglykane, die zusammen mit Astrozyten die Narbe bilden. Insbesondere die CSPGs konnten als starke Inhibitoren der axonalen Regeneration identifiziert werden (Silver und Miller, 2004, Bellver-Landete *et al.*, 2019).

Oligodendrozytenvorläuferzellen, die NG2 exprimieren, migrieren zu dystrophischen Axonen entlang der Läsion. Perizyten werden aus den Gefäßwänden freigesetzt, proliferieren ebenfalls nach Traumata und agieren so synergistisch mit weiteren Bindegewebszellen, die eine große Anzahl von Proteinen der extrazellulären Matrix sezernieren (Silver und Miller, 2004, Picoli *et al.*, 2019). Fibroblasten infiltrieren die Region um die Verletzung herum und ersetzen die extrazelluläre Matrix durch gliales Narbengewebe mit dichten Kollagenablagerungen. Dieses führt letztendlich zu einer physischen und chemischen inhibitorischen Barriere für eine axonale Regeneration (Silver und Miller, 2004, Ahuja *et al.*, 2017).

1.6 Partielle Rückenmarksverletzungen (iSCI)

In Europa und den USA sind 55% der Verletzungen des Rückenmarks funktional inkomplett (Bunge *et al.*, 1997, Raineteau und Schwab, 2001). Diese werden auch als iSCI (*incomplete spinal cord injuries*) bezeichnet. Zusätzlich zeigen ca. 65% aller Patienten mit funktionell komplettem Querschnitt in bildgebenden Verfahren, hier allen voran im MRT, oder histopathologisch einen Rest an intaktem Gewebe mit Axonen, die nicht von der Verletzung betroffen sind (Raineteau und Schwab, 2001). Bei Patienten (Burns *et al.*, 1997, Waters *et al.*, 1995) und auch im Tiermodell (Little *et al.*, 1999) zeigt sich im Zeitverlauf hierbei häufig eine funktionelle Wiederherstellung, die sich innerhalb von Wochen bis Monaten entwickeln kann.

Die initiale Phase der Erholung tritt hierbei während der ersten Tage nach dem Unfallereignis auf. Sie ist hauptsächlich auf die Wiederherstellung des metabolischen Milieus und der Rückbildung der lokalen Ischämie und der ödematösen Schwellung zurückzuführen. Mittel- und langfristig kommt es im Menschen und im Tierexperiment teilweise zu einer Reorganisation von neuronalen Verbindungen auf verschiedenen Ebenen (Raineteau und Schwab, 2001).

Prinzipiell kann diese Wiederherstellung der neuronalen Verbindungen auf zwei verschiedene Arten entstehen:

Bereits bestehende neuronale Verbindungen können durch synaptische Plastizität verstärkt werden und so neue Aufgaben übernehmen (Raineteau und Schwab, 2001). Zeitgleich können neue neuronale Verbindungen durch das

Auswachsen von neuen Axonkollateralen (*Sprouting*) und durch anatomische Reorganisation dieser entstehen (Raineteau und Schwab, 2001, Blesch und Tuszynski, 2009).

1.7 Plastizität neuronaler Netzwerke nach iSCI

Die Plastizität bestehender neuronaler Netzwerke nach einem traumatischen Ereignis findet auf verschiedenen Ebenen des zentralen Nervensystems statt (Raineteau und Schwab, 2001). Ein Großteil der aktuellen Forschung bezieht sich hierbei auf die motorischen Bahnen, wobei hier der *Tractus corticospinalis*, der auch als Pyramidenbahn bezeichnet wird, am häufigsten als Modell-System genutzt wird: Nach peripheren oder zentralen Verletzungen des Nervensystems kommt es auf der Ebene des motorischen Kortex zu Veränderungen. Hier zeigen beispielsweise verschiedene Studien an Primaten, dass sich nach Amputation von einzelnen Gliedmaßen im primären Motorkortex die elektrophysiologisch aktiven Areale reorganisieren (Qi *et al.*, 2000, Wu und Kaas, 1999).

Auch beim Menschen konnten fMRT-Studien zeigen, dass bei para- bzw. tetraplegischen Versuchspersonen die Motorareale unterschiedlich verteilt sind. Darüberhinaus unterscheidet sich die neuronale Aktivität im Vergleich zu gesunden Versuchspersonen auch im somatosensorischen Kortex, Thalamus, in den Basalganglien und im Kleinhirn (Mohammed und Hollis, 2018).

Das motorische System ist kein strikt hierarchisches System, bei dem Signale streng im Motorkortex generiert werden und hierarchisch über die subkortikalen Systeme und das Rückenmark zu der ausführenden Muskulatur weitergegeben werden. Viel mehr bestehen auch subkortikale Netzwerke, die Signale sowohl mit dem Kortex, als auch untereinander und mit spinalen Neuronen austauschen. Insbesondere die pontinen Kerne, der Raphekern, der inferiore Olivenkerne, der *Nucleus trigeminus*, der *Nucleus ruber*, aber auch die *Nucleus gracilis* und *Nucleus cuneatus* sind Teil dieses Netzwerks (Raineteau und Schwab, 2001, Garcia-alias *et al.*, 2015, Kambi *et al.*, 2014, Halder *et al.*, 2018). In Studien an Affen wurde die Auswirkung von partiellen kortikospinalen (CST)-Läsionen untersucht (Lawrence und Kuypers, 1968a, Lawrence und Kuypers, 1968b). Diese zeigten, dass Tiere die Funktionen teilweise wieder regenerieren konnten. Im selben Versuch wurde anschließend eine Läsion im ipsilateralen

Nucleus ruber gesetzt. Dies führte wiederum zu einer Verschlechterung der funktionellen Erholung, sodass davon ausgegangen werden kann, dass die rubrospinalen Bahnen zumindest teilweise die beschädigten Signalwege kompensieren konnten. Weitere Studien zeigten die Plastizität von bulbospinalen und rubrospinalen Faserbahnen nach CST-Läsionen in der Katze (Alstermark *et al.*, 1987). Es konnte zudem ein Einfluss von absteigenden somatosensiblen Signalwegen zur spontanen Wiederherstellung nachgewiesen werden (McKenna und Whishaw, 1999, Bareyre, 2008, Halder *et al.*, 2018, Garcia-Alias *et al.*, 2015).

Bereits 2001 konnte durch Weidner *et al.* die intraspinale Plastizität nach CST-Läsionen nachgewiesen werden. Die Gruppe zeigte, dass eine nahezu vollständige Läsion der dorsalen Fasern der Pyramidenbahn zu einem spontanen Aussprossen (*Sprouting*) von kleineren, intakt gebliebenen Fasern des ventralen CST führt. In funktionellen Untersuchungen der gezielten Motorik des Vorderbeins zeigte sich parallel dazu eine Verbesserung. Eine spätere Läsion des ventralen, intakten Anteils verschlechterte die Funktion wiederum, sodass davon ausgegangen werden kann, dass die Verbesserung in Zusammenhang mit dem axonalen Aussprossen stand (Weidner *et al.*, 2001, Bareyre, 2008, Brown und Martinez, 2019, Wang *et al.*, 2018, Ueno *et al.*, 2012, Zorner *et al.*, 2014).

Bareyre *et al.* entwickelten 2005 ein Verfahren, mit dem der CST von Mäusen genetisch mit *yellow fluorescent protein* (gelb-fluoreszierendes Protein, YFP) markiert werden kann, um die spinale Plastizität genauer beschreiben zu können (Bareyre *et al.*, 2005). Im Rahmen derselben Studie wurden die Auswirkungen von CST-Läsionen weiter quantifiziert. Wie bereits in den vorhergehenden Studien beschrieben, bestätigte sich, dass die verbleibenden „kleineren“ dorsolateralen und ventralen CST-Komponenten nach einer Läsion des dorsalen CSTs vermehrt aussprossen. Hierbei zeigte sich, dass die Anzahl der Kollateralen im Zeitverlauf zunächst gleichblieb (1 Woche) und dann im Verlauf deutlich zunahm, sodass sich 3 Wochen nach Läsion die Anzahl der Kollateralen bereits verdoppelte. Zusätzlich wurde die Anzahl von direkten Kontakten mit Motoneuronen quantifiziert. Hierbei zeigte sich, dass die Anzahl von direkten Kontakten sich ebenfalls nach einer Woche nicht signifikant veränderte, sich jedoch 4 Wochen nach Läsion ebenfalls verdoppelte (Bareyre *et al.*, 2005).

Neben der Plastizität von unverletzten Anteilen der Pyramidenbahn wurde in verschiedenen Studien das Aussprossen von verletzten Fasertrakten beschrieben. Dieses *Sprouting* wurde in verschiedenen Lokalisationen nachgewiesen. Hill *et al.* beschrieben zunächst 2001 das Auswachsen von Fasern des CST und retikulospinaler Fasern nach Kontusionen des Rückenmarks an der Läsionsstelle (Hill *et al.*, 2001). Anschließend konnte gezeigt werden, dass im Rückenmark auch proximal einer Verletzung Plastizität stattfindet (Fouad *et al.*, 2001). So bilden durchtrennte Neurone, die eigentlich in das lumbale Rückenmark projizieren, Ausläufer im zervikalen Rückenmark, um Signale auf intakte Axone fortleiten zu können. Dieser Mechanismus wurde in der Folge weiter charakterisiert und kann in 4 Phasen eingeteilt werden (vgl. Abb. 1.5) (Bareyre *et al.*, 2004, Kerschensteiner *et al.*, 2004, Lang *et al.*, 2012, Blight, 2004):

1. Verletzte Neurone, mit Zielgebieten im lumbalen Rückenmark, bilden Kollateralen in das zervikale Rückenmark rostral der Verletzung.
2. Durch die Kollateralen werden Interneurone durch lange und kurze proprio-spinale Interneurone kontaktiert.
3. Die axonalen Kontakte zu Interneuronen, die in das Zielgebiet projizieren, werden intensiviert, während andere Kontakte rarifizieren.
4. Kontaktierte Interneurone verstärken ihre Projektionen zu den ursprünglichen Zielgebieten.

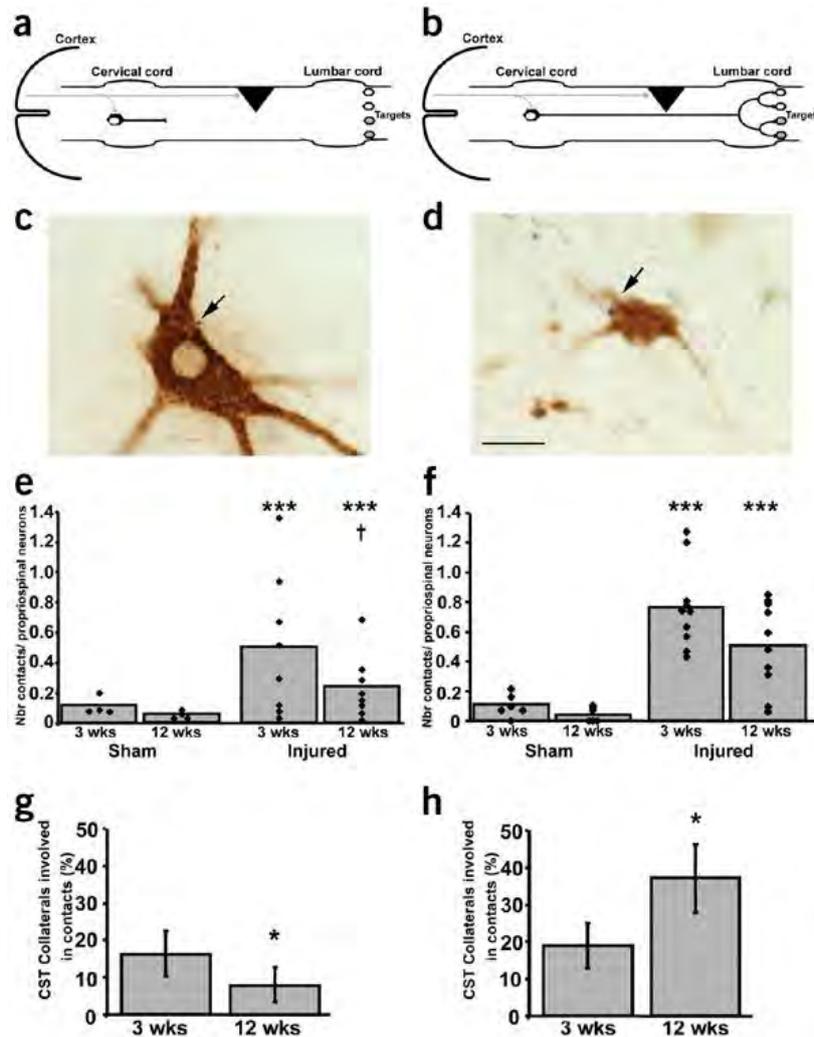


Abb. 1.5 Plastizität nach Rückenmarksläsionen im motorischen System

Quantifizierung der Kontakte von Hinterlauf-CST-Kollateralen auf kurze (a,c,e,g) und lange(b,d,f,h) propriospinale Neurone im zervikalen Rückenmark.

Panel (a) und (b) zeigen die Reorganisation zwischen Kollateralen der Pyramidenbahn (CST) mit kurzen (a) bzw. langen (b) propriospinalen Neuronen.

(c) zeigt den Kontakt mit synaptischen Boutons (Pfeil) zwischen einem propriospinalen Neuron, retrograd markiert vom kaudalen zervikalen Rückenmark (braun) und der Axon-Kollaterale eines CST-Neurons mit dem Ziel der Hinterläufe (schwarz) 3 Wochen nach einer Hemisektion des thorakalen Rückenmarks.

In (d) ist der Kontakt des synaptischen Boutons einer CST-Axon-Kollaterale auf ein langes propriospinales Neuron zu einem chronischen Zeitpunkt 12 Wochen nach thorakalen Hemisektion dargestellt, welches retrograd vom lumbalen Rückenmark markiert wurde.

(e) quantifiziert die Anzahl der Kontakte von Hinterlauf CST-Kollateralen mit kurzen propriospinalen Neuronen auf die Gesamtanzahl der propriospinalen Neurone.

In (f) wird die Anzahl der Kontakte zwischen Hinterlauf CST-Kollateralen und langen propriospinalen Neuronen in Relation zur Gesamtanzahl letzterer dargestellt. Der Prozentsatz der Hinterlauf CST-Kollateralen im Kontakt zu kurzen propriospinalen Neuronen wird in (g) dargestellt.

(h) zeigt abschließend den Prozentsatz beteiligter Hinterlauf CST-Kollateralen im Kontakt mit langen propriospinalen Neuronen.

modifiziert nach Bareyre *et al.* (2004)

Bei den propriospinalen Interneuronen wird zwischen einer kurzen (*Short propriospinal Neurons*, SPSN) und einer langen Subpopulation (*Long propriospinal Neurons*, LPSN) unterschieden (Bareyre *et al.*, 2004). Beide verschalten die Motoneuronpopulationen auf unterschiedlichen Ebenen im Rückenmark. Während die SPSN jedoch innerhalb des zervikalen Anteils verschalten und eine Rolle bei der visuell gesteuerten Zielmotorik spielen, verbinden LPSN das lumbale mit dem zervikalen Rückenmark, um Bewegungen zu koordinieren. Diese Projektion der LPSN gibt also den Neuronen die Möglichkeit, die Läsion zu überbrücken (Bareyre *et al.*, 2004, Kerschensteiner *et al.*, 2004, Lang *et al.*, 2012, Jacobi *et al.*, 2015, Loy *et al.*, 2018).

Durch retrogrades Markieren (*Labelling*) konnte gezeigt werden, dass die Population der Interneurone in Versuchstieren mit Läsion ähnlich der Interneurone in unverletzten Kontrolltieren verteilt waren. Entlang der zervikalen Aufweitung des Rückenmarks sind SPSN in Lamina I-VI, sowie Lamina VIII lokalisiert, während LPSN ventraler in Laminae IV-VIII lokalisiert sind, wobei die Mehrzahl der dargestellten Neurone in Lamina VIII und dem medialen Anteil der Lamina VII lagen. Interessant ist zudem der zeitliche Verlauf der axonalen Reorganisation. Die Anzahl der Kontakte zu propriospinalen Neuronen nimmt sowohl bei LPSN als auch bei SPSN 3 Wochen nach Läsion zu. Nach 12 Wochen reduziert sich jedoch die Anzahl der Kontakte pro Neuron wieder, sodass postuliert wird, dass lediglich funktionell intakte Verbindungen bestehen bleiben. Bei den SPSN fällt jedoch darüber hinaus die absolute Anzahl an CST Kollateralen, die in Kontakt mit den Interneuronen stehen. Im Gegensatz hierzu steigt die Anzahl der Kontakte mit LPSN. Im lumbalen Rückenmark konnte wiederum eine Zunahme der Kontakte der Axone der LPSN mit den lumbalen Motoneuronen nachgewiesen werden. Es ist also davon auszugehen, dass vor allem letztere eine wichtige Rolle bei der Ausbildung axonaler Umgehungswege spielen (Bareyre *et al.*, 2004).

Neben der anatomischen Beschreibung dieser Umgehungskreisläufe konnte durch elektrophysiologische Untersuchungen auch die Funktionalität dieser Wege dargestellt werden. Bereits in der 2004 erschienenen Arbeit von Bareyre *et al.* konnte eine partielle Wiederherstellung der Funktionalität anhand von elektromyographischen Ableitungen (EMG) am Hinterlauf nach Cortexstimulation

nachgewiesen werden. Nach 12 Wochen zeige sich eine signifikante Verbesserung der EMG Antwort auf kortikale Reize (Bareyre *et al.*, 2004).

In einer Folgestudie untersuchten Courtine *et al.* 2008 die partielle funktionelle Wiederherstellung mittels Blockierung der glutamatergen Signalübertragung mittels N-Methyl-D-Aspartat (NMDA) auf Höhe der Läsion. Es zeigte sich, dass die Funktionalität hierdurch verschlechtert wird, sodass davon ausgegangen werden kann, dass die neu gebildeten Synapsen wichtig für das funktionelle Outcome sind (Courtine *et al.*, 2008).

Van den Brand *et al.* konnten zudem 2012 zeigen, dass eine Kombination von Elektrostimulation (Harkema *et al.*, 2011) und Injektion eines Serotonin Rezeptoragonisten, sowie Dopaminrezeptoragonisten (Courtine *et al.*, 2009) in Kombination mit gezieltem roboterunterstützendem Training (Musienko *et al.*, 2011) Ratten ermöglicht, die unteren Extremitäten wieder gezielt anzusteuern (van den Brand *et al.*, 2012).

Neben diesen Studien der Pyramidenbahn untersuchten Filli *et al.* 2014 die Plastizität von propriospinalen Projektionen nach inkompletter Rückenmarkläsion. Hierfür wurden extrapyramidalmotorische Fasertrakte im Bereich der *Formatio reticularis* markiert. Bei Tieren mit einer Hemisektion auf Höhe C4 konnte ein vermehrtes Auswachsen von Fasern rostral der Verletzung nachgewiesen werden. Außerdem konnte, ähnlich wie bei der Pyramidenbahn zuvor, der Kontakt zu Interneuronen nachgewiesen werden, welche an ähnlicher Lokalisation im ventralen Horn des zervikalen Rückenmarks zu finden waren (Filli *et al.*, 2014).

1.8 Plastizität im somatosensiblen System

Während die Plastizität von motorischen Netzwerken bereits umfangreich erforscht worden ist, gibt es bis dato weniger Studien zur Plastizität von sensiblen Netzwerken nach inkompletten Rückenmarksläsionen.

In einer Arbeit an Affen zeigten Jain und Kaas 1997 erstmals die Auswirkungen von einer zervikalen Läsion der Hinterstrangbahnen auf den Kortex. Hierbei zeigte sich zunächst, dass eine komplette Läsion der ipsilateralen Hinterstrangbahnen zu einem Erlöschen der Reizantwort im primären sensomotorischen

Kortex nach sensibler Stimulation der Hand führt. In derselben Arbeit konnte zudem auch nachgewiesen werden, dass eine partielle Verletzung zwar initial zu einer Verringerung der Reizantwort führte, aber sich diese nach wenigen Wochen bereits partiell erholen konnte. Zusätzlich konnte 2008 auch eine umfangreiche Reorganisation des Kortex nach Läsionen des *Tractus cuneatus* gezeigt werden (Jain *et al.*, 1997, Jain *et al.*, 2008).

Cadotte und Fehling konnten darüber hinaus in einer fMRT-Studie zeigen, dass sich Kortexareale bei Patienten mit inkompletten Rückenmarksläsionen von gesunden Vergleichspersonen unterscheiden. Es konnte nachgewiesen werden, dass die nicht betroffenen sensiblen Kortexareale eine stärkere Antwort auf Hitzereize zeigten als bei gesunden Probanden (Cadotte *et al.*, 2012).

Im Bereich des Hirnstamms zeigten Kambi und Jain anhand von elektrophysiologischen Mappingstudien an Affen, dass es auch auf Ebene des *Nucleus cuneatus* Mechanismen der Plastizität nach Läsionen der zervikalen Hinterstrangbahnen gibt. In Tieren mit chronischen Läsionen kam es hierbei zu einer Überrepräsentation der intakten Areale im primären sensorischen Kortex. Durch eine experimentelle Inhibition des *Nucleus cuneatus* konnte diese kortikale Überrepräsentation rückgängig gemacht werden, sodass die Autoren postulierten, dass die Umorganisation des Cortex vor allem auf die Plastizität des *Nucleus cuneatus* zurückzuführen sei (Kambi *et al.*, 2014).

Die intraspinale Plastizität der Hinterstrangbahnen wurde von der Arbeitsgruppe um Liao und Kaas an Affen untersucht (Liao *et al.*, 2018, Liao *et al.*, 2015). Sie konnten zeigen, dass beim Affen Interneurone im Rückenmark durch retrogrades *Labelling* vom *Nucleus cuneatus* ausgehend dargestellt werden können, welche vor allem in Lamina IV lokalisiert sind (Liao *et al.*, 2015). Nach einseitiger Durchtrennung des *Tractus cuneatus* auf Höhe C4 zeigte sich kaudal der Läsion eine deutlich niedrigere Anzahl von markierten Interneuronen. Jedoch präsentierten sie, dass ein Teil der Population der Interneurone über einen langen Zeitraum hinweg (>7 Monate) trotz der Läsion in der Lage war, Signale an den *Nucleus cuneatus* fortzuleiten. Darüber hinaus konnte bei einer vollständigen Läsion des *Tractus cuneatus* keine signifikante Zunahme der markierten Interneuronen nach Läsionen festgestellt werden, während nach partieller Läsion (< 95%) eine Zunahme der dargestellten Interneurone erkennbar war. In den elektrophysiologischen Untersuchungen kortikaler Signale wurde eine

Korrelation aus Anzahl der markierten Interneurone kaudal der Läsion und dem Nachweis von kortikalen Antworten nach Applikation von sensiblen Reizen des ipsilateralen Innervationsgebiets vermutet werden. Diese zeigte sich jedoch statistisch als nicht signifikant (Liao *et al.*, 2018).

1.9 Techniken zur Bildgebung neuronaler Verbindungen

Zur spezifischen Darstellung neuronaler Netzwerke können verschiedene Methoden verwendet werden. Spezielle Farbstoffe (*Tracer*), wie beispielsweise Rhodamin-Isothiocyanat (RITC), 1,1'-Diocetyl-3,3,3',3'-Tetramethyl-Indocarbocyanin Perchlorat (Dil), Biotinylated Dextran Amine (BDA) werden in Neuronen aufgenommen, breiten sich innerhalb des Neurons aus und werden entlang der neuronalen Fortsätze auch transsynaptisch transportiert (Huh *et al.*, 2010, Godement *et al.*, 1987, Thanos *et al.*, 1987, Holmqvist *et al.*, 1992, Sparks *et al.*, 2000, Halberstadt und Balaban, 2007, Reiner *et al.*, 2000).

Man unterscheidet hierbei grundsätzlich zunächst, ob ein *Tracer* sich anterograd, also in Richtung der Signaltransduktion, oder retrograd, entgegen der Signaltransduktion, ausbreitet. Anterograde *Tracer* können beispielsweise verwendet werden, um Projektionsfelder einzelner Neuronenpopulationen darzustellen. Retrograde *Tracer* sind hingegen geeignet, um den Ursprung axonaler Projektionen und somit die Lokalisation der Perikarya darzustellen. (Deshpande, 2012).

Als Substanzen zur Darstellung neuronaler Netzwerke können dabei sowohl „konventionelle *Tracer*“ oder Viren, die fluoreszierende Proteine exprimieren, verwendet werden (Huh *et al.*, 2010).

Als konventionelle *Tracer* werden Proteine bezeichnet, die sich, entlang der Mikrotubuli der Neuronen ausbreiten. Man kann hierbei Moleküle für die anterograde Darstellung, wie beispielsweise BDA oder RITC von Molekülen für die retrograde Darstellung von Neuronen, wie beispielsweise das Enzym Meerrettichperoxidase (Englisch horseradish peroxidase, HRP) oder Hydroxystilbamidin verwenden (Deshpande, 2012). Einige *Tracer* breiten sich auch bidirektional aus, wie zum Beispiel wheat germ agglutinin (WGA) (Schwab *et al.*, 1978, Schmued und Fallon, 1986, LaVail, 1975). Die Proteine

können anschließend entweder enzymatisch oder immunhistochemisch nachgewiesen werden (Deshpande, 2012, Saleeba *et al.*, 2019).

Konventionelle *Tracer* haben jedoch eine Reihe von Nachteilen. Zum einen ist die Aufnahme der Proteine in das Neuron teilweise unspezifisch, sodass neben den eigentlichen Zielzellen auch Glia markiert werden (Rhodes *et al.*, 1987). Hinzu kommt eine teilweise bidirektionale Ausbreitung des *Labellings* (Yoshihara *et al.*, 1999), sowie ein schlechter transsynaptischer Transport mit Verdünnung der Tracerkonzentration nach jeder Synapse (Sawchenko P, 1985, Deshpande, 2012, Saleeba *et al.*, 2019).

Virale *Tracer* sind in der Lage einige der Nachteile von konventionellen *Tracern* zu kompensieren. Ausgewählte Viren infizieren spezifisch Neurone. Sie können transsynaptisch weitergegeben werden und verstärken ihr „*Tracer-Signal*“ durch Replikation in den Zielzellen (Kuypers und Ugolini, 1990).

Verschiedene Viren werden verwendet, um neuronale Netzwerke darzustellen:

Herpes Viren

Herpes Viren, wie beispielsweise Herpes simplex Virus 1 und Pseudorabies Virus gehören zu den ersten Viren, die als neuronale *Tracer* verwendet wurden. Es handelt sich hierbei um eine Familie der umhüllten Doppelstrang-DNA-Viren. Diese breiten sich primär bidirektional aus (Saleeba *et al.*, 2019, Deshpande, 2012). Einzelne Stämme wie beispielsweise der H129-Stamm des HSV-1-Virus breiten sich anterograd aus, während sich andere Stämme, wie beispielsweise der Bartha-Stamm des PrV retrograd ausbreiten (Ugolini, 2010, Kuypers und Ugolini, 1990, Deshpande, 2012). Herpes-Viren haben jedoch den Nachteil, dass diese zytotoxisch sind und das infizierte Neuron somit schnell degeneriert. Zusätzlich verbreiten sich die Viren lokal über Gliazellen zu anderen Neuronen, sodass das *Labelling* teilweise unspezifisch wird (Ugolini, 2010).

Adeno-assoziierte Viren

Rekombinante Adeno-assoziierte Viren (rAAV) gehören überwiegend zu den anterograden neuronalen *Tracern*. Durch einen geringen Anteil von eigenen Kodierungssequenzen auf dem viralen DNA-Strang entsteht kaum eine Inflammation und die Injektionsstelle sowie die infizierten Neurone werden nicht geschädigt (Chamberlin *et al.*, 1998, Xiao *et al.*, 1997). Darüber hinaus zeigen

rAAV ein hohes Maß an Transduktionsstabilität und Spezifität, sodass sie in vielen Studien erfolgreich verwendet wurden (Jacobi *et al.*, 2015, Bareyre *et al.*, 2011, Hintiryan *et al.*, 2016). Tervo *et al.* veröffentlichten 2016 zudem eine Studie, bei der sie zeigten, dass AAV auch für das retrograde *Labelling* von neuronalen Projektionen verwendet werden kann (Tervo *et al.*, 2016).

Rabies Viren

Rabies Viren (RABV) sind etablierte *Tracer* zur retrograden Darstellung von Neuronen (Kuypers und Ugolini, 1990, Ugolini, 1995, Saleeba *et al.*, 2019) Es handelt sich hierbei um ein kleines, neurotropisches Virus, welches zu der Familie der Rhabdoviridae gehört und die letale Zoonose Tollwut überträgt (Wickersham *et al.*, 2007a). Das Virus besteht aus einem 12 Kilobasen langen RNA-Genom, welches 5 Proteine kodiert: Das Nukleoprotein N, die Polymerase L, das Phosphoprotein P, das Matrixprotein M und das Glycoprotein G. Das Glykoprotein G spielt dabei die wichtigste Rolle bei der Infektion des Wildtyp-RABV. Es handelt sich hierbei um ein 62-67 kDA Glykoprotein, welches als Trimer auf der Virusoberfläche sitzt (Wickersham *et al.*, 2007a, Deshpande, 2012). Es spielt eine wichtige Rolle bei der Verschmelzung der Virions mit der Wirtszelle und ist somit essentiell für die Aufnahme des Virus an der Synapse (Warrell und Warrell, 2004, Schnell *et al.*, 2010, Deshpande, 2012).

Wickersham *et al.* entwickelten 2007 eine Methode, um Darstellungen von monosynaptisch verbundenen neuronalen Populationen zu erhalten (Wickersham *et al.*, 2007a). Hierfür modifizierten sie die Eigenschaften des Rabiesvirus, indem sie im ersten Schritt in einem SAD B19 - Stamm die für das Glykoprotein kodierende Sequenz des Virus herausklonierten und durch die Sequenz des fluoreszierenden Farbstoffs eGFP ersetzten. Dieser Stamm wurde auch als SAD Δ G-eGFP bezeichnet. Durch eine lokale Applikation des Protein G mittels AAV konnte der Virus trotzdem an der Injektionsstelle aufgenommen werden, sich jedoch nicht transsynaptisch ausbreiten, sodass ein monosynaptischer *Tracer* entstand (Wickersham *et al.*, 2007a, Wickersham *et al.*, 2007b, Deshpande, 2012).

1.10 Fragestellungen

Um zu verstehen, ob die Ausbildung von intraspinalen axonalen Umgehungswegen auf motorische Faserbahnen limitiert ist, oder ob die Mechanismen auf weitere neuronale Funktionssysteme ausgeweitet werden können, sollte in dieser Arbeit die Plastizität von somatosensiblen Fasertrakten nach einer Verletzung des zervikalen Rückenmarks untersucht werden. Als Modelmechanismus wurde die aufsteigenden Bahnen der Spinalganglien verwendet, da hier zum einen die Perikarya für virale Injektionen gut zugänglich sind und zum anderen die Axone langstreckig im zervikalen Rückenmark verfolgt werden können. Erste Ergebnisse in unserem Labor zeigten bereits Hinweise auf die vermehrte Bildung von axonalen Kollateralen nach Läsion des *Tractus cuneatus*. In diesem Projekt sollen daraus folgende Fragestellungen weiter untersucht werden:

1. In welchem Bereich des Rückenmarks sprossen die entstehenden Kollateralen der Hinterwurzelganglienaxone aus?
2. Kontaktieren die Axone Interneurone im zervikalen Rückenmark?
3. Haben diese Interneurone Kontakt zu den höher gelegenen Zentren, wie beispielsweise dem *Nucleus cuneatus* im Hirnstamm?
4. Spielen bestimmte Interneuronpopulationen eine besonders wichtige Rolle als sensible Relaisstationen?

Zur Beantwortung dieser Fragen wurden mittels verschiedener antero- und retrograder viraler Tracingtechniken im Mausmodell sowie mit Hilfe von konfokaler- und Lichtmikroskopie die Auswirkungen von spinalen Läsionen im Zeitverlauf dargestellt. Darüber hinaus konnte im Rahmen dieser Arbeit eine Injektionsmethode von Viren in den *Nucleus cuneatus* der Maus etabliert werden, die es erlaubt, spinale Interneurone, die zu diesem Kerngebiet projizieren, retrograd darzustellen.

Zusammengefasst wurde untersucht, ob es auch im Bereich der sensiblen Bahnen des Rückenmarks Reorganisationsmechanismen gibt, die zur funktionellen Erholung nach Rückenmarksverletzungen beitragen und somit Ansätze für künftige Therapien bieten.

2 Material

2.1 Verwendete Materialien und Geräte

| Materialien zur Anästhesie der Versuchstiere | |
|---|--|
| <i>Material</i> | <i>Hersteller</i> |
| Ketamin hydrochlorid 10% (Ketamin) | Bremer Pharma GmbH, Warburg |
| Proxylaz 20 mg (Hydroxylazin) | Bela-Pharm GmbH, Vechta |
| Forene (Isofluran) | AbbVie Deutschland GmbH, Ludwigshafen |
| Metacam 1,5 mg/ml Oral Suspension | Boehringer Ingelheim, Ingelheim am Rhein |
| Bepanthen Augen- und Nasensalbe (5% Dexpanthenol) | Bayer Vital GmbH, Leverkusen |
| Braunol (7,5% Povidin-Iod) | B.Braun Melsungen AG, Melsungen |
| Desinfektionsmittel (Ethanol 70%) | unbekannt |
| Isotone Kochsalzlösung(0,9% NaCl) | B.Braun Melsungen AG, Melsungen |

Tab. 2 Materialien zur Anästhesie der Versuchstiere

| Instrumente für mikrochirurgische Eingriffe | |
|--|--|
| <i>Material</i> | <i>Hersteller</i> |
| Subkutannadeln BD Microlance 3 30 Gauge (0,3 mm, gelb) zur subkutanen Injektion von NaCl-Lösung und Anästhesie | Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes (New Jersey), USA |
| BD Plastipak Hypodermic luer slip 1ml (Spritze zur Ketamine/Xylazine-Injektion) | Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes (New Jersey), USA |
| Spritze 3pc 5 ml Omnifix™ luer slip (Spritze zur Injektion von isotonischer Kochsalzlösung) | Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes (New Jersey), USA |
| Wella contura (Rasierer) | Wella, Darmstadt, Germany |
| Metallplatten | Individuell angefertigt |
| Horex magnet rund, 19mm | Hoffmann GmbH, München |
| Operationshäkchen | Individuell angefertigt |
| Gummibänder | Standard, aus der Drogerie |
| Lagerungskissen | Individuell angefertigt |
| Feather stainless steel blade (Skalpell) | PFM Medical AG, Cologne, Germany |
| Vannas-Tübingen Spring Scissors Straight | Fine Science Tools GmbH, Heidelberg |
| Vannas Spring Scissors Straight / 2,5 mm Cutting Edge | Fine Science Tools GmbH, Heidelberg |
| Dumont #7 Forceps - Biologie / Dumostar | Fine Science Tools GmbH, Heidelberg |
| Friedman-Pearson Rongeur Curved / 1 mm Cup | Fine Science Tools GmbH, Heidelberg |
| Dumont #3 Forceps - Standard / Dumoxel | Fine Science Tools GmbH, Heidelberg |
| Dumont Mirror Finish Forceps Inox Biologie / Inox | Fine Science Tools GmbH, Heidelberg |
| Dumont #5 Forceps - Biologie / Dumostar | Fine Science Tools GmbH, Heidelberg |
| Noyes Spring Scissors - Angled | Fine Science Tools GmbH, Heidelberg |
| Hypodermic Needles BD Microlance 3 27 Gauge (0,19 mm, grey, | Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes (New Jersey), USA |

| | |
|---|--|
| <i>Zur Inzision der Dura</i> | |
| Modifizierte Pasteur-Pipette 7ml | VWR International bvba, Leuven, Belgien |
| Ethicon Spongostan Special <i>Haemostatischer Gelatin-Schwamm</i> | Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt |
| S&T JFL-3P Suture Tying Forceps | Fine Science Tools GmbH, Heidelberg |
| Olsen-Hegar Needle Holder with Scissors 12 cm | Fine Science Tools GmbH, Heidelberg |
| Ethicon Ethilon monofil 6-0 size, 667H <i>Hautnaht</i> | Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt |
| Ethicon Vicryl 4-0 size, MIC101H <i>Innere Nähte</i> | Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt |
| Micro Pipettes intraMARK Blaubrand <i>Mikropipetten/Glaskapillaren</i> | Brand GmbH und Co. KG, Wertheim |
| Safety-Multifly®-Kanüle 21G mit langem Schlauch und montiertem Multi-Adapter | SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht |
| Syringe 3pc 20 ml Omnifix™ luer slip <i>Spritze zur Virusinjektion</i> | Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes (New Jersey), USA |
| Discofix®-3 Dreiwegehahn, 360° drehbar | B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Germa- ny |
| Autoclip Wound Clip Applier <i>Hautklammergerät</i> | Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes (New Jersey), USA |
| Autoclip Wound Clips, 9 mm <i>Hautklammern</i> | Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes (New Jersey), USA |
| Sugi <i>Tupfer, dreieckig</i> | Kettenbach GmbH & Co. KG, Eschenburg, Germany |

Tab. 3 Instrumente für mikrochirurgische Eingriffe

| Technische Geräte für die Operationen | |
|--|--|
| <i>Gerät</i> | <i>Hersteller</i> |
| T/Pump Warmhalteplatte | Gaymar Industries, Orchard Park (New York), USA |
| FST 250 Hot Bead Sterilizer Sterilisator für Instrumente | Fine Science Tools GmbH, Heidelberg |
| Vertical Micropipette Puller P-30 | Sutter Instrument Company, Novato (California), USA |
| KL 1500 LCD Kaltlichtquelle für stereo microscopy | Olympus UK Ltd KeyMed House, Southend-on-Sea, Great Britain |
| Stereo Mikroskop SZ51 | Olympus UK Ltd KeyMed House, Southend-on-Sea, Great Britain |
| Stereo Mikroskop M80 | Leica Microsystems GmbH, Wetzlar |
| HD Camera MC120 | Leica Microsystems GmbH, Wetzlar |
| Digital mouse stereotaxic instrument Stereotaktischer Rahmen, digital gesteuerter manueller Mikromanipulator | Stoelting Co., Wood Dale, IL, USA |

Tab. 4 Technische Geräte für die Operationen

| Materialien für die Perfusion | |
|---|---|
| <i>Material</i> | <i>Hersteller</i> |
| Heparin-Natrium-25000 I.E./5 ml | Ratiopharm GmbH, Ulm |
| PFA (Paraformaldehyd) | 8% PFA (Sigma-Aldrich) in dH ₂ O, erhitzt auf 55 °C und anschließend weitere 10 min, filtriert und 1:1 vermischt mit 0,2 M PB (Phosphatpuffer), pH auf 7,2- 7,8 korrigiert |
| Natriumdihydrogen phosphat monohydrat (NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O, M=137,99 g/mol) | Merck KGaA, Darmstadt |
| Dinatrium-Hydrogen-Phosphat-Dihydrat (Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O, M=177,99 g/mol) | Merck KGaA, Darmstadt |
| PBS 10x (Phosphat gepufferte Salzlösung), pH= 7,2/7,4 | 2,6 g NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O 14,4g Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O 87,5g NaCl (Merck) in 1l dH ₂ O gelöst |
| Sucrose | Sigma-Aldrich, St.Louis (Missouri), USA |
| NeuroTrace 435/455 | Invitrogen GmbH, Darmstadt |

Tab. 5 Materialien für die Perfusion

| Materialien zur Gewebeaufbereitung | |
|---|---|
| <i>Material</i> | <i>Hersteller</i> |
| Tissue Tek optimal cutting temperature (O.C.T.) | Sakura Finetek Europe B.V. , Alphen aan den Rijn, Niederlande |
| Objektträger 76x26 mm | Gerhard Menzel Glasbearbeitungswerk GmbH & Co. KG, Braunschweig |
| Deckgläser 25x50 mm | Gerhard Menzel Glasbearbeitungswerk GmbH & Co. KG, Braunschweig |
| Parafilm | Bemis Flexible Packaging, Neenah, WI, USA |
| Vectashield <i>Eindeckmedium</i> | Vector Laboratories, Inc., Burlingame (California), USA |
| Pipetten, Pipettenspitzen und Gefäße (2ml, 1,5 ml and 0,5 ml) | Eppendorf AG, Hamburg |
| Pasteurpipette 7ml | VWR International bvba, Leuven, Belgien |

| | |
|-----------------------------------|--|
| Zentrifugiergefäße (15 ml, 50 ml) | Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen |
| Erlenmeyerflaschen (1l; 0,5 l) | Schott, Elmsford (New York), USA |

Tab. 6 Materialien zur Gewebeaufarbeitung

| Technische Geräte zur Gewebeaufarbeitung | |
|--|--|
| <i>Gerät</i> | <i>Hersteller</i> |
| Ismatec IP high precision multichannel pump <i>Perfusionspumpe</i> | ISMATEC SA, Labortechnik - Analytik, Glattbrugg, Switzerland |
| Leica CM1850 Kryostat | Leica Microsystems GmbH, Wetzlar |
| Vortex-Genie 2 | Scientific Industries, Inc., Bohemia (New York), USA |
| KERN EW 150-3M <i>Wagen</i> | Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern |
| pH Messgerät inoLAB | WTW Wissenschaftlich-Technische Werks- tätten, Weilheim |
| Magnetrührer MR 3001K mit Heizplatte und Rührmagneten | Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach |

Tab. 7 Technische Geräte zur Gewebeaufarbeitung

| Mikroskopie | |
|--|--------------------------------|
| <i>Gerätebezeichnung</i> | <i>Hersteller</i> |
| Olympus IX71 inverted fluorescence micro- scope | Olympus GmbH, Hamburg |
| FV1000 confocal system montiert auf BX61 microscope Objektive: 10x/0.4 (Wasserimmersion) 20x/0.85 und 60x/1.42 (Ölimmersion) | Olympus GmbH, Hamburg, Germany |

Tab. 8 Mikroskopie

2.2 Versuchstiere

Alle Experimente wurden in Wildtyp C57/Bl 6 und in GlyT2-Mäusen auf einem C57/Bl6 Hintergrund durchgeführt. Bei den Tieren handelte es sich um erwachsene Tiere im Alter von ca. 6 bis maximal 20 Wochen und einem Gewicht von 20 bis 30 Gramm. Der Anteil der weiblichen und männlichen Tiere wurde gleichmäßig über experimentelle Gruppen und Kontrollen verteilt. Bei GlyT2-Mäusen ist eine Subpopulation von Neuronen, die den inhibitorischen Transmitter GlyT2 enthalten, fluoreszierend mit GFP markiert (Zeilhofer *et al.*, 2005). Diese wurden für die Charakterisierung der viral markierten Interneurone genutzt.

Die Versuchstiere wurden unter standardisierten Bedingungen in der Tierhaltung unseres Labors gehalten. Maximal 5 Mäuse wurden dabei in Eurostandard Typ II Käfigen mit den Dimensionen 365x207x140mm (Tecniplast, Hohenpreißenberg, Deutschland), in einem IVC-Regal-System gehalten.

Ernährung („Maus“ von Ssniff, Soest, Deutschland) und Wasser wurden autoklaviert und *ad libitum* zur Verfügung gestellt. Es wurde ein 12 h hell/ 12 h dunkel Zyklus eingestellt, um eine Tag/Nacht Simulation herzustellen. Sämtliche Arbeitsabläufe und Versuche wurden von der Regierung von Oberbayern bewilligt und gemäß den gesetzlichen Richtlinien durchgeführt.

2.3 Viren

Zur Injektion ins Spinalganglion (DRG) wurden mit YFP (*yellow fluorescent protein*, gelb fluoreszierendes Protein) gekoppelte Adenoviren verwendet. Die Viren wurden von den technischen Assistenten in unserem Labor produziert. Eine genaue Auflistung der verwendeten Viren ist aus Tab. 9 zu entnehmen.

Zur Injektion in den *Nucleus cuneatus* und dem retrograden Markieren von spinalen Interneuronen wurde ein Rabies Virus verwendet, der uns von der Arbeitsgruppe Conzelmann zur Verfügung gestellt wurde. Es handelte sich hierbei um einen Virus mit einem CVS-Promotor ohne das Protein G. Wie bereits in der Einleitung beschrieben, dient dieses Protein zur Aufnahme des Virus in der Präsynapse am Axon, sodass das Virus nur mit einer Koinjektion mit dem

fehlenden Protein G in die Neurone aufgenommen werden kann (Wickersham *et al.*, 2007a, Wickersham *et al.*, 2007b, Deshpande, 2012).

Für unsere Versuche haben wir ausschließlich Rabies Viren mit einem CVS-Promotor und einem mCherry-Fluorophor verwendet. Die genauen Konzentrationen und Applikationsmengen können aus der Tab. 10 entnommen werden. Zur Koinjektion mit dem Rabies Virus wurden AAV-Viren genutzt, welche ebenfalls durch technische Assistenten in unserem Labor hergestellt wurden. Hierbei wurden 2 verschiedene Typen verwendet: CAG-CVS G, ein Virus, der lediglich das Protein G enthält und nicht farblich markiert ist, sowie CAG G-Protein T2A CFP. Dieser Virus ist durch den Promotor T2A mittels CFP, einem im blauen Farbbereich emittierenden Fluorophor verbunden. Mittels dieser Darstellung wurde die Verteilung des Virus im Hirnstamm nachgewiesen.

| Verwendete Viren | | |
|----------------------------|-------------|------------------|
| Virus | Virustyp | Produktionsdatum |
| SAD CVS Δ G mCherry | Rabiesvirus | 16.08.2010 |
| AAV CAG eYFP | Adenovirus | 16.02.2012 |
| AAV CAG eYFP | Adenovirus | 16.04.2013 |
| AAV CAG CVS G | Adenovirus | 05.04.2012 |
| AAV CAG CVS G | Adenovirus | 10.04.2013 |
| AAV CAG-G-T2A-CFP | Adenovirus | 02/2014 |

Tab. 9 Verwendete Viren

| Verwendete Virussuspensionen | | | | | | | |
|------------------------------|-----------------|---------------|-------------------------------------|-----------------------|------------------------------|-----------------------|----------------|
| Batch | Injektionsmenge | Injektionsort | Virus 1 | Konzentration Virus 1 | Virus 2 | Konzentration Virus 2 | Monostral blue |
| NC 01 | 0,5 µl | CN | Rabies SAD CVS Δ G mCherry | 1:10 | AAV CAG CVS G | 1:10 | 1:X |
| NC 02 | 0,2 µl | CN | Rabies SAD CVS Δ G mCherry | 1:2 | CAG G- Protein T2A CFP | 1:2 | keiner |
| DRG | 0,5 µl | DRG | AAV eYFP | 1:10 | - | - | 1:X |

Tab. 10 Verwendete Virussuspensionen

3 Methoden

3.1 Operative Eingriffe

3.1.1 Injektionsvorbereitung

Alle Injektionen in den *Nucleus cuneatus* und das Spinalganglion wurden auf die gleiche Art und Weise vorbereitet:

Am Tag der Operation wurde ein Ziehgerät (Vertical Micropipette Puller P-30) verwendet, um Injektionskanülen herzustellen. Die Mikropipetten wurden anschließend unter dem Stereomikroskop kontrolliert und gegebenenfalls mit einer Mikroschere gestutzt. Für Injektionen in den *Nucleus cuneatus* wurde eine sehr dünne Spitze hergestellt, um eine möglichst präzise Injektion unter dem geringsten Druck durchzuführen. Im Gegensatz hierzu wurde für die Injektion ins DRG eine etwas dickere Kanüle verwendet, da hier zunächst die harte Hirnhaut (*Dura*) perforiert werden muss.



Abb. 3.1 Injektionskanüle aus Glas für Virussuspension

Anschließend wurde die Injektionskanüle mit der Virussuspension (und ggf. Monostral blue-Farbstoff), wie aus der Tab. 10 zu entnehmen ist, gefüllt. Die Glaskanüle wurde hierfür mit einer modifizierten „Butterfly“-Kanüle verbunden, welche an einen 3-Wege-Hahn angeschlossen wurde. Für das Füllen der Kanülen wurde Sog mittels einer 20ml Spritze angelegt, welche an den

3-Wege-Hahn angeschlossen war. Anschließend wurde letzterer geschlossen, sodass ein Unterdruck im System entstand. Unter diesem konnte die Pipette mit konstantem Sog gefüllt werden. Um die Spitze der Kapillare nicht zu beschädigen, wurde diese an einem Turm befestigt und unter visueller Kontrolle unter dem Stereomikroskop in die Virussuspension getaucht.

Die fertigen Kanülen wurden anschließend auf Eis für maximal 12h vor einer Injektion aufbewahrt.

3.1.2 OP-Vorbereitung, Anästhesie und postoperative Überwachung

Alle Tiere wurden präoperativ mit Ketamin-Xylazin (Ketamin 8 μg pro g Körpergewicht, Xylazin 13 μg pro g Körpergewicht), welches intraperitoneal injiziert wurde, anästhesiert. Darüber hinaus erhielten die Mäuse oral 5 μl Metacam als Analgesie. Die Narkosetiefe konnte anhand des Umdrehreflexes, Lidreflexes sowie des Zwischenzehenreflexes überprüft. Nach Erreichen der ausreichenden Narkosetiefe wurde das Fell um das Operationsfeld, im Bereich des oberen Rückens für die C2 Läsion und die Injektion in das Spinalganglion (DRG) C6, sowie des ventralen Halsbereichs für alle Injektionen in den *Nucleus cuneatus* rasiert und die Haut desinfiziert. Die Tiere wurden im Anschluss für die Operation gelagert und die Augen gegen Austrocknen mit Nasen/Augensalbe geschützt.

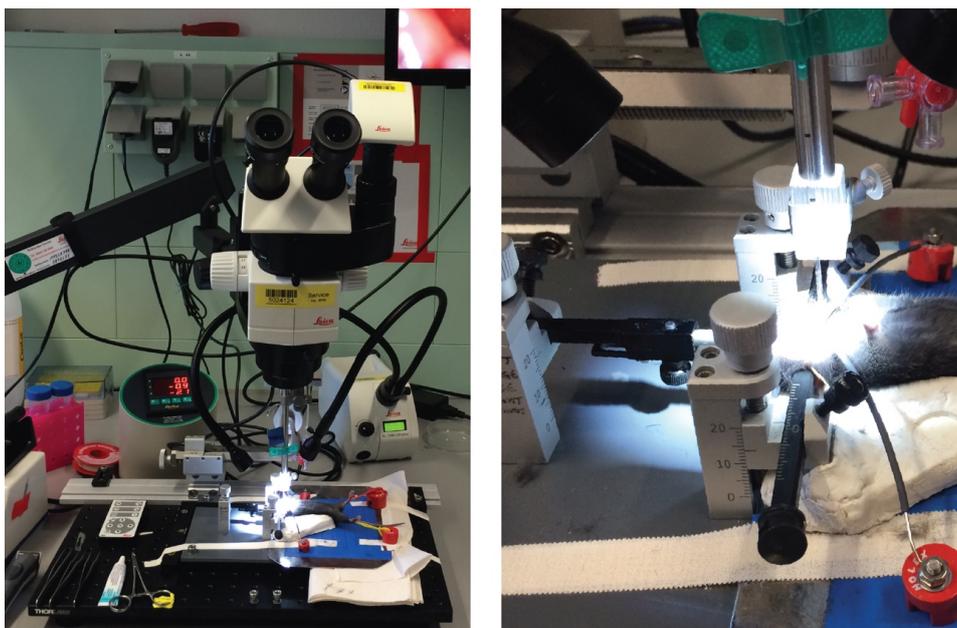


Abb. 3.2 OP Setup für C2-Läsion, sowie Injektion in DRG und NC

OP-Mikroskop mit Kaltlichtquelle (links), Mikromanipulator, Lagerungsschale. Maus in Lagerungsschale in Rückenlage im stereotaktischen Rahmen (rechts)

Während des Eingriffes wurden die Vitalzeichen und Reflexe regelmäßig klinisch überwacht. Bei Zeichen einer nicht ausreichenden Anästhesie und intraoperativen Aufwachens wurde die OP sofort unterbrochen und die Anästhesie mittels Nachspritzen von ca. 1/3 der ursprünglichen Narkosemenge vertieft.

Postoperativ erhielten die Mäuse regelhaft 1000 µl 0,9% NaCl subkutan. Anschließend wurden die Tiere in einer gewärmten Box gelagert, bis sie wieder vollständig erwachten. Nach einer postoperativen Überwachung von mind. 12h wurden die Tiere in die Tierhaltung transferiert. Zur Analgesie und erhielt jedes Tier eine weitere Dosis Metacam peroral direkt nach dem Eingriff, sowie am 1. postoperativen Tag.

3.1.3 Läsion der Hinterbahnstränge auf Höhe C2

Die allgemeine Vorbereitung der OP erfolgte wie oben beschrieben. Für das Setzen einer einseitigen Läsion des *Tractus cuneatus* auf Höhe C2 wurden die Mäuse zunächst in Bauchlage auf einer Metallplatte gelagert. Um eine stabile Positionierung zu erreichen, wurden die Extremitäten mittels Gummibänder und Magneten fixiert. Um eine adäquate Anteversion der Halswirbelsäule zu induzieren, wurde der Thorax durch ein Kissen gestützt. Somit weiteten sich die interlaminären Zwischenräume.

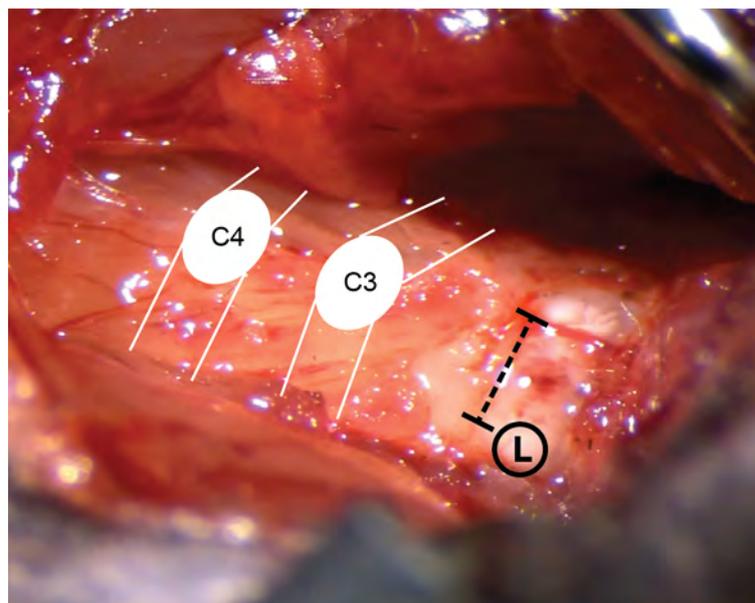


Abb. 3.3 OP-Situs bei Hinterstrangbahnläsion auf Höhe C2
Zustand nach der Läsion (L)

Nach sterilem Abwaschen des OP-Bereichs mit Cutasept und der Positionierung des Stereomikroskops erfolgte ein ca. 10 mm langer medianer Hautschnitt ausgehend von dem kranialen Ende der Halswirbelsäule. Das subkutane Fettgewebe wurde mobilisiert und die Muskeln kraniokaudal in Faserrichtung stumpf gespalten, um die knöchernen Strukturen freizulegen. Individuelle, auf Magneten befestigte Häkchen wurden eingebracht, um den Operationssitus optimal darzustellen. Nach Aufsuchen der Wirbelbögen und Dornfortsätze wurde anhand des *Vertebra prominens* (prominenter Wirbel, C7) und dem kraniozervikalen Übergang die richtige Höhe (C2) abgezählt. Anschließend wurde eine Hemilaminektomie auf Höhe C2 durchgeführt, indem die rechte Hälfte des Wirbelbogens mit dem Dornfortsatz mittels einer abgewinkelten Mikroschere abgetrennt wurde. Es erfolgte die Inzision der Dura sowie das Präparieren dieser oberhalb der geplanten Läsionslokalisation. Mittels Mikroschere konnte die Läsion im *Tractus cuneatus* gezielt mit etwa 1mm tiefe und 1-2mm lateraler Ausdehnung unilateral von der Mittellinie durchgeführt werden. Abschließend wurden die Muskulatur sowie die Haut readaptiert und mittels Vicryl 4-0 respektive Monofil 6-0 vernäht.

3.1.4 Injektion in das Spinalganglion

Die Injektion in das Spinalganglion erfolgte nach einer, in unserer Arbeitsgruppe etablierten Methode (vgl. Bareyre *et al.* (2011)). In Anlehnung an die Operation zur unilateralen Läsion der Hinterstrangbahnen wurden die Tiere vorbereitet und gelagert. Zunächst wurde die Haut etwa 10mm auf Höhe des *Vertebra prominens* inzidiert und individuelle Häkchen zur optimalen Darstellung des OP-Situs eingesetzt. Nach Präparation der Segmente C6 und C7 erfolgte eine Hemilaminektomie des Wirbelbogens C6 bis weit lateral mit Hilfe der gebogenen Mikroschere. Verbleibende laterale knöcherne und Bindegewebsanteile wurden so weit entfernt, bis das Spinalganglion C6 frei lag. Häufig auftretende und am ehesten von der posterioren *Arteria spinalis* ausgehende Blutungen konnten durch Spongostan und durch die Verwendung von Sugis (Wattetupfern) gestillt werden, bis sich das Spinalganglion (DRG) darstellen ließ. Anschließend wurde die Dura mittels Metallkanüle inzidiert. Nach Einlegen der mit dem Virus gefüllten Glaskanüle in den Halter und Verbinden mit einem Schlauchsystem über einen 3-Wege-Hahn, erfolgte unter optischer Kontrolle

das Einführen der Glaspipette in das Spinalganglion mit einer Tiefe von ca. 300 μm . Durch das Applizieren von Druck über den 3-Wege-Hahn wurde die Virussuspension unter optischer Kontrolle durch das Blaufärben des DRGs sowie dem Abnehmen des Füllstandes in der Glaskanüle über 10 Minuten kontinuierlich injiziert. Nach der Injektion verblieb die Kanüle für weitere 2 Minuten im Spinalganglion. Anschließend erfolgte die langsame Retraktion. Zum Schluss wurden die Muskulatur und Haut entsprechend der oben beschriebenen Prozedur verschlossen.

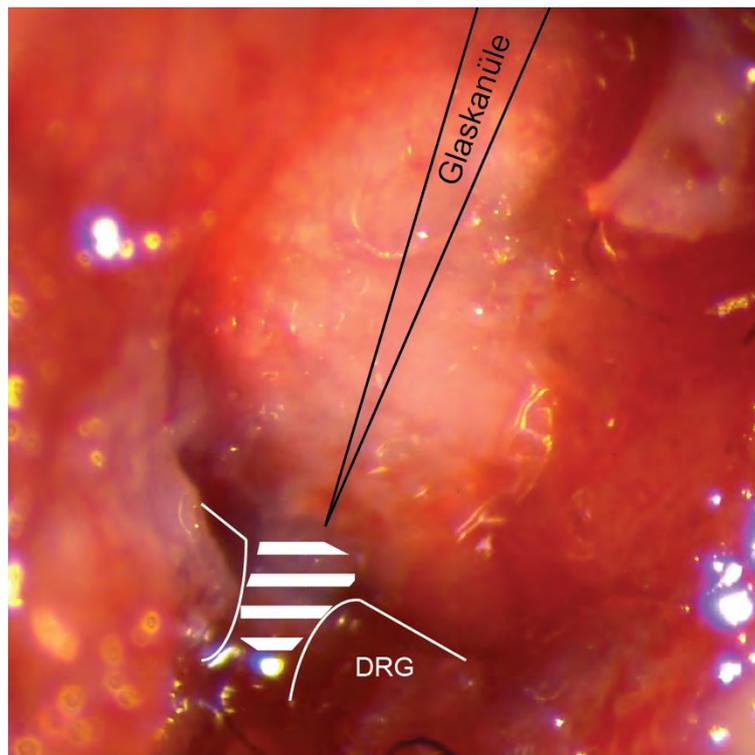


Abb. 3.4 OP-Situs bei Injektion in das Spinalganglion C6
Zustand nach Hemilaminektomie; Injektion in freiliegendes Spinalganglion (DRG)

3.1.5 Injektionen in den *Nucleus cuneatus*

Die Injektion von Virus-Suspensionen in den *Nucleus cuneatus* erfordert auf Grund der komplexen Lage des *Nucleus cuneatus* im Hirnstamm und seiner geringen Dimensionen eine hohe Präzision. Im Folgenden werden unterschiedliche, in dieser Arbeit entwickelte Methoden zur Injektion des Farbstoffes oder viralen *Tracers* in den *Nucleus cuneatus* beschrieben.

Injektion mit dorsalem Zugang zum Nucleus cuneatus

Entsprechend den vorangegangenen Operationen erfolgte zunächst die Vorbereitung und Lagerung der Versuchstiere, bevor die Haut auf Höhe des kraniozervikalen Übergangs ca. 10mm median eingeschnitten wurde. Nach Abpräparation der Nackenmuskulatur konnte der knöcherne kraniozervikale Übergang dargestellt werden. Das *Foramen magnum* (großes Hinterhauptloch) wurde mittels Stanze nach kaudal erweitert und die Dura mittels Kanülenspitze oberhalb des kaudalen Cerebellums inzidiert.

Die anschließende Mobilisierung des Kleinhirns von kranial nach kaudal ermöglichte die Injektion von 0,3µl blau gefärbter Suspension 0,9 µm lateral der Mittellinie unter visueller Kontrolle und über einen Zeitraum von 10 min. Nach der Injektion wurde das Tier sofort euthanasiert und perfundiert.

Ventraler Zugang zur Injektion in den Nucleus cuneatus ohne stereotaktische Navigation

Entsprechend den vorangegangenen Operationen erfolgten zunächst die Anästhesie und Vorbereitung der Versuchstiere. Im Gegensatz zu den vorher beschriebenen Lagerungen erfolgte nun die Lagerung der Mäuse in Rückenlage mit Fixierung der Extremitäten mittels Gummibänder, um einen ventralen Zugang zum *Nucleus cuneatus* zu ermöglichen. Für eine korrekte Kopfposition wurde die Halswirbelsäule auf einer individuell angefertigten Kopfschale immobilisiert. Bei somit leicht überstrecktem Kopf erfolgten die Rasur und Hautdesinfektion im Bereich des Halses. Die Haut wurde etwa 10-15mm entlang der Medianlinie und auf Höhe der Speicheldrüsen inzidiert. Es folgte eine paramedian stumpfe Präparation in die Tiefe. Zur Sichtoptimierung erfolgte der Einsatz von Häckchen, welche insbesondere die vorsichtig zur kontralateralen Seite mobilisierte Trachea fixierten. Hierbei wurde die Atmung des Versuchstiers klinisch

überwacht. Die weitere Präparation erfolgte medial der großen Halsgefäße und lateral der Trachea bis zum Erreichen der Wirbelsäule. Nach Aufsuchen des atlantooccipitalen Übergangs konnte ein Dreieck zwischen der ventrokaudalen Begrenzung des Schädelknochens und dem ventrokranialen Rand des 1. Wirbelkörpers dargestellt werden (vgl. Abb. 3.5). Das vorliegende Bindegewebe innerhalb des Fensters wurde vorsichtig abpräpariert, um im folgenden Schritt die Dura freilegen zu können. Mittels der Kanüle wurde die Dura vorsichtig inziert und im unteren Drittel des Fensters entfernt. Dabei austretender Liquor konnte mittels Tupfer aufgenommen werden.

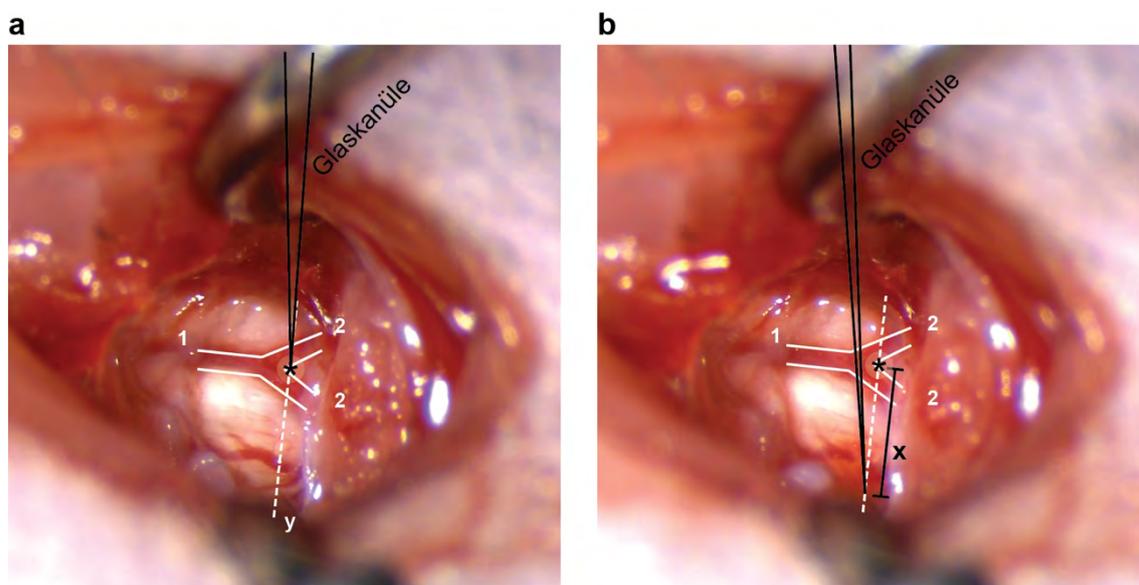


Abb. 3.5 OP-Situs bei stereotaktischer Injektion in den Nucleus cuneatus

(a) zeigt die Einstellung der Referenzposition für den Mikromanipulator. Die Infiltration in den Injektion in den *Nucleus cuneatus* ist in (b) dargestellt.

* = Referenzpunkt, 1 = A. basilaris, 2 = Aa. vertebrales, y = kraniokaudale Injektionsebene, x = lateraler Injektionsabstand

Im latero-kaudalen Winkel auf der ipsilateralen Seite erfolgte nun die Injektion der Virussuspension in ca. 2 mm Tiefe. Die Kontrolle über die Injektionstiefe lieferte ein Mikromanipulator. Die Injektion von ca. 0,2 µl Suspension wurde nach dem gleichen Prinzip wie bei der DRG-Injektion langsam über 10 min durchgeführt. Anschließend verblieb die Kanüle für etwa 2 min und wurde schließlich unter Sicht langsam zurückgezogen. Nach vorsichtigem Entfernen der Haken sowie unter Kontrolle der Atmung erfolgte die Hautnaht mit 4-0 Vicryl. Die postoperative Überwachung erfolgte nach oben genanntem Protokoll.

Ventraler Zugang zur Injektion in den Nucleus cuneatus mit stereotaktischer Navigation

Um eine höhere Präzision bei der Injektion von viralen Suspensionen in den *Nucleus cuneatus* zu ermöglichen, erfolgte in einem weiteren Versuch die Evaluation einer ventralen stereotaktischen Injektion. Anhand von Atlanten konnten die entsprechenden Koordinaten des *Nucleus cuneatus* ausgemessen werden (Paxinos und Franklin, 2001). Wie aus Abb. 3.5 ersichtlich, ergaben diese: x: 0,8 mm, y: 0,1mm, z: 2,1 mm. Als Referenzpunkt der x-Achse (kranio-kaudal) diente die Vereinigung der *Arteriae vertebrales* zur *Arteria basilaris*.

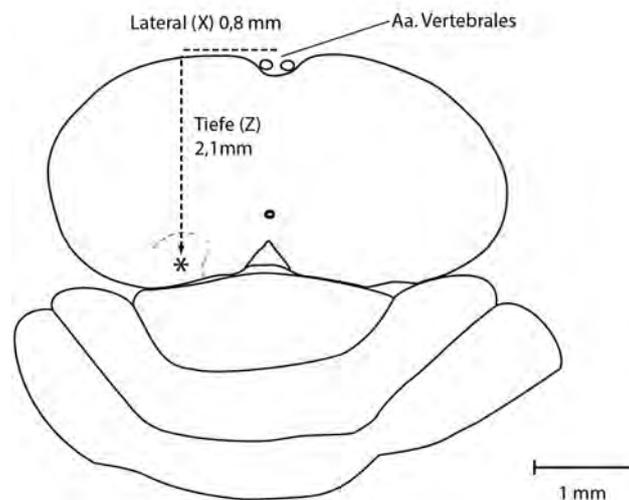


Abb. 3.6 Zielkoordinaten der stereotaktischen Injektion in den *Nucleus cuneatus*

Nucleus cuneatus mit (*) gekennzeichnet,
Bild modifiziert aus Paxinos und Franklin (2001).

Anästhesie und OP-Vorbereitungen wurden wie bei den vorherigen Eingriffen durchgeführt. In Rückenlage wurden die Versuchstiere in einem stereotaktischen Rahmen fixiert, wobei der Kopf mittels Fixierung an den äußeren Gehörgängen und den Schneidezähnen stabilisiert wurde. Der Zugangsweg glich der Methode der nicht stereotaktisch unterstützten ventralen Injektion. Im Unterschied zu diesen wurde die Dura hier oberhalb der Vereinigung der *Arteriae vertebrales* zur *Arteria basilaris* eröffnet. Nach Einbringen des stereotaktischen Turms wurde die Injektionskanüle zunächst über die Vereinigung der Arterien positioniert. Es erfolgte die Einstellung der x- und y-Koordinaten sowie die Injektion gemäß der ausgemessenen Tiefe ab der Hirnstammoberfläche. Der Injektionsmodus sowie die Injektionsmenge entsprachen dabei den vorangegangenen

Versuchen. Abschließend erfolgte der Rückzug der Nadel und das Verschließen des Situs, sowie die postoperative Überwachung.

3.2 Aufarbeitung des Gewebes

3.2.1 Perfusion

Zur Auswertung des Rückenmarks und Hirngewebes der Versuchstiere wurden diese nach Abschluss des Versuchs tief mittels einer Isofloran-Gasnarkose anästhesiert. Nach Kontrolle der Narkosetiefe wurden die Mäuse transkardial mit 10ml einer 1:20 verdünnten Heparinlösung perfundiert. Anschließend wurde das Gewebe mit 30ml einer 4% Paraformaldehyd (PFA) in 0.1 M Phosphatpuffer-Lösung konserviert. Nach makroskopischer Dissektion des Hirns sowie des Rückenmarks, inklusive der DRG wurden diese weiter für mindestens 24h in 4% PFA-Lösung bei 4°C konserviert. Zur Anfertigung der Kryoschnitte erfolgte abschließend die Mikrodissektion unter dem Stereomikroskop.

3.2.2 Einbettung und Anfertigung der Kryoschnitte

Die Präparate wurden in 30% Sukrose-Lösung überführt und mindestens für 48h bei 4°C gelagert. Nach dem Absinken des Gewebes in der Zuckerlösung wurden die Präparate in Tissue-Tek optimal cutting temperature (OCT) gebettet und bei -20° C eingefroren. Die Präparate wurden dann mit dem Kryostaten geschnitten. Hirngewebe wurde hierbei koronar in 50 µm starke Schnitte verarbeitet und das zervikale Rückenmark längs oder koronar in 50 µm starke Schnitte verarbeitet. Die DRGs wurden regelhaft mit dem zervikalen Rückenmark verarbeitet. Bei Abrissen im Rahmen der Mikrodissektion wurden diese einzeln separat geschnitten. Das Gewebe wurde konsekutiv auf gläsernen Objektträgern gesammelt.

3.2.3 Färbung und Einbettung der Schnitte

Bei allen Proben wurden im Anschluss die Neurone gefärbt. Hierfür wurden die Schnitte zunächst mind. 2h bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend mind. 3x für 10 min in PBS bei Raumtemperatur gespült. Das Färben erfolgte

im Anschluss mittels NeuroTrace 435 in einer Verdünnung von 1:500 über Nacht bei 4° C. Am nächsten Tag wurden die Schnitte wiederum 3x mit PBS gespült und anschließend mit Vectashield gebettet.

3.3 Mikroskopie

Zur Auswertung der Injektionsstelle in den *Nucleus cuneatus* wurden verschiedene Mikroskope verwendet:

Die Kontrolle der Injektionsstelle anhand der Verteilung des Farbstoffes Monstral Blue wurde unter einem Invertiertem Mikroskop (Olympus IX71) durchgeführt. Es wurde regelhaft eine 4-fach Vergrößerung gewählt. Eine Auswertung erfolgte konsekutiv an jedem zweiten der vorliegenden axialen Schnitte.

Für die Analyse der Injektion des Rabies-Virus-Konstrukts in den *Nucleus cuneatus* wurde die konfokale Mikroskopie verwendet. Hier erfolgte das Scannen der axialen Schnitte mit 10facher und 20facher Vergrößerung mit einem FV1000 konfokalen System. Die verwendeten Farbstoffe mit den zugehörigen Spektren können aus Tab. 11 entnommen werden.

| Übersicht der verwendeten Fluorophore | | |
|---------------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|
| <i>Fluorophor</i> | <i>Wellenlänge Exzitation</i> | <i>Wellenlänge Emission</i> |
| mCherry | 587 nm | 610 nm |
| eGFP | 488 nm | 507 nm |
| eYFP | 513 nm | 527 nm |
| eCFP | 434 nm | 477 nm |
| NeuroTrace 435/455 | 435 nm | 455 nm |

Tab. 11 Übersicht der verwendeten Fluorophore

Quelle: Lambert (2018)

Die Auswertung der Rückenmark-Schnitte erfolgte ebenfalls mit Lichtmikroskopie und konfokaler Mikroskopie. Es wurden sowohl axiale als auch sagittale Schnitte ausgewertet.

3.4 Quantifizierung der Daten

Die Quantifizierung von Zellen und axonalen Kollateralen erfolgte durch manuelles Zählen. Hierfür wurden alle Bilddateien mittels Fiji ImageJ, sowie Adobe Photoshop und Adobe Illustrator verarbeitet.

3.4.1 Quantifizierung der Lokalisation der Boutons der Axonkollateralen

Es wurden insgesamt 5 Tiere ohne Läsionen mit 5 Tieren 21 Tage nach Hinterstrangbahn-Läsion und 5 Tieren 84 Tage nach Hinterstrangbahn-Läsionen miteinander verglichen.

Für die Analyse der Lokalisation der auswachsenden Boutons wurden axiale Schnitte von Tieren mit AAV-Virus-Injektionen in das DRG verwendet. Es wurde von dem konsekutiv in 50µm Stärke geschnittenen Rückenmark jeder 5. Schnitt zwischen der Läsion auf Höhe C4 und dem injizierten DRG auf Höhe C6 ausgewertet. Insgesamt wurden pro Tier etwa 15 Schnitte verwertet. Unter 40x Vergrößerung wurde unter dem invertierten Mikroskop (Olympus IX71) die Anzahl der Boutons gezählt. Hierbei wurde zwischen ventral (Lamina 7-9 nach Rexed), intermediär (Lamina 6 und 7 nach Rexed) und dorsal (Laminae 1-5 nach Rexed) unterschieden (Watson *et al.*, 2009). Anschließend wurde der Mittelwert der intraindividuellen Verteilungen bestimmt.

3.4.2 Lokalisation der Injektion mittels Monostral Blue

Für die Auswertung der Lokalisation der Injektion wurde jeweils der Schnitt mit der maximalen Ausbreitung des Farbstoffes ausgewertet. Das markierte Zentrum der Farbstoffansammlung und die Distanz zur Mittellinie sowie zum dorsalen Rand des Schnitts wurden erfasst und mit der Lokalisation des *Nucleus cuneatus* im Atlas kontrolliert (Paxinos und Franklin, 2001).

3.4.3 Quantifizierung der Expression des Rabies Virus im *Nucleus cuneatus*

Die Quantifizierung der Virusexpression im *Nucleus cuneatus* erfolgte ähnlich wie die Bestimmung des Ortes der Farbstoffinjektion. Jedoch erfolgte hier die Bestimmung des Injektionsortes unter Fluoreszenz. Der Farbstoff (mCherry)

des Rabies-Virus wurde detektiert und anschließend das Zentrum der Injektion, wie bereits in 3.4.2 beschrieben, kontrolliert.

3.4.4 Quantifizierung der Hinterstrangbahn-Läsion

Die Qualität der Hinterstrangbahn-Läsion wurde routinemäßig in allen Tieren überprüft. Sowohl in den sagittalen als auch in den axialen Schnitten erfolgte die Ausmessung der Läsionen in dorsoventraler und medio-lateraler Dimension und der Vergleich dieser mit dem Atlas (Watson *et al.*, 2009).

3.4.5 Quantifizierung der Anzahl und Lokalisation der spinalen NC-Neurone

Sowohl sagittale Schnitte mit einer Stärke von 50µm zwischen C3 und C6, als auch axiale Schnitte mit einer Stärke von 50µm wurden unter dem invertierten Mikroskop Olympus IX71 mit x40/0,65 Objektiv) abfotografiert und anschließend digital weiterverarbeitet. Während bei den axialen Schnitten jeder Schnitt mit einem markierten Interneuron ausgewertet wurde, erfolgte die Auswertung bei den sagittalen, longitudinalen Schnitten lediglich bei jedem 2. Schnitt. Anschließend wurden die Abbildungen zunächst in Fiji Image J in Kontrast und Helligkeit angepasst und in Adobe Illustrator wieder zu gesamten Schnitten fusioniert.

Die Interneurone wurden als dorsal, intermediär oder ventral in Abhängigkeit ihrer Lokalisation im Rückenmark (in Laminae I bis IV: dorsal, V bis VII: Intermediär und VIII bis IX: ventral) (Watson *et al.*, 2009) kategorisiert. Die Anzahl der Interneurone wurde zum einen auf die Anzahl der Interneurone kranial der Läsion normalisiert und zum anderen als Prozentsatz aller Interneurone wiedergegeben.

3.4.6 Quantifizierung der axonalen Kontakte auf die spinalen Interneurone mit direktem Kontakt zum *Nucleus cuneatus*

Für die Quantifizierung der Kontakte der DRG-Axone an den spinalen Interneuronen wurden axiale Schnitte mit einer Stärke von 50µm zwischen C3 und C6, zunächst unter dem invertierten Mikroskop Olympus IX71 mit x40/0,65 Objektiv) gesichtet. Bei allen Schnitten, bei denen sich ein Kontakt zwischen fluoreszierenden Interneuronen (mCherry) und DRG-Axonon (eYFP) zeigte, wurde anschließend die Anzahl der Kontakte digital an Bildern analysiert. Die Bilder wurden über die konfokale Mikroskopie am „FV1000 confocal system“ und dem 20x/0.85 Objektiv aufgenommen. Anschließend wurde die Anzahl der lokoregionären Kontakte als Prozentsatz aller abgebildeten Kontakte wiedergegeben und zu den verschiedenen Zeitpunkten miteinander verglichen.

3.5 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm Standardfehler angegeben, sofern nicht anders deklariert. Die statistische Signifikanz wurde mittels GraphPad Prism 8 (GraphPad Software) berechnet. Für den Vergleich mehrerer Gruppen diente die zweifaktorielle Varianzanalyse (two way analysis of variance (ANOVA)), an die sich eine *post-hoc* Analyse mittels Dunnett-Test anschloss. Bei Einzelvergleichen und in Annahme einer Normalverteilung erfolgte die statistische Berechnung mittels ungepaartem t-Test. Aufgrund der kleinen Stichprobengröße konnte jedoch keine explizite Testung hinsichtlich der Normalverteilung durchgeführt werden.

Die Signifikanzniveaus werden folgendermaßen angegeben:

* = $p < 0.05$ ** = $p < 0.01$ *** = $p < 0.001$.

4 Ergebnisse

Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen als Teil des folgenden Manuskriptes zur Publikation eingereicht werden:

Recovery of proprioceptive function and remodeling of sensory connections following incomplete spinal cord injury.

Charlène Granier^{1,2,3,#}, **Julian Schwarting**^{1,2,#}, Evangelia Fourli^{1,2,#}, Fabian Laage-Gaupp^{1,2}, Marta Wesolowski^{1,2}, Anja Schmalz^{1,2}, Anne Jacobi^{1,2}, Alexander Ghanem⁴, Karl Klaus Conzelmann⁴ und Florence M Bareyre^{1,2,5}

Ko-Erstautorenschaft

1 Institut für klinische Neuroimmunologie, LMU München

2 Biomedical Center Munich (BMC), Medizinische Fakultät, LMU München

3 Graduate School of Systemic Neurosciences, LMU München

5 Munich Cluster of Systems Neurology (SyNergy), 81377 München

4.1 Ergebnisse aus vorangegangenen Experimenten

In bereits vorangegangenen Experimenten konnte die Auswirkung von unilateralen Läsionen der Hinterstrangbahnen (Höhe C2) auf die von distal der Läsion aufsteigenden Axone gezeigt werden. Die Analyse erfolgte hierbei zunächst in longitudinalen (sagittalen) Schnitten. Je ein akuter und ein chronischer Zeitpunkt wurde nach einer ipsilateralen Hinterstrangbahn-Läsion mit einer Kontrollgruppe verglichen. Im Vergleich zur Kontrolle zeigte sich nach 21 Tagen eine hochsignifikante ($p < 0,001$) Zunahme der Anzahl der Kollateralen. Diese reduzierte sich jedoch zu einem chronischen Zeitpunkt (84 Tage) wieder, war jedoch weiterhin signifikant erhöht im Vergleich zur Kontrollgruppe (vgl. Abb. 4.1).

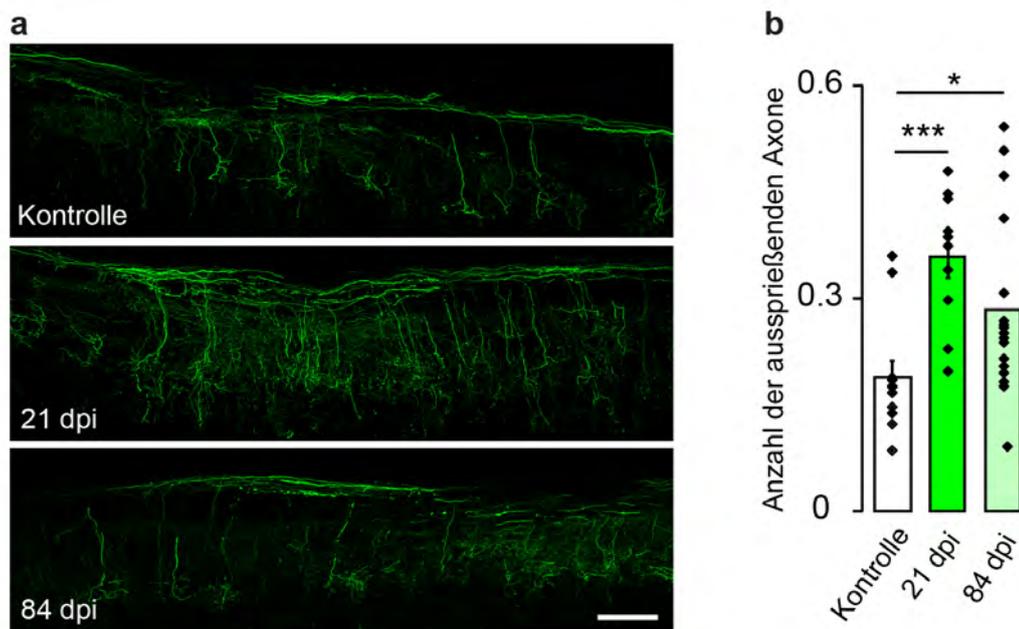


Abb. 4.1 Kollateralenbildung von DRG-Axonen nach Verletzung des Rückenmarks

Auswirkung einer ipsilateralen Hinterstrangbahnläsion nach 21 bzw. 84 Tagen auf aufsteigende DRG-Axone im zervikalen Rückenmark, modifiziert aus Granier, Schwarting, Fourli et al. (Manuskript in Vorbereitung).

(a) Konfokale Bilder von zervikalen DRG-Kollateralen, welche in die graue Substanz aussprossen. Darstellung durch Injektion eines AAV-Virus in das Spinalganglion C6 nach 21 und 84 Tagen im Vergleich mit der Kontrolle. Maßstabsbalken = 200µm. (b) Quantifizierung der Anzahl aussprossender Axone in Kontrolltieren im Vergleich zu Tieren 21 bzw. 84 Tage nach ipsilateraler Hinterstrangläsion (***: $p=0,0005$; *: $p=0,0183$ $n=10-17$ Tiere pro Gruppe)

Auf diesen Ergebnissen basierend erfolgte eine weitere Charakterisierung des Aussprießens sowie der Lokalisation der entstandenen Synapsen zwischen Kollateralen und den anderen Zellen des Rückenmarks. Die Auswertung erfolgte anhand von axialen Schnitten.

4.2 Lokalisation der aussprießenden Axone

Abb. 4.2a zeigt zunächst die Unterteilung der Regionen des Rückenmarks in eine dorsale, eine intermediäre und in eine ventrale Region zur Vereinfachung der Auswertung. Mit Hilfe von konfokaler Mikroskopie wird auch in den axialen Schnitten ein Unterschied zwischen verletzten und unverletzten Tieren deutlich (vgl. Abb. 4.2b). Nach der Quantifizierung unter dem Fluoreszenzmikroskop (vgl. Abb. 4.2c) zeigt sich, dass in den Kontrolltieren ein Großteil der kollateralen Synapsen in den dorsalen und intermediären Schichten ausgebildet wurde (6 % ventral im Vergleich zu 43% dorsal, 51% intermediär). Dieses Verhältnis ändert sich nach einer Läsion der Hinterstrangbahnen nicht ($p > 0,05$). Dennoch verschiebt sich die Verteilung der Boutons zwischen intermediären und dorsalen Schichten im Vergleich zur Kontrollgruppe. Bereits zu einem akuten Zeitpunkt, nach 21 Tagen, ist der überwiegende Anteil der Synapsen dorsal gelegen (56% dorsal; 32% intermediär; 12% ventral), sodass sich das Verhältnis in der Analyse signifikant von der Kontrolle unterscheidet. Dieses Verhältnis bleibt auch beim chronischen Zeitpunkt erhalten, sodass davon ausgegangen werden kann, dass neue Synapsen vor allem in den dorsal gelegenen Teilen des Rückenmarks entstehen. Ein mit AAV-Virus injiziertes C6-Spinalganglion ist in Abb. 4.3 dargestellt.

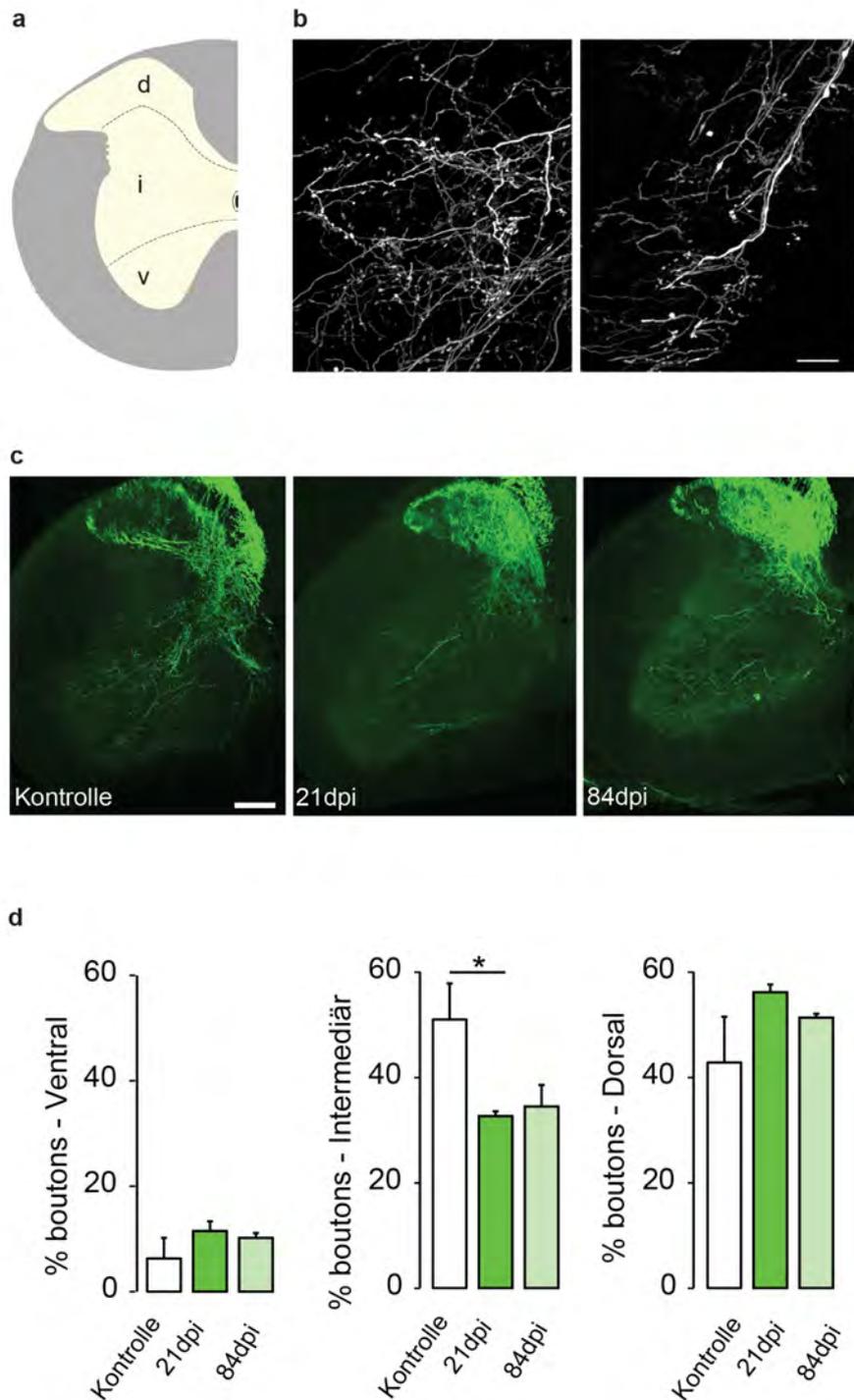


Abb. 4.2 Lokalisation der aussprossenden Axone nach C2-Läsion

Verteilung der Kontakte der vom DRG aufsteigenden Axone nach Darstellung mittels AAV eYFP-Injektion in das Spinalganglion C6, modifiziert aus Granier, Schwarting, Fourli et al. (Manuskript in Vorbereitung).

(a) Einteilung der grauen Substanz in eine ventrale, intermediäre und dorsale Region. (b) 60x Vergrößerung, axialer Schnitt C4 nach eYFP Injektion in Spinalganglion, 21 Tage nach Läsion. (c) 10x Vergrößerung, axialer Schnitt C4 nach eYFP in Spinalganglion zu angegebenen Zeitpunkten. Quantifizierung der Lokalisation der Kontakte (Boutons) mit spinalen Interneuronen, normalisiert zur Gesamtmenge der Kontakte im axialen Schnitt, n= 3-5 pro Gruppe (d) Maßstabsbalken: 50µm in (b); 200µm in (c)

Die Daten wurden zunächst mittels Kruskal-Wallis-Test auf Normalverteilung und anschließend mittels Dunn-Test auf Signifikanz getestet.

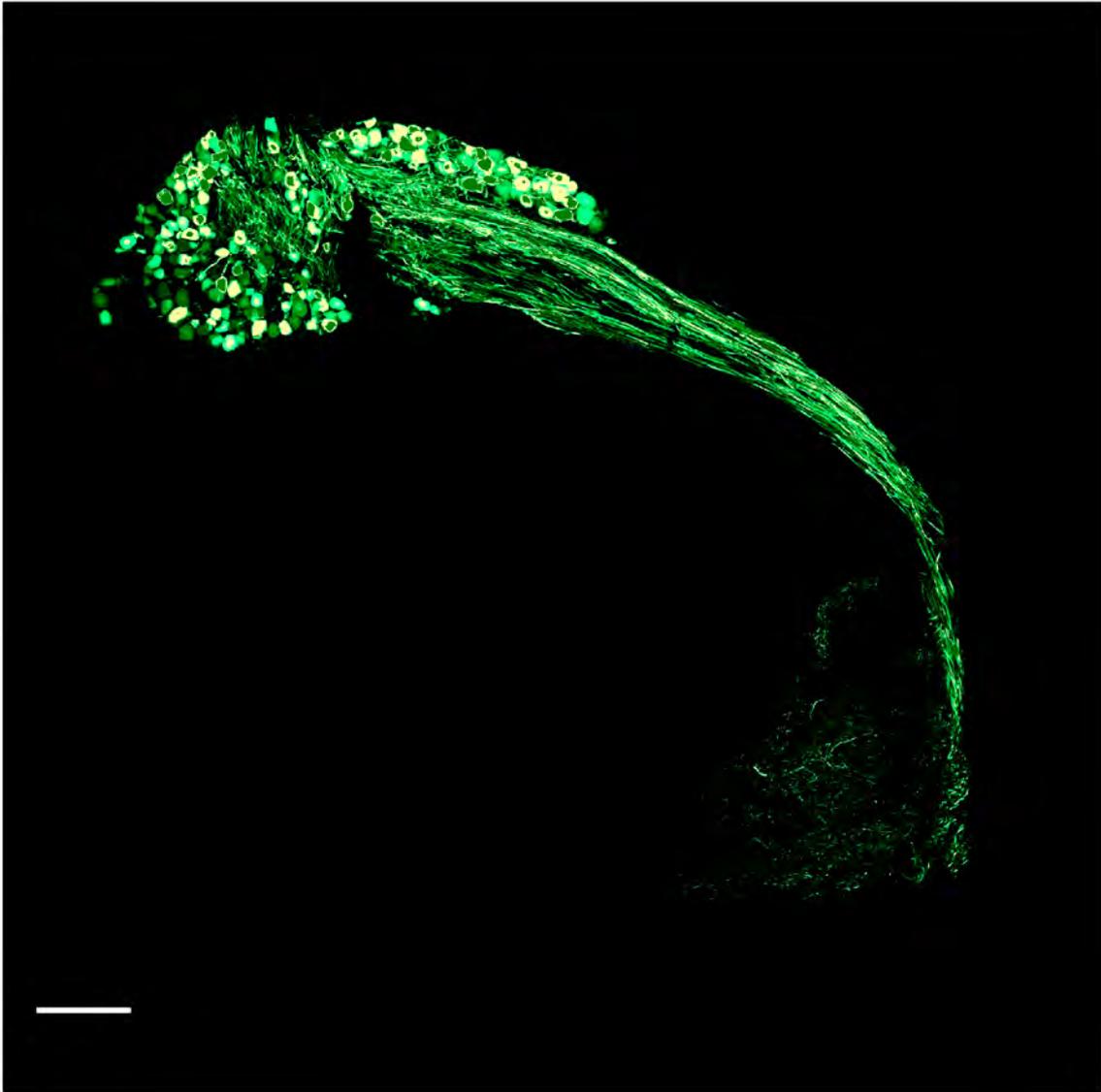


Abb. 4.3 Illustration eines Spinalganglions nach Injektion von AAV eYFP

Vergrößerung 10-fach, konfokales Mikroskop. Axialer Schnitt des mit eYFP markierten Spinalganglions C6. Maßstabsbalken: 10 μ m

4.3 Injektionen in den *Nucleus cuneatus*

Vor Beginn dieser Arbeit waren bereits erste Versuche der Injektion von Rabiesviren in den *Nucleus cuneatus* durchgeführt worden. Da die Markierung der Interneurone im zervikalen Rückenmark sehr unterschiedlich und unbeständig war, erfolgte im ersten Schritt die Evaluation der Injektionen in den *Nucleus cuneatus*.

Abbildung 4.4 zeigt hierbei 3 Beispiele von Injektionen, welche die Variabilität gut widerspiegeln. Injektionen, die zu weit rostral liegen, führen beispielsweise zu einer unspezifischen retrograden Darstellung verschiedener Neuronenpopulationen aufgrund der großen Anzahl von Projektionen in diese Region. Beispielsweise wurden in Abb. 4.4a auch Neuronen im Kleinhirn retrograd markiert.

Unter dem Lichtmikroskop wird zudem die große Variabilität des Injektionszielpunktes anhand der unterschiedlichen Farbstoffverteilung deutlich. In einzelnen Tieren wurde der Farbstoff präzise im *Nucleus cuneatus* platziert, während in anderen Tieren die Injektion dorsal im Kleinhirn erfolgte. Die Injektionen erfolgten mittels unterschiedlicher Techniken von dorsal oder ventral anhand von Atlanten. Quantitativ zeigt sich bei $n=4$ eine mittlere Distanz von $508,5\mu\text{m}$ zum Zielpunkt mit einem Standardfehler von $\pm 106,7\mu\text{m}$.

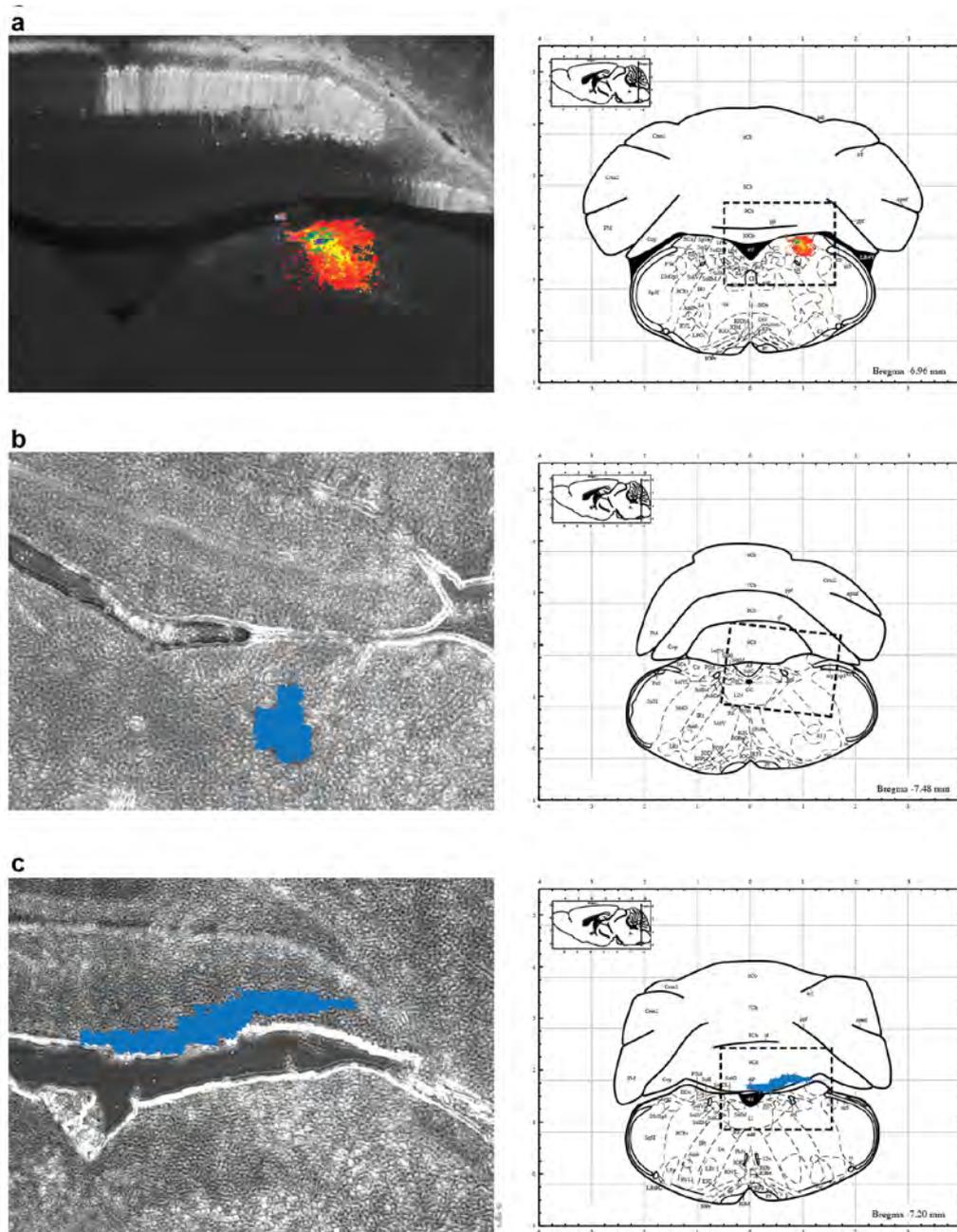


Abb. 4.4 Lokalisation der Injektionen in den NC vor dem Beginn der Arbeit

Injektionen und Gewebeverarbeitung durch Fabian Laage-Gaupp.

Abbildungen von koronaren Schnitten Lichtmikroskop und 20x Vergrößerung nach Injektion von Monostral Blue und einem Test-Rabies-Virus unbekannter Konzentration im Vergleich mit dem Atlas Paxinos und Franklin (2001)

Die Abbildungen (a-c) zeigen die fehlende Konsistenz der durchgeführten Injektionen. (a) zeigt beispielsweise eine Injektion von Rabiesvirus zu rostral auf Höhe des 4. Ventrikels. (b) zeigt eine präzise Injektion in den Nucleus cuneatus und (c) zeigt eine zu dorsal gelegene Injektion ins Kleinhirn

4.3.1 Treffsicherheit der Injektionen ohne stereotaktische Steuerung

Nach Auswertung des vorhandenen Gewebes wurde zunächst eine Injektion ohne stereotaktische Steuerung, lediglich mit visueller Kontrolle der Injektionskoordinaten und Messungen der Injektionstiefe präferiert.

Diese Methodik erlaubt zum einen die Präzisierung des Injektionsortes und zum anderen eine standardisierte Auswertung. Wie aus Abbildung 4.5 hervorgeht, wurde als Zielpunkt der Injektionen die breiteste Stelle des *Nucleus cuneatus* gewählt, welche etwa 7,7 mm kaudal von *Bregma* liegt. Als Zielpunkt der Injektion wurde lateral die Begrenzung des knöchernen Fensters gewählt, in rostro-kaudaler Dimension ein Punkt kurz kaudal der Vereinigung der *Arteriae vertebrales* zur *Arteria basilaris*. Zudem wurde eine Injektionstiefe von etwa 1,8-1,9 mm gewählt, um eine Aussaat des Virus in den Liquorraum zu vermeiden. Abb. 4.5 zeigt hierbei die Verteilung der Mittelpunkte der Injektionen in einer ersten Serie mit $n = 14$. Der Mittelpunkt der Injektion wurde hierbei optisch unter dem Lichtmikroskop anhand der Verteilung des Farbstoffs festgelegt und die Distanzen am Zentralkanal vermessen.

Die kraniokaudale Achse wurde in dieser Messung nicht berücksichtigt, es wurden jedoch sämtliche Injektionen ausgeschlossen, die rostral oder kaudal des *Nucleus cuneatus* lokalisiert sind. Die mittlere Distanz bei $n = 14$ ist hier 237,6 μm mit einer Standardabweichung von $\pm 36,92 \mu\text{m}$.

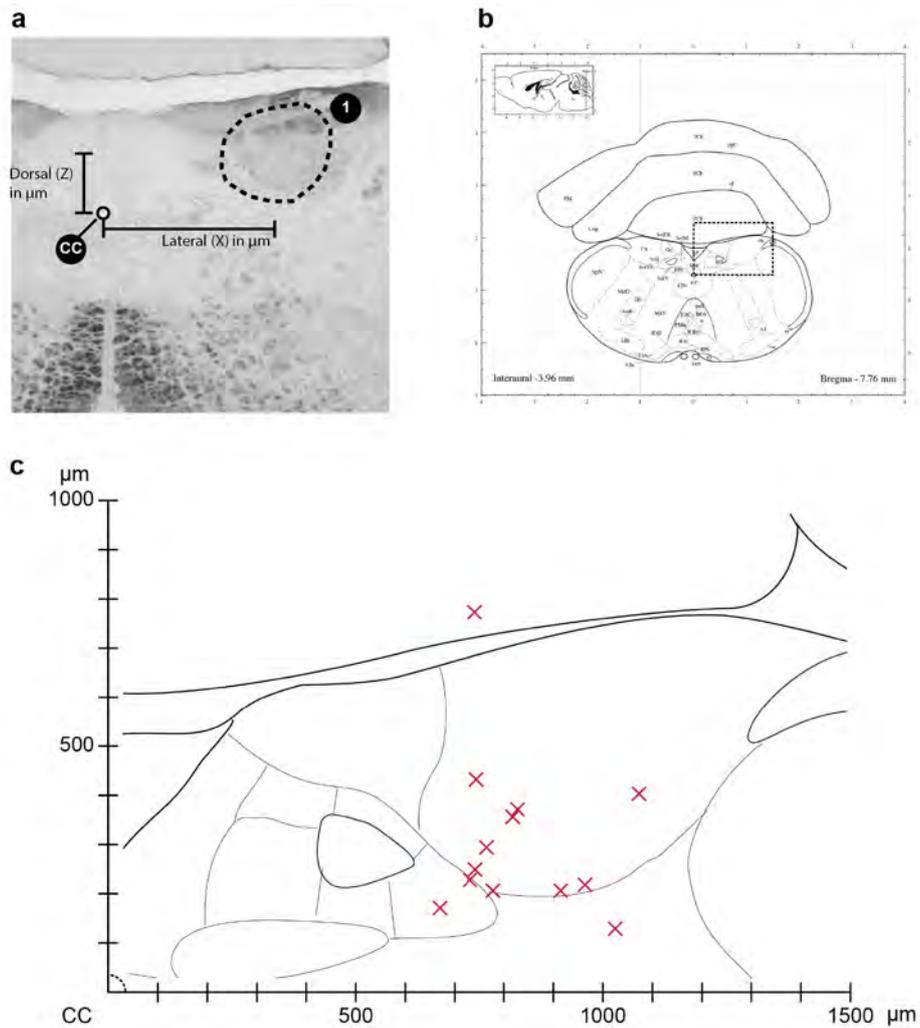


Abb. 4.5 **Auswertung der Präzision der Injektion ohne Stereotaxie**

(a) stellt die Methodik der Auswertung dar. Zur Bestimmung der Lokalisation der Injektion erfolgte die Bestimmung des Zentrums der Farbstoffverteilung (1) im Verhältnis zum Zentralkanal (CC) in axialen Schnitten des Hirnstamms. Anhand von kontinuierlichen $50\mu\text{m}$ Schnitten wurde der Schnitt mit der maximalen Farbstoffmenge ausgewählt. In (b) ist die Anatomie des Hirnstamms auf Höhe des *Nucleus cuneatus* (7,76mm kaudal von Bregma) dargestellt. (c) zeigt in einer vergrößerten Darstellung der Region in Rot jeweils das Zentrum der Injektion mittels blauen Farbstoffes in einem Tier.

Atlanten modifiziert aus Paxinos und Franklin (2001)

Ein Vergleich der Methoden hinsichtlich der Distanz des Injektionszentrums vom Zielpunkt ist in Abbildung 4.7 dargestellt. Es zeigt sich, dass die Distanz zum Zielpunkt signifikant durch die Verwendung von stereotaktischen Injektionen im Vergleich zu den initialen Versuchen vor dieser Arbeit verbessert werden konnte ($p= 0,0285$). Darüber hinaus reduzierte sich auch die Standardabweichung, was ebenfalls für die Präzisierung der Injektion spricht.

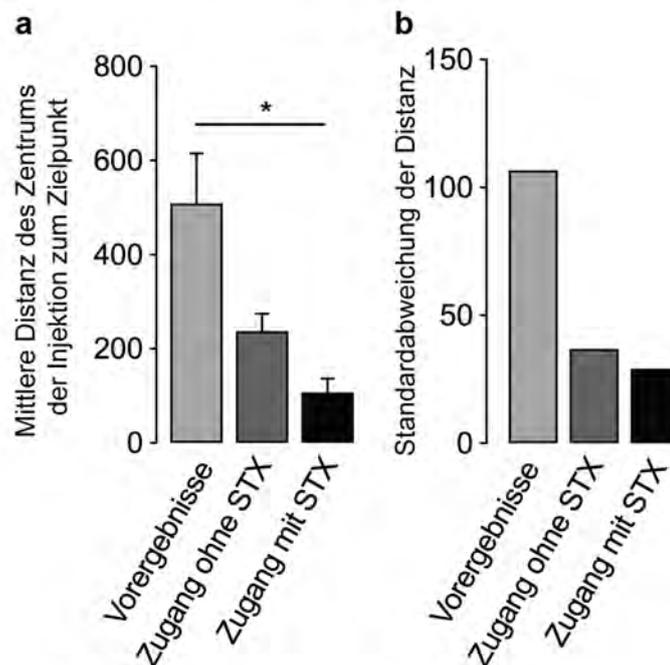


Abb. 4.7 Präzision verwendeter Injektionsmethoden

Quantifizierung der Präzision einzelner Injektionsmethoden anhand von histologischen Schnitten (**a**) zeigt die mittlere Distanz des Zentrums der Injektion zum Zielort (Zentrum des *Nucleus cuneatus*) in μm mit $n= 4$ in Vorergebnissen, $n= 14$ in der Gruppe ohne stereotaktische Injektion, $n= 7$ in der Gruppe mit stereotaktischer Injektion und den jeweiligen Standardabweichungen. Die Signifikanz wurde mittels ungepaartem Welch-(t)-Test und bestimmt. (**b**) stellt die Standardabweichung der Vergleichsgruppen aus (**a**) separat dar, um die Verringerung als Hinweis für eine präzisere Injektion zu zeigen.

4.3.3 Stereotaktische Injektion retrograd darstellender Rabiesviren

Nach Präzisierung der Injektionsmethode wurden zunächst in Kontrolltieren Suspensionen von SAD CVS Δ G mCherry in Kombination mit AAV CAG-G-T2A-CFP in den *Nucleus cuneatus* der Maus injiziert. Wie in Abb. 4.8 dargestellt, wurden die Viren 10 Tage vor Perfusion der Maus exprimiert. Abb. 4.9 zeigt das Ergebnis der Injektion im Hirnstamm: Die gefärbten Neurone reichen weit über die Stelle der Injektion hinaus und sind über den Hirnstamm verteilt.

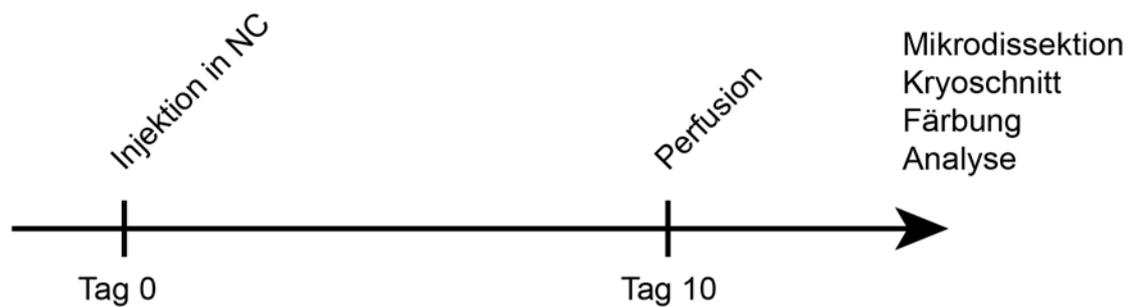


Abb. 4.8 Experimentalaufbau zur Injektion des Rabiesvirus in den *Nucleus cuneatus*
Injektion von SAD CVS Δ G mCherry und AAV CAG-G-in den *Nucleus cuneatus*

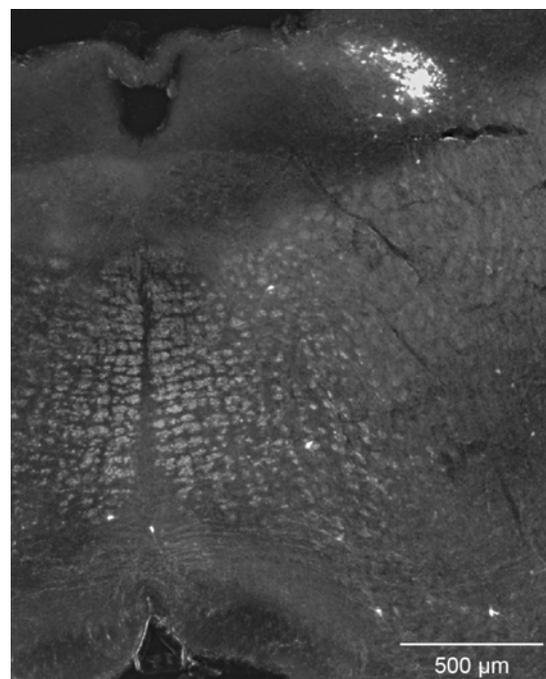


Abb. 4.9 Axialer Schnitt des *Nucleus cuneatus* nach Virusinjektion

Axialer Schnitt durch den Hirnstamm 10 Tage nach Injektion von SAD CVS Δ G mCherry + AAV CVS G.

Es stellt sich aufbauend auf den in Abb. 4.9 dargestellten Ergebnissen die Frage, ob das Rabiesvirus bei der stereotaktischen Injektion frei in das Gewebe diffundiert und somit unspezifisch viele weitere Neuronenpopulationen unspezifisch markiert, oder ob die dargestellten Neurone monosynaptisch mit dem *Nucleus cuneatus* in Verbindung stehen. Zur Beantwortung dieser Frage wurde eine Suspension von AAV CAG-G-T2A-CFP in den *Nucleus cuneatus* der Maus injiziert. Der Versuchsaufbau ist in Abb. 4.10 dargestellt.

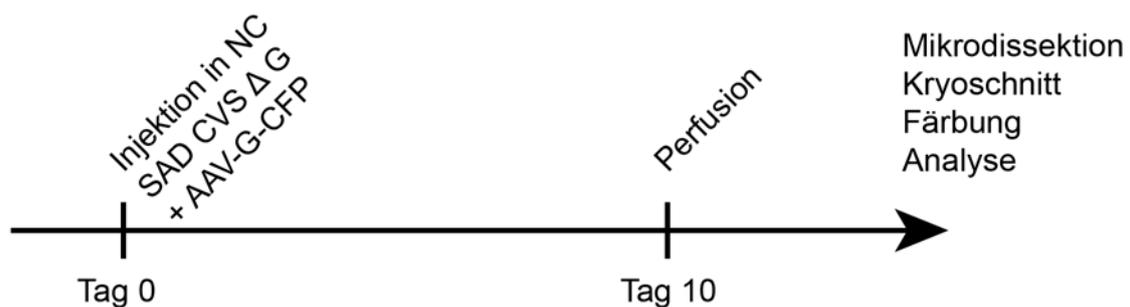


Abb. 4.10 Experimentalaufbau zur Kontrolle der Rabiesvirus-Injektion im Hirnstamm

Injektion von SAD CVS Δ G mCherry und AAV CAG-G-T2A-CFP in den *Nucleus cuneatus*

Für diesen Versuch wurde ein AAV-Virus hergestellt, bei dem im Plasmid die Sequenzen des für die Aufnahme des Virus benötigte Protein Gs mit Sequenzen eines CFP-Farbstoffes verbunden werden konnten. So konnten die Zellen, in die das Virus aufgenommen wurde, anhand ihres CFP-Signals identifiziert werden. Das Ergebnis ist in Abb. 4.11 dargestellt: Während auch in dieser Serie das mCherry-Signal über den Hirnstamm verteilt war, konnte gezeigt werden, dass das Adenovirus Protein G lediglich lokal an der Injektionsstelle des Virus in die Zellen aufgenommen wurde. Eine Diffusion über den ganzen Hirnstamm hinweg scheint somit unwahrscheinlich. Es kann davon ausgegangen werden, dass das Virus lediglich an der Injektionsstelle direkt in Neurone aufgenommen wird und die angefärbten Neurone des Hirnstamms monosynaptisch in Verbindung mit dem *Nucleus cuneatus* stehen.

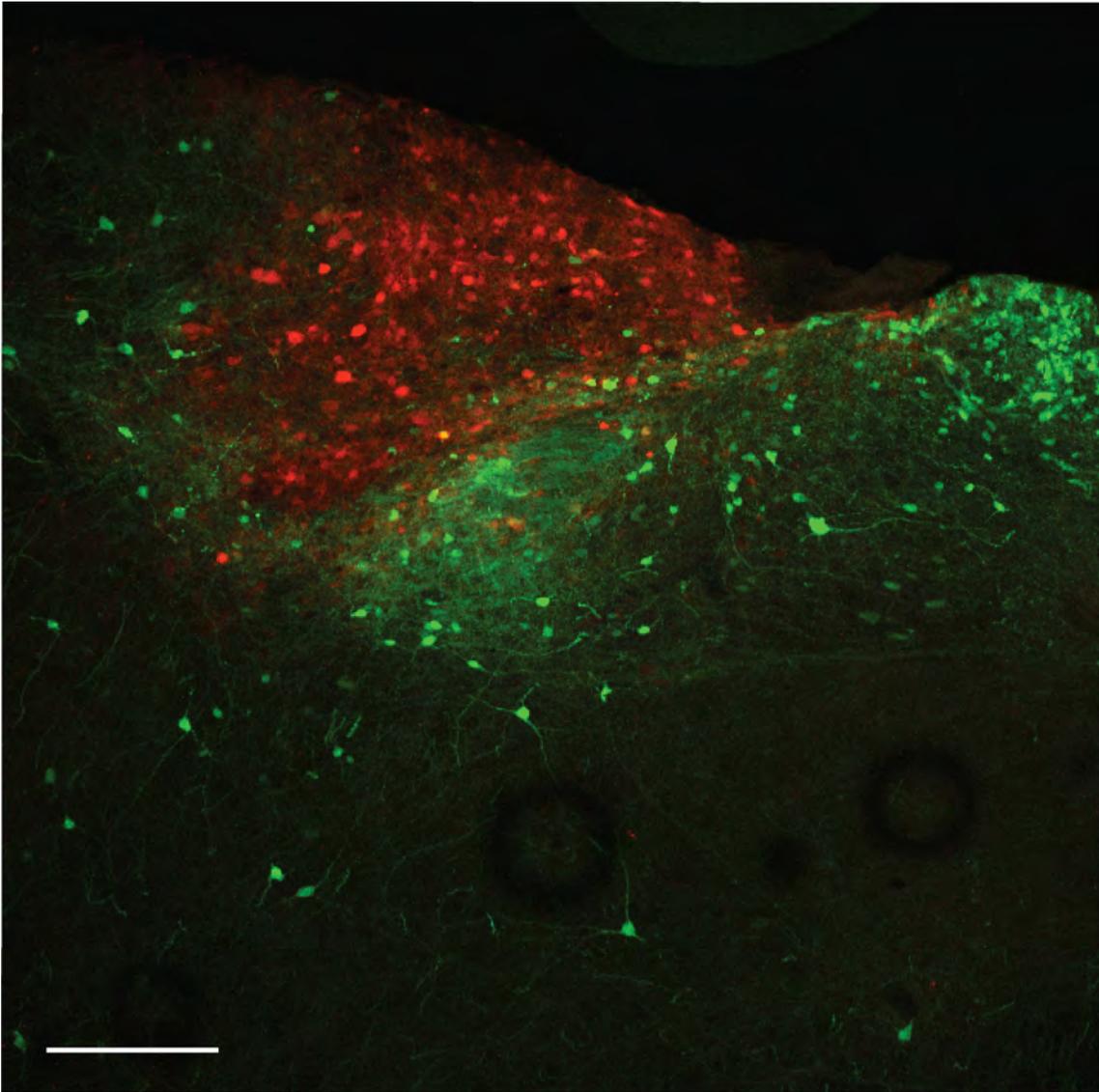


Abb. 4.11 Verteilung des Rabies-Virus und des AAV-Virus im Hirnstamm

Koinjektion von SAD CVS Δ G mCherry und AAV CAG-G-T2A-CFP in den *Nucleus cuneatus*. Bei Koinjektion der Viren bleibt das Protein G (CFP, rot) lokal, während sich das Rabies Virus (mCherry, grün) über den Hirnstamm ausbreitet. Repräsentativer axialer Schnitt durch den *Nucleus Cuneatus*. Vergrößerung 10x. Injektion von 0,1 μ l SAD CVS Δ G mCherry und 0,1 μ l AAV CAG-G-T2A-CFP. Maßstabsbalken 10 μ m

4.4 Verteilung der Interneurone im zervikalen Rückenmark

Nach Etablierung der Methode wurden zunächst im zervikalen Rückenmark die Interneurone mit Projektionen zum *Nucleus cuneatus* mit Hilfe des in Abb. 4.12 beschriebenen Versuchsaufbaus charakterisiert.

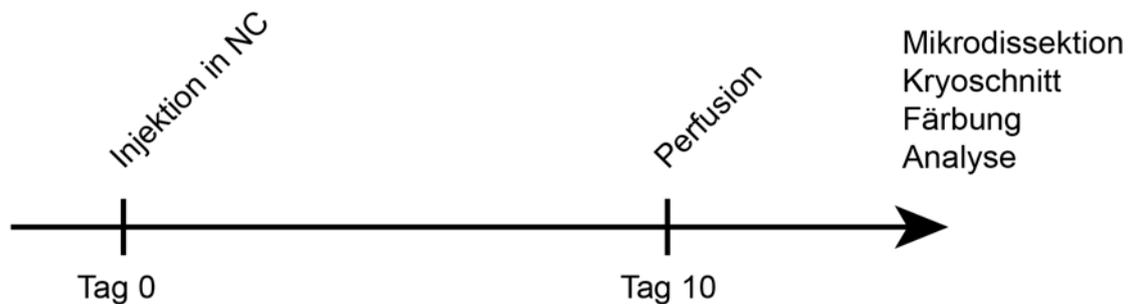


Abb. 4.12 Experimentalaufbau zur Analyse der Verteilung zervikaler NC-Neurone

Injektion von SAD CVS Δ G mCherry in den *Nucleus cuneatus* zur Quantifizierung der Verteilung der monosynaptisch verbundenen Interneurone im zervikalen Rückenmark

Die Ergebnisse werden in Abb. 4.14 abgebildet. Ein Überblick des zervikalen Rückenmarks nach Injektion eines retrograden Tracers in den *Nucleus cuneatus* zeigt, dass eine Injektion zu einer Anfärbung ipsilateralen Interneuronpopulationen im dorsalen Rückenmark führt. Die Anzahl der markierten Interneurone nimmt nach kaudal hin kontinuierlich ab. Auch kontralateral wurden vereinzelt Interneurone markiert. In Abb. 4.13 ist die Quantifizierung der Verteilung der Interneurone aufgeführt. Es zeigen sich keine signifikanten Veränderungen des Verteilungsmusters der dargestellten NC-Neurone entlang der kraniokaudalen Achse.

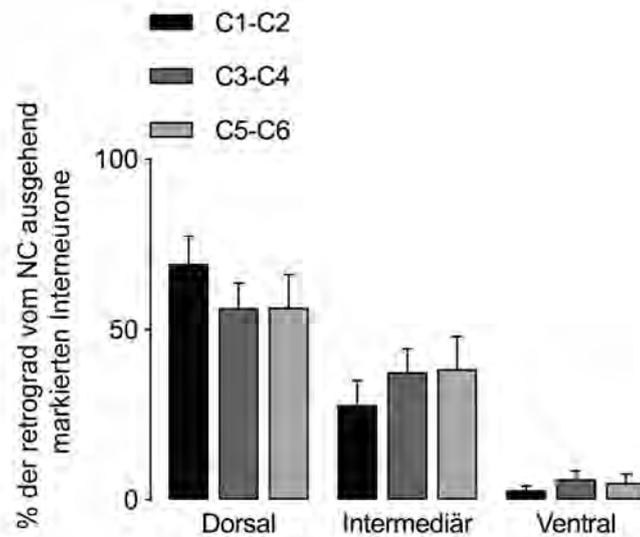


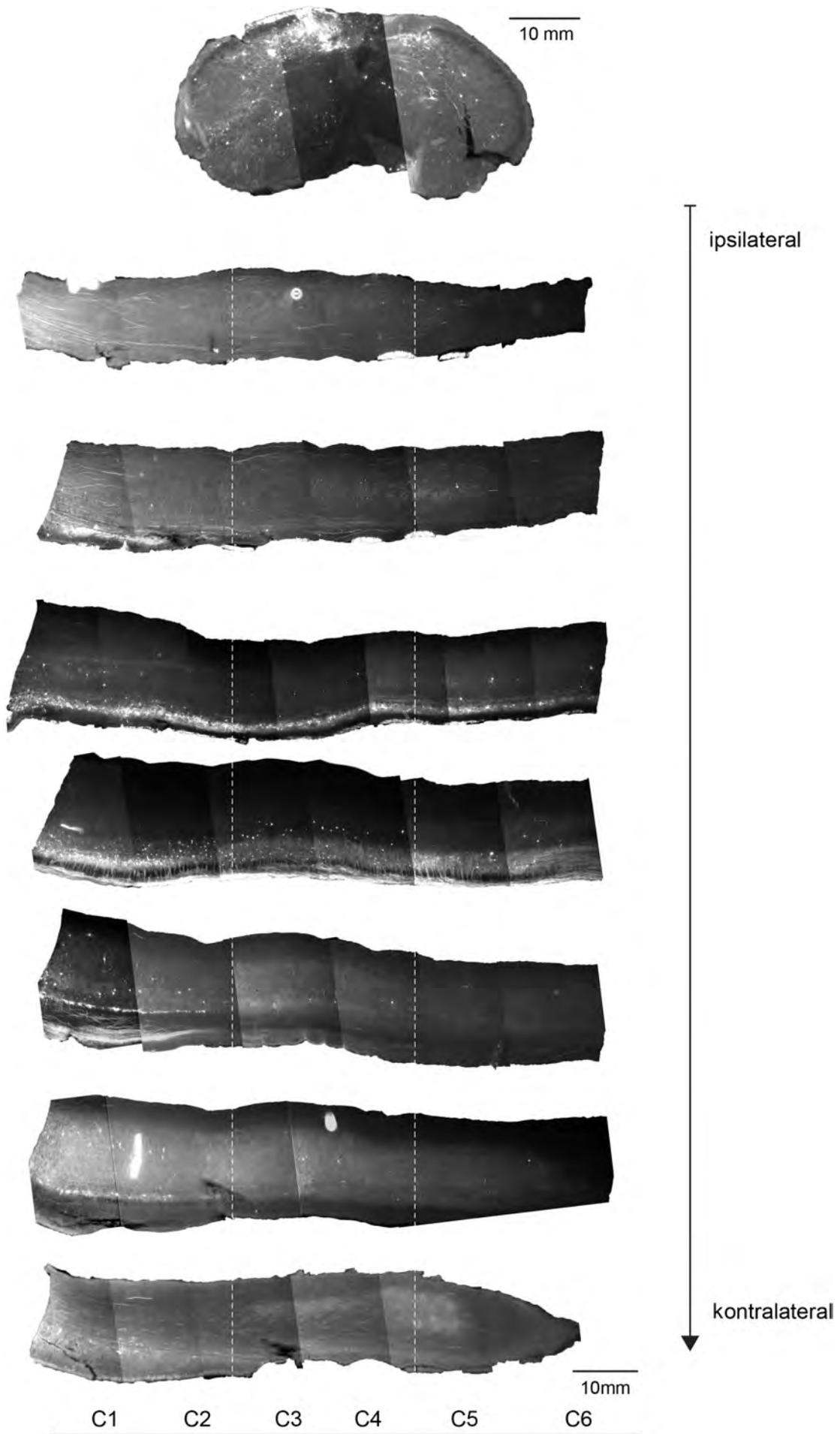
Abb. 4.13 Verteilung der Neurone mit NC-Projektionen im zervikalen Rückenmark

Analyse in Kontrolltieren entlang des zervikalen Rückenmarks nach Injektion von SAD CVS Δ G mCherry und AAV CVS G in den *Nucleus cuneatus*. Ausgewertet in longitudinalen Schnitten (vgl. Abb. 4.15) und unterteilt in die Segmente C1-C2, C3-C4, C5-C6. Jeweils normalisiert auf die Gesamtanzahl der Interneurone Auf Höhe des Segments. n= 6

Nächste Seite:

Abb. 4.14 Longitudinale Darstellung der NC-Neurone im zervikalen Rückenmark

Darstellung nach retrograder Markierung mittels Injektion des Rabiesvirus SAD CVS Δ G mCherry und AAV CVS G in den *Nucleus cuneatus* (oben). Sagittale Schnitte durch das Rückenmark mit einer 10x-Vergrößerung unter dem invertierten Mikroskop von ipsi- nach kontralateral.



Zur Analyse der Auswirkung einer Hinterstrangbahn-Läsion auf die Verteilung der Interneurone im zervikalen Rückenmark, die zum *Nucleus cuneatus* projizieren, wurden anschließend Tiere, die lediglich eine Injektion von SAD CVS Δ G mCherry in Verbindung mit AAV CAG CVS G in den *Nucleus cuneatus* erhielten, mit Tieren verglichen, bei denen 3 Wochen vor Ende des Experiments eine unilaterale Läsion der Hinterstrangbahn auf Höhe C2 durchgeführt wurde. Der Versuchsaufbau ist aus Abb. 4.15 ersichtlich.

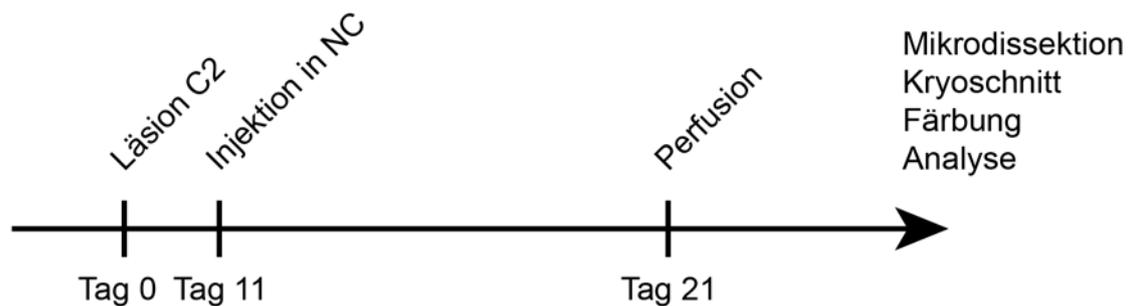


Abb. 4.15 Evaluation der Verteilung von NC-Neuronen nach Hinterstrangbahnläsion

Experimentalaufbau der Injektion von SAD CVS Δ G mCherry in den *Nucleus cuneatus* zur Quantifizierung der Verteilung der monosynaptisch verbundenen Interneurone im zervikalen Rückenmark in Verbindung mit einer ipsilateralen Hinterstrangbahnläsion auf Höhe C2

Abb. 4.16 stellt dabei vergleichend zu Abb. 4.14 longitudinale, sagittale Schnitte durch das zervikale Rückenmark eines Tieres mit einer Läsion auf Höhe C2 dar. Hierbei zeigt sich, dass die Läsion der ipsilateralen Hinterstrangbahn zunächst zu einer Reduktion der absoluten Anzahl von markierten Interneuronen führt. Eine Quantifizierung der standardisierten Daten ist in Abb. 4.17 dargestellt. Die Anzahl der markierten Interneurone wurde bei jedem Tier individuell auf die Zahl der markierten Neuronen kranial der Läsion normalisiert. Es wird deutlich, dass die absolute Anzahl der Interneurone ab Höhe der Läsion abfällt. Dennoch können auch kaudal der Läsion noch Interneurone dargestellt werden, was unter anderem auf weitere Projektionen außerhalb der Hinterstrangbahnen oder auf bereits neu geschaffene Umgehungswege hindeuten könnte.

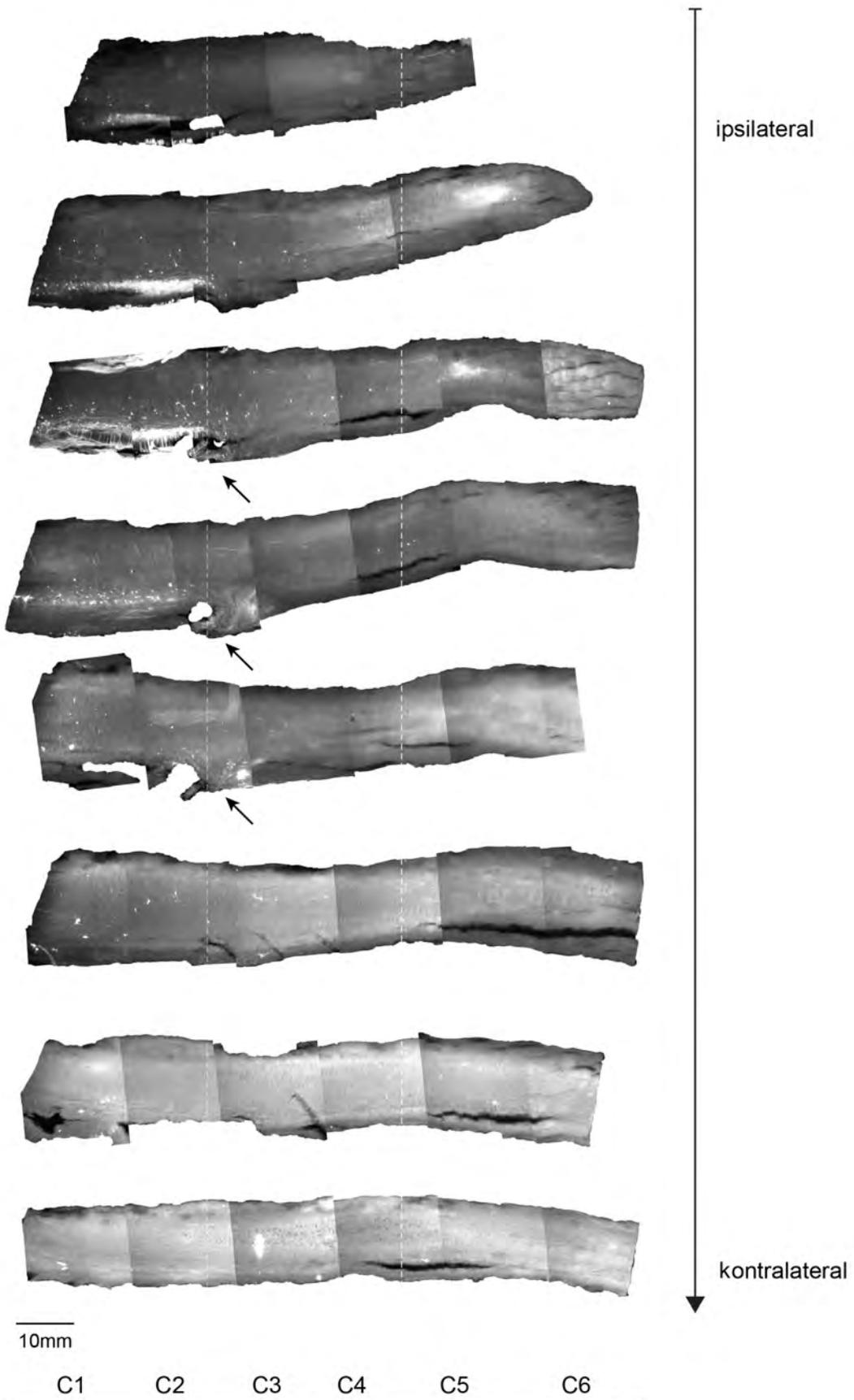
Vergleicht man nun die Lokalisationen der Interneurone der gesunden und der verletzten Tiere miteinander, so zeigen sich keine statistisch signifikanten Unterschiede (vgl. Abb. 4.17). Lediglich in der ventrodorsalen Dimension kommt es zu einer leichten Verschiebung der Verteilung, sodass in der Gruppe der ver-

letzten Tiere eine höhere Anzahl der Interneurone ventral und intermediär liegt, während in der Kontrollgruppe die meisten Neurone dorsal dargestellt werden. Diese Beobachtung ist jedoch statistisch nicht signifikant ($p > 0,05$). Insgesamt zeigte sich auch in diesen Experimenten, dass es mit sagittalen Schnitten alleine schwierig ist, die genaue Lokalisation von markierten Interneuronen darzustellen. Eine Auswertung axialer Schnitte kann hierbei das Ergebnis ergänzen.

Nächste Seite:

Abb. 4.16 Longitudinale Darstellung der zervikalen NC-Neurone 21 Tage nach Läsion

Verteilung der spinalen Interneurone 21 Tage nach ipsilateraler Hinterbahnstrangläsion auf Höhe C2 und retrograder Markierung mittels Injektion von SAD CVS Δ G mCherry und AAV CVS G in den *Nucleus cuneatus*. Sagittale Schnitte durch das Rückenmark mit einer 10x-Vergrößerung aufgenommen am invertierten Mikroskop von ipsi- nach kontralateral. Die Pfeile zeigen auf die Läsion.



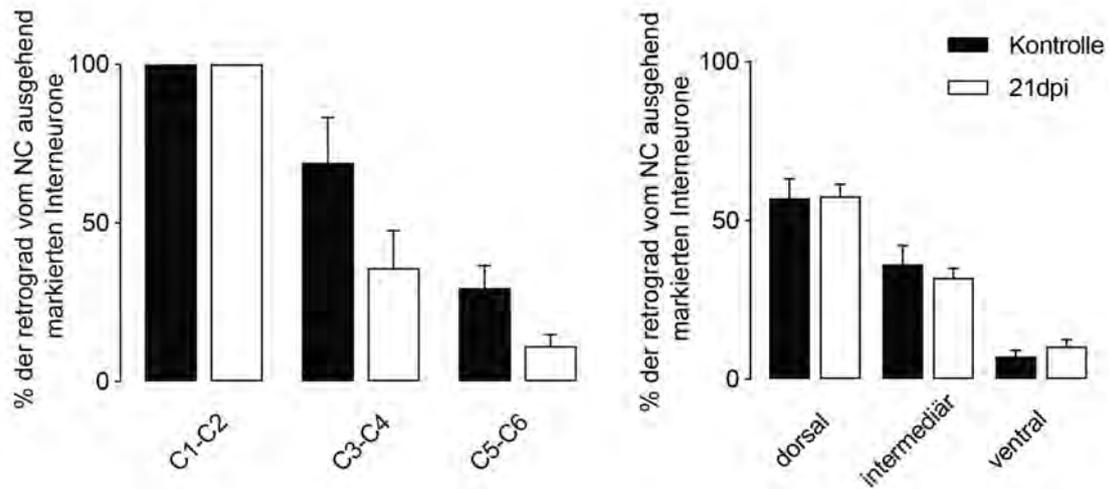


Abb. 4.17 Verteilung der NC-Neurone nach einer Hinterbahnstrangläsion

Vergleich der absoluten Anzahl (links) und Verteilung in Prozent (rechts) der zum *Nucleus cuneatus* projizierenden Interneurone nach 21 Tage nach Hinterstrangbahnläsion und in der Kontrollgruppe.

Retrograde Markierung mittels Injektion von SAD CVS Δ G mCherry und AAV CVS G in den *Nucleus cuneatus*. Anzahl der Tiere pro Gruppe = 6-7

Die Analyse des Gewebes in axialen Schnitten ermöglicht eine deutlich bessere Präzision der Lokalisation in der dorsoventralen Dimension (vgl. Abb. 4.18).

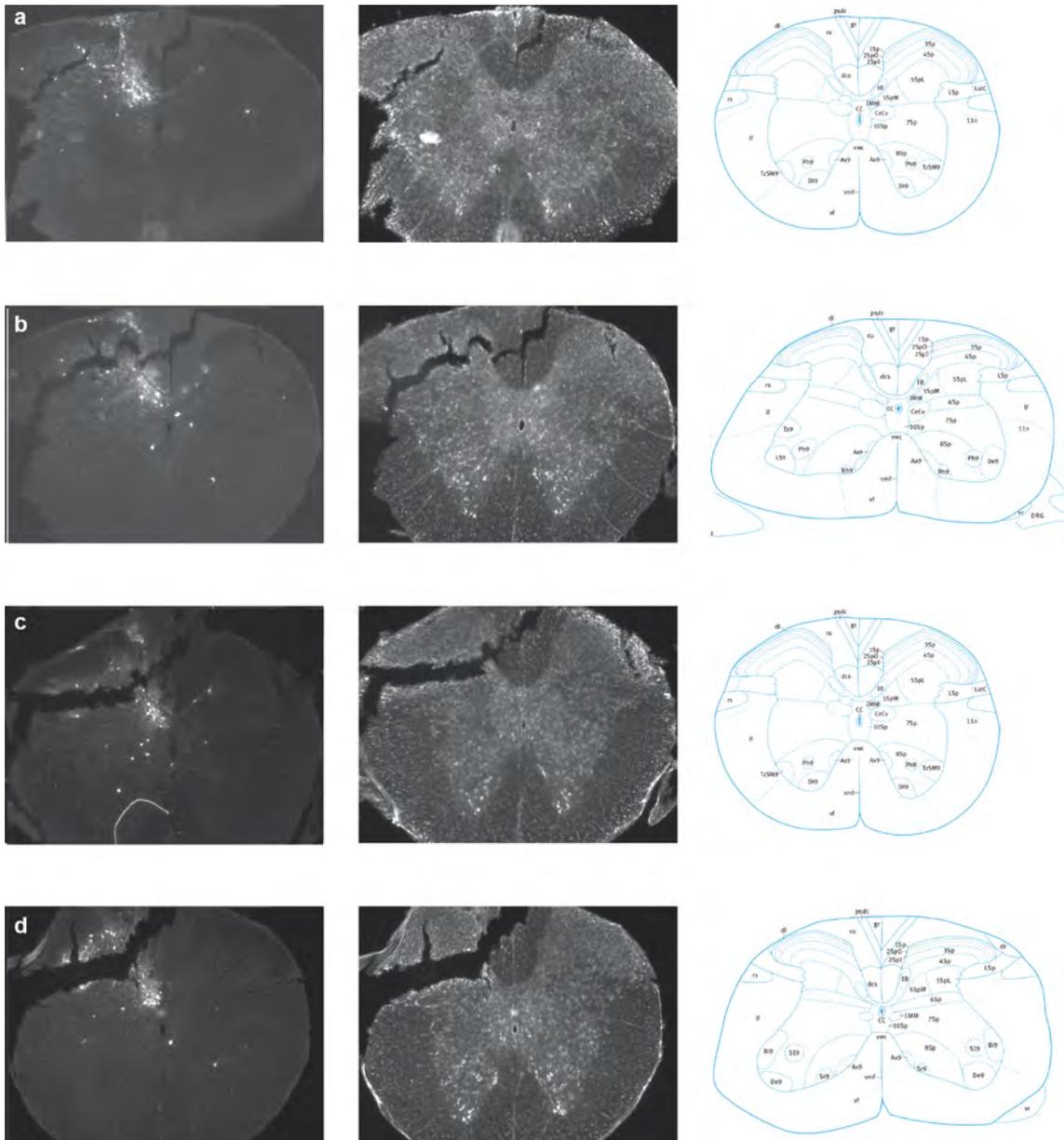


Abb. 4.18 Axiale Darstellung der NC-Neurone im Überblick

Experimentalaufbau wie in Abb. 4.8. Injektion von SAD CVS Δ G mCherry in den *Nucleus cuneatus* zur Quantifizierung der Verteilung der monosynaptisch verbundenen Interneurone. Links jeweils Darstellung der Rabiesviren (mCherry) im Vergleich mit Anfärbung der Neurone mittels Neurostain in der Mitte und der Anatomie rechts aus Watson *et al.* (2009) jeweils in verschiedenen Höhen: (a) C3; (b) C4; (c) C5; (d) C6. Aufgenommen mit dem invertierten Mikroskop, 10x-Vergrößerung

Eine genauere Analyse der Daten zeigt, dass sich auch hier die Verteilung der Interneurone in dorsoventraler Dimension sich kaudal der Läsion nicht statistisch signifikant nach einer Hinterstrangbahn-Läsion unterscheidet. In einer weiteren Serie in Tieren mit einer chronischen Läsion (84 Tage) zeigte sich ebenfalls kein statistisch signifikanter Unterschied.

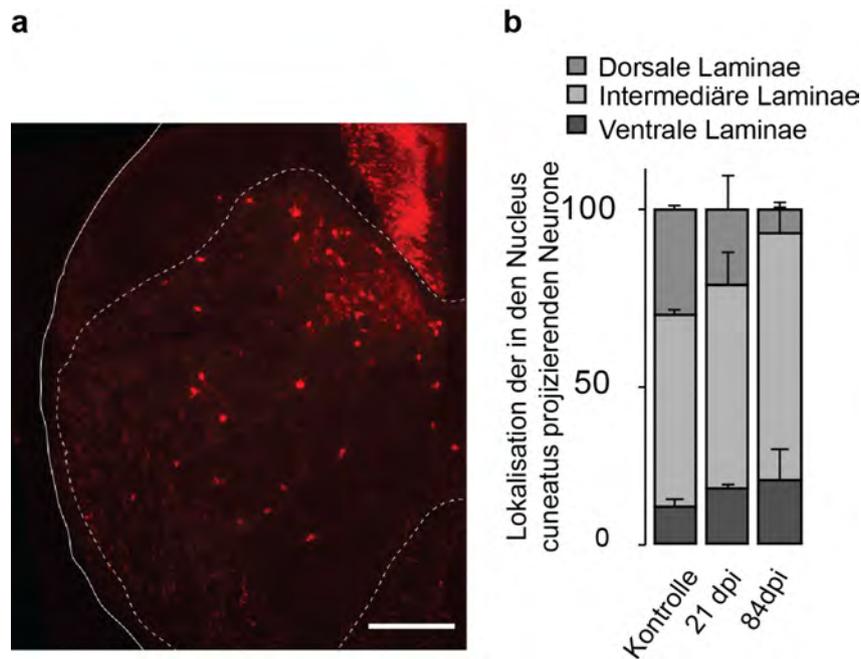


Abb. 4.19 Quantifizierung der Verteilung von NC-Neuronen 21 und 84 dpi

Dorsoventrale Verteilung der mit dem *Nucleus cuneatus* in Kontakt stehenden Interneurone nach Injektion von SAD CVS Δ G mCherry, modifiziert aus Granier, Schwarting, Fourli et al. (Manuskript in Vorbereitung)

Repräsentativer axialer Schnitt durch das zervikale Rückenmark (a), aufgenommen mit dem konfokalen Mikroskop. In 10x Vergrößerung 21 Tage nach Hinterstrangbahn-Läsion. (b) zeigt die Verteilung der Interneurone unterhalb einer Läsion in den Segmenten C3-C6 21 Tage, respektive 84 Tage nach einer Läsion im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Durchführung der Experimente erfolgte durch Charlene Granier und den Autor, die Auswertung erfolgte durch Charlene Granier. Maßstabsbalken 300 μ m

Vergleicht man nun die Daten, welche mittels longitudinaler Schnitte ausgewertet wurden, mit den Daten, die an axialen Schnitten ausgewertet wurden, so zeigt sich, dass es hier keine signifikanten Unterschiede gibt, wobei die Auswertung durch unterschiedliche Experimentatoren erfolgt ist. Die Daten sprechen daher dafür, dass die Darstellungen der zervikalen Interneurone vom *Nucleus cuneatus* aus auch bei unterschiedlichen Experimentatoren und unterschiedlicher Schnitttechnik vergleichbar sind.

4.5 Kontakte der DRG-Axone auf Neurone mit Projektionen zum *Nucleus cuneatus*

Basierend auf den vorangegangenen Experimenten stellte sich nun die Frage, ob die Interneurone, die retrograd durch den Rabies Virus markiert wurden, auch durch die Axone kontaktiert wurden, welche mittels AAV ausgehend vom DRG anterograd markiert werden. Hierfür wurden sowohl Tiere ohne Läsionen als auch Tiere mit einer Hinterstrangbahn-Läsion zu einem akuten Zeitpunkt (21 Tage nach Verletzung) und einem chronischen Zeitpunkt (84 Tage nach Verletzung) untersucht und verglichen (vgl. Versuchsaufbau in Abb. 4.20).

Voruntersuchungen ergaben, dass in 2 Kontrolltieren lediglich 4,96% der Interneurone von den markierten Interneuronen kontaktiert werden (vgl. Abb. 4.21). In einer ersten Serie zeigte sich der Hinweis, dass zu einem Zeitpunkt von 21 Tagen nach Hinterstrangbahn-Läsion die Anzahl der Kontakte der C6-Axone auf die retrograd markierten Interneurone erhöht ist. Nach 84 Tagen zeigt sich, dass die Gesamtanzahl im Vergleich zum akuten Zeitpunkt wieder verringert ist, jedoch die Anzahl der Kontakte pro Interneuron zunimmt. Die kontaktierten Interneurone sind in den untersuchten Tieren vor allem in den intermediären und in geringerem Ausmaß auch in den dorsalen Laminae lokalisiert. Diese ersten Ergebnisse gaben den Anlass, das Experiment mit größeren Gruppen zu komplettieren (vgl. Abb. 4.22).

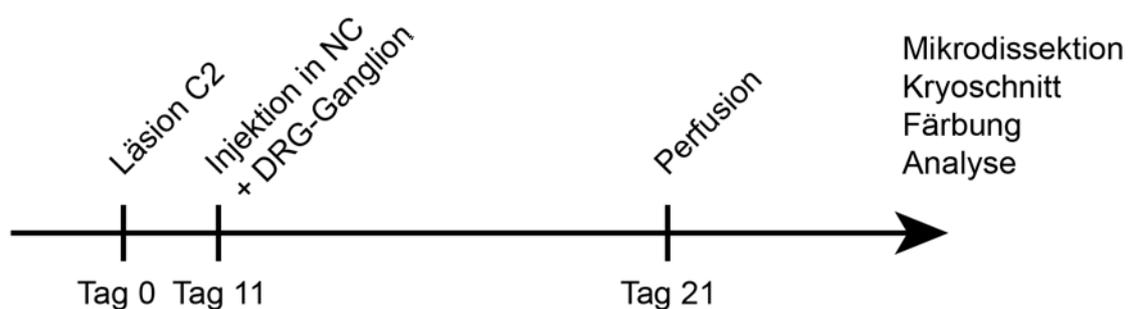


Abb. 4.20 Analyse der Axonkontakte auf NC-Neurone nach einer C2-Läsion

Aufbau des Experiments bei Injektion von SAD CVS Δ G mCherry in den *Nucleus cuneatus* zur Quantifizierung der Verteilung der monosynaptisch verbundenen Interneurone im zervikalen Rückenmark in Verbindung mit einer ipsilateralen Läsion auf Höhe C2 und einer anterograden Markierung der aufsteigenden Kollateralen mittels Injektion von AAV CAG eYFP.

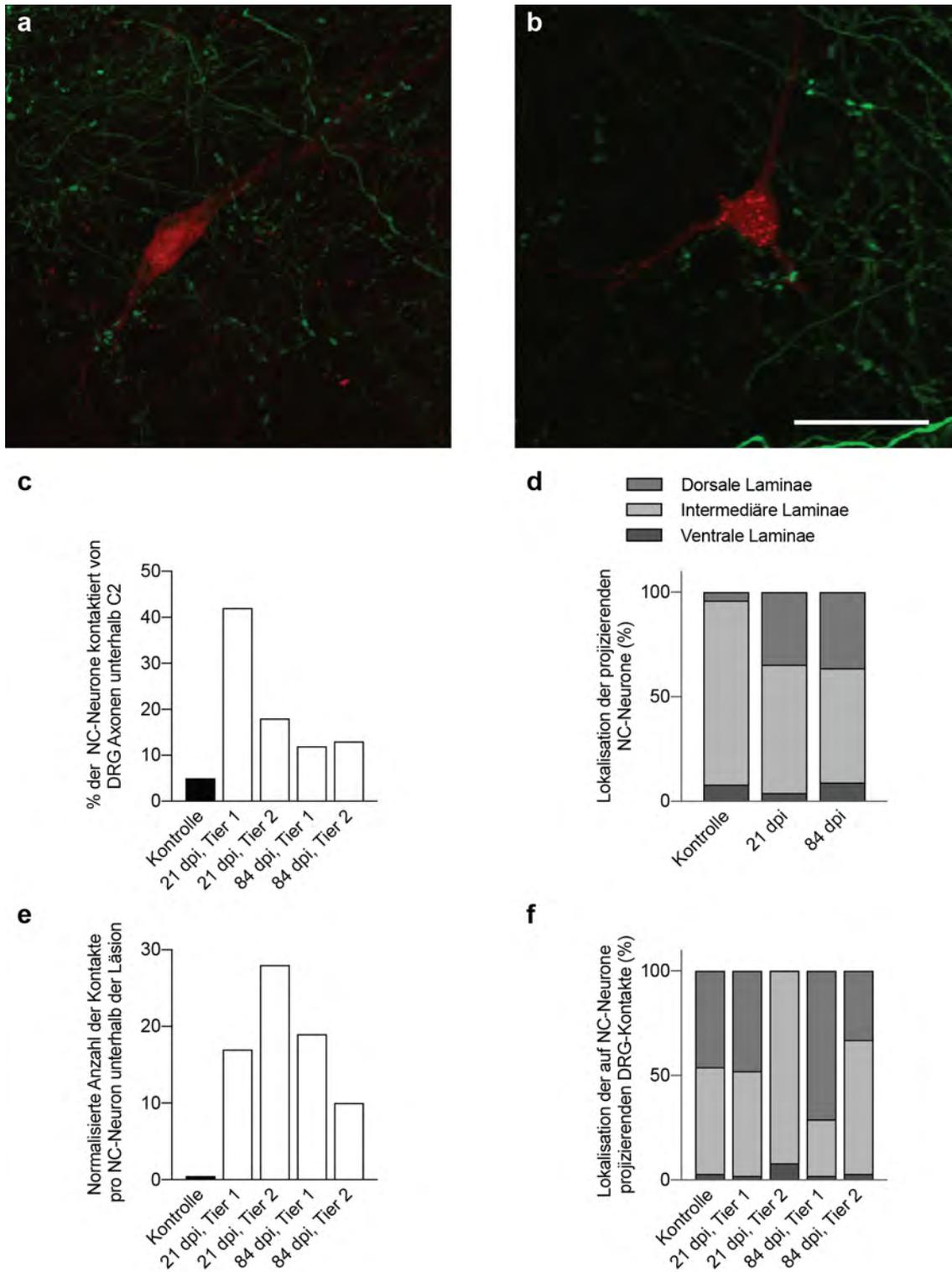


Abb. 4.21 Kontakte der aussproeienden Axone auf Interneurone mit Kontakt zum NC

Vorserie mit $n=2$ jeweils bei 21dpi, 84dpi, Kontrolle ausgewertet durch C. Granier. Experimentalaufbau gemäß Abb. 4.22, Interneurone jeweils kaudal der Läsion. Die Daten sind normiert auf Anzahl der markierten NC-Neurone und DRG-Axone. (a und b) zeigen jeweils repräsentative konfokale Abbildungen eines retrograd vom NC markierten Interneuronen mit Kontakten von Axonen, ausgehend von DRG-Injektion C6 21 Tage (a) respektive 84 Tage (b) nach Läsion. In (c) ist die Anzahl und in (d) die Lokalisation der markierten NC-Neurone kaudal der Läsion dargestellt. (e) zeigt die Quantifizierung der Anzahl der Kontakte pro NC-Neuron. (f) zeigt die Verteilung der axonalen Kontakte. Maßstabsbalken in (a, b): 50 μm

Mit Hilfe der in dieser Arbeit etablierten Methodik wurde das Experiment in Tieren an Tag 21 und 84 nach C2-Läsion durchgeführt und mit Kontrolltieren verglichen. Zum besseren Vergleich der einzelnen Gruppen wurden die Anzahl der markierten Interneurone normalisiert (zu der Anzahl von Neuronen rostral der Läsion, zwischen C1 und C2). Auch hier ergab sich der Hinweis, dass die absolute Anzahl der Kontakte kaudal der Läsion deutlich niedriger ist (Daten nicht gezeigt).

In der Analyse der Kontakte der DRG-Axone auf die zum *Nucleus cuneatus* projizierenden Neurone zeigte sich, dass 19,4% der Interneurone in Kontrolltieren von Kollateralen der Spinalganglien kontaktiert werden (Abb. 4.22a). Die Anzahl der kontaktierten Interneurone war 21 Tage nach Hinterstrangbahn-Verletzung signifikant erhöht auf 41,3% und nach 84 Tagen wieder etwas reduziert auf 29,8%, sodass diese nicht mehr signifikant zum Ausgangsniveau erhöht war (vgl. Abb. 4.22a).

Im selben Versuchsaufbau wurde zudem die Anzahl der Kontakte der von den Spinalganglien ausgehenden Kollateralen auf einzelne, retrograde markierte Interneurone ausgewertet. Hier zeigte sich, dass in Kontrolltieren etwa 1,52 Kontakte pro Neuron bestehen. 21 Tage nach einer Läsion der ipsilateralen Hinterstrangbahn auf Höhe C2 bestand ein signifikanter Anstieg auf 2,75 Kontakte pro Neuron, bzw. 3,24 Kontakte pro Neuron 84 Tage nach der Verletzung (vgl. Abb. 4.22c). Diese Daten unterstützen die Hypothese, dass es nach der Verletzung zu einem verstärkten Umbau der Netzwerke und insbesondere der Kontakte der Spinalganglien zu den monosynaptisch mit dem *Nucleus cuneatus* in Verbindung stehenden Interneuronen kommt.

Im nächsten Schritt konnte zudem die Lokalisation der kontaktierten Interneurone in der grauen Substanz untersucht werden. Hierbei zeigte sich, dass in Kontrolltieren die meisten kontaktierten Neurone in den intermediären Laminae des Rückenmarks lokalisiert sind (66,49%). Der Rest der Interneurone war hauptsächlich (28,87%) im dorsalen Rückenmark lokalisiert (Abb. 4.22c). Nach der Verletzung waren 59,5% der kontaktierten Interneurone nach wie vor in den intermediären Laminae lokalisiert, während der Anteil der kontaktierten Interneurone in den dorsalen Laminae erhöht war auf 40,5% 21 Tage nach Verletzung. 84 Tage nach Läsion kommt es zu einer Umkehr der Verteilung, sodass 82,12% der kontaktierten Interneurone in den intermediären Laminae liegen,

während mehr Neurone ventral als dorsal liegen. Diese Daten sind auch gut vereinbar mit den in Abb. 4.2d präsentierten Ergebnissen, die zeigen, dass nach einer Läsion auf Höhe C2 die meisten DRG Kollateralen dorsal und intermediär aussprossen, sodass es sich hier um dieselbe Zielregion handeln könnte.

Nächste Seite:

Abb. 4.22 DRG-Axone kontaktieren nach iSCI verstärkt zervikale NC-Neurone

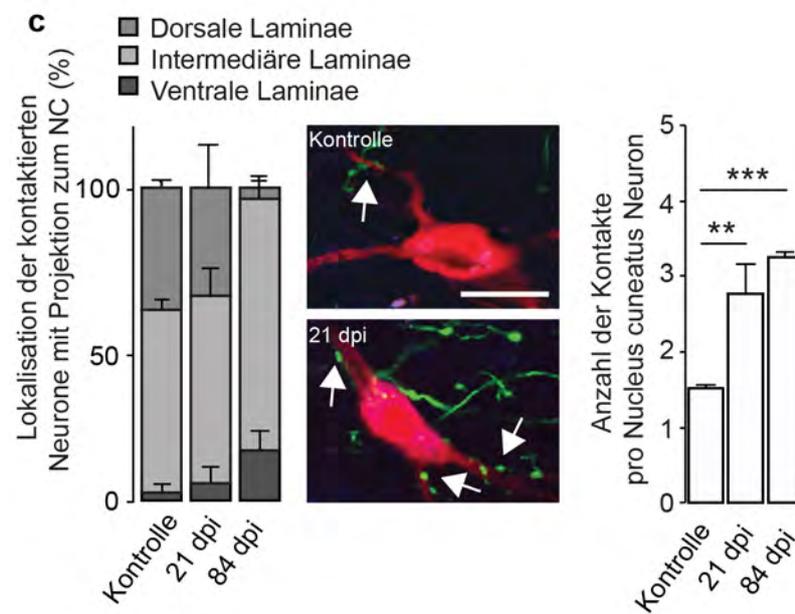
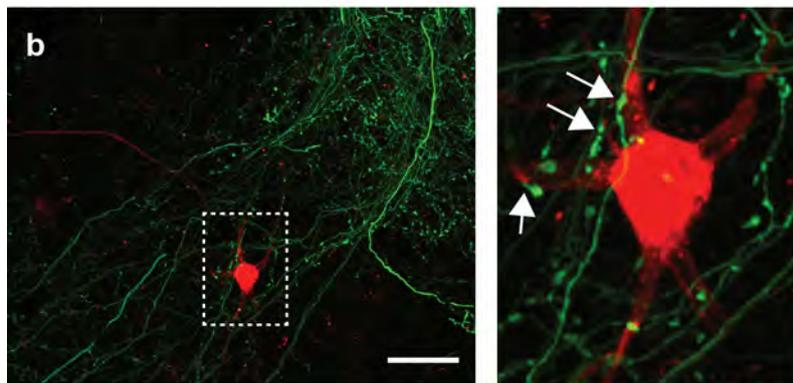
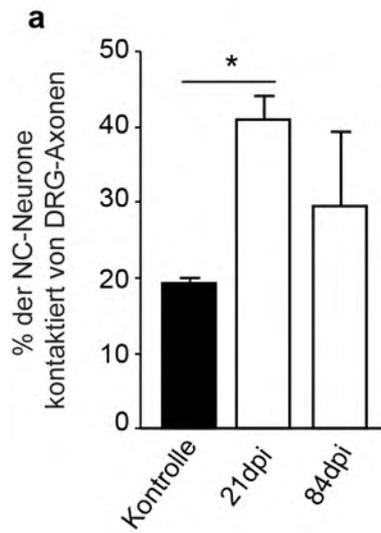
Verletzungen der zervikalen Hinterbahnstränge führen zur Ausbildung von Umgehungskreisläufen zwischen DRG Kollateralen und Interneuronen, die in den Nucleus cuneatus projizieren.

Erweiterung der Experimente aus Abb. 4.21. Mikrochirurgie durch Charlene Granier, Auswertung durch Charlene Granier und Evangelia Fourli. Modifiziert aus Granier, Schwarting, Fourli et al. (Manuskript in Vorbereitung)

(a) Zeigt die Quantifizierung der Kontakte der DRG-Axone auf Neurone mit Projektionen zum Nucleus cuneatus (NC-Neurone) in unverletzten Kontrolltieren im Vergleich zu Mäusen 21 und 84 Tage nach ipsilateraler Hinterstrangläsion in Prozent ($p = 0,0378$). In (b) ist eine repräsentative konfokale Darstellung von Kontakten zwischen Interneuronen, welche zum Nucleus cuneatus projizieren und DRG Kollateralen im zervikalen Rückenmark ausbilden, abgebildet. (Pfeile zeigen auf Kontakte) (c) zeigt die Quantifizierung der Lokalisation der von DRG-Kollateralen kontaktierten NC-Neuronen, in Prozent abgebildet. Ergebnisse zeigen die Anzahl von Kontakten pro kontaktiertem NC-Neuron ($p = 0,0041$ Kontrolle vs. 21 Tage nach Läsion und $p = 0,00002$ Kontrolle vs. 84 Tage nach Läsion). n pro Gruppe = 6-8.

Die Signifikanz der Daten wurde initial mittels zweifaktorieller Varianzanalyse untersucht und anschließend mit Hilfe des Dunnett-Tests getestet.

Maßstabsbalken entsprechen $50 \mu\text{m}$ in (b); der Ausschnitt entspricht einer 3x-Vergrößerung und $15 \mu\text{m}$ in (c).



4.6 Charakterisierung der NC-Neurone anhand von Signaltransmittern

Zur genaueren Charakterisierung der Interneuronen-Populationen wurden in einem weiteren Versuch auch transgene Tiere verwendet. Der Versuchsaufbau ist in Abb. 4.23 aufgeführt.

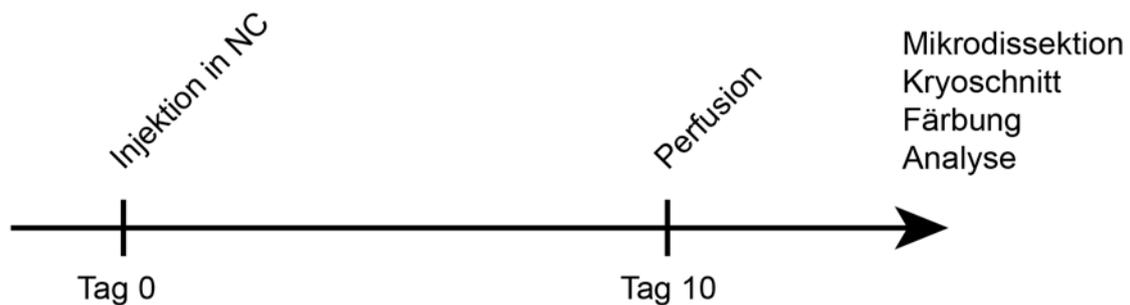


Abb. 4.23 Experimentalaufbau zur Analyse von Neurotransmittern in NC-Neuronen

Injektion von SAD CVS Δ G mCherry und AAV CAG-G in den *Nucleus cuneatus*

Abb. 4.24 zeigt eine repräsentative Darstellung eines longitudinalen, sagittalen Schnittes des zervikalen Rückenmarkes einer Gly T2-Maus aus der Kontrollgruppe, welche retrograd mit 0,1 μ l SAD mCherry und 0,1 μ l CMV G Virus injiziert wurde. Glycinerge Neurone werden hierbei grün dargestellt, das Rabies-Virus in Rot. Es zeigt sich, dass eine erhebliche Anzahl von Interneuronen in zwei Farbkanälen fluoresziert, sodass davon ausgegangen wird, dass zumindest ein Teil der NC-Neurone Glycin als Neurotransmitter verwenden, weitere Versuche wurden zur Quantifizierung durchgeführt (Daten nicht gezeigt, Manuskript in Vorbereitung).

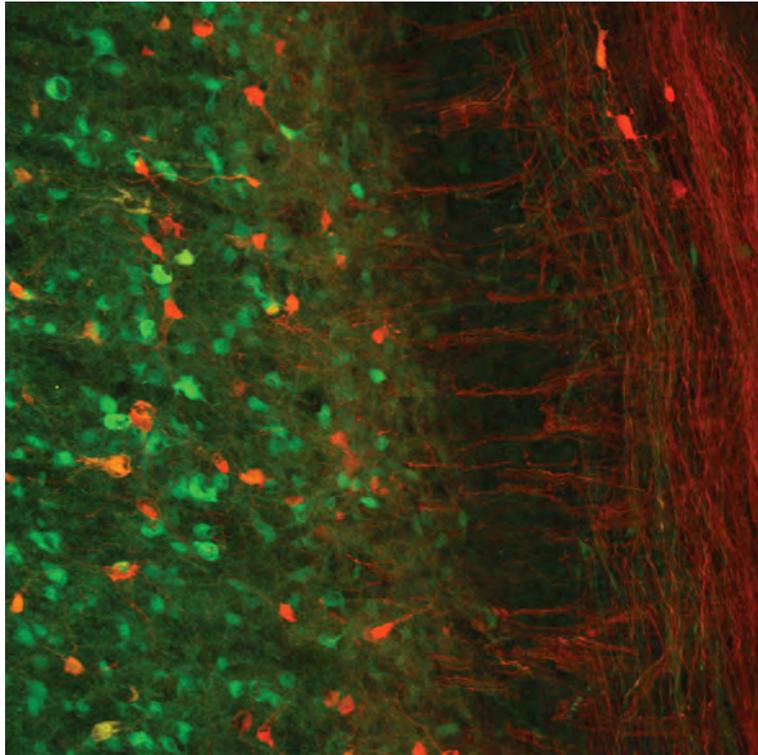


Abb. 4.24 Darstellung von NC-Interneuronen in einem GlyT2-Tier

Doppelte Darstellung von in den NC projizierenden Interneuronen in GlyT2-Tieren suggeriert Glycin als vorhandenen Neurotransmitter in den Interneuronen. Rot: Rabies-Virus, mCherry. Grün: Transgenes GlyT2-*Labelling*. Aufgenommen mittels konfokaler Mikroskopie, Vergrößerung: 20x, Experimentalaufbau gemäß Abb. 4.23.

5 Diskussion

5.1 Überblick der Ergebnisse

In dieser Arbeit konnte die plastische Reorganisation von somatosensiblen Netzwerken im zervikalen Rückenmark gezeigt und charakterisiert werden. Vorangegangene Experimente der Arbeitsgruppe (durchgeführt von Fabian Laage-Gaupp) zeigten erstmals ein vermehrtes Aussprießen von DRG Axonen nach Läsionen der Hinterstrangbahnen im zervikalen Rückenmark, welche zu einem akuten Zeitpunkt 21 Tage und einem chronischen Zeitpunkt, 84 Tage, nachgewiesen werden konnten. Aufbauend auf diesen Ergebnissen wurde diese Plastizität weiter charakterisiert. Hierfür konnten zunächst die Lokalisation der Synapsen, welche von den kollateralisierenden DRG Axonen ausgehen, beschrieben. Dies zeigte, dass die Verteilung der dargestellten Synapsen innerhalb des Rückenmarks sich auch nach einer Läsion nicht signifikant verändert. Für die Charakterisierung der Zielzellen der Axon-Kollateralen wurde die retrograde Markierung von Interneuronen ausgehend vom *Nucleus cuneatus* durchgeführt. Für die Darstellung der Interneurone wurde eine stereotaktische Injektionsmethode in den *Nucleus cuneatus* der Maus entwickelt. Hiermit war es möglich zu zeigen, dass die Interneurone, die direkt zum *Nucleus cuneatus* projizieren, von den aussprießenden DRG Axonen kontaktiert werden und somit eine somatosensible Projektion zum Hirnstamm wiederhergestellt werden kann. Zusammen mit Charlene Granier konnte schließlich auch gezeigt werden, dass die Anzahl der Kontakte von DRG Neuronen zu diesen Interneuronen nach Verletzungen des zervikalen Rückenmarks zunimmt. Ein Überblick über die Ergebnisse ist in Abb. 5.1 dargestellt.

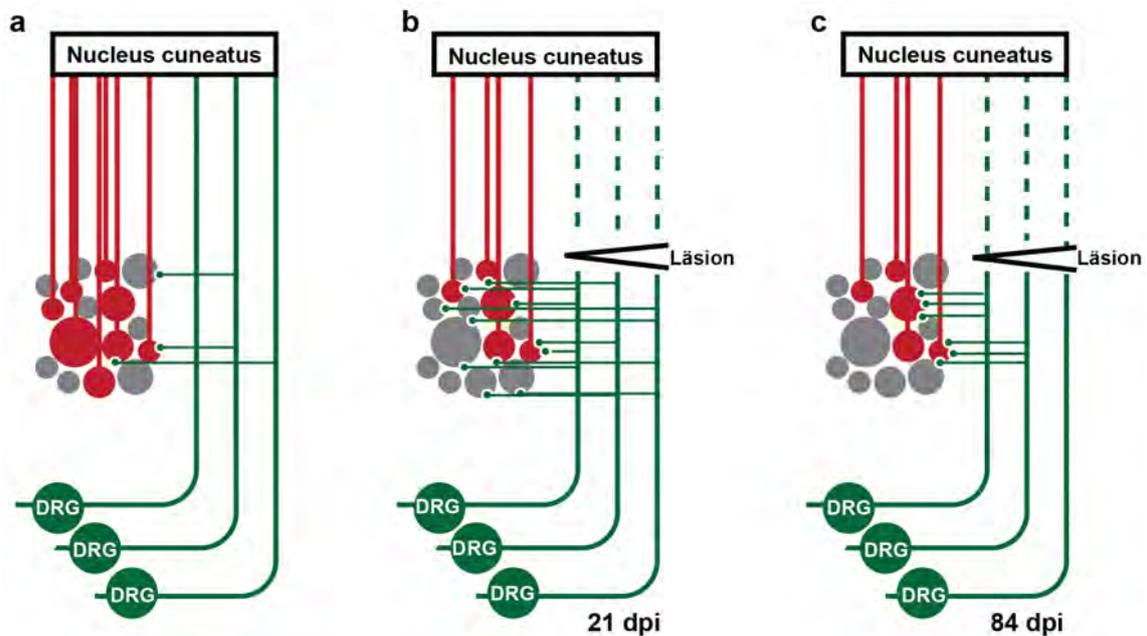


Abb. 5.1 Überblick der Ergebnisse der Promotion

(a) DRG-Axone (grün) bilden Kollateralen im zervikalen Rückenmark und kontaktieren Interneurone (grau, rot). Retrograd können mittels modifizierter Rabiesviren Interneuronenpopulationen im zervikalen Rückenmark markiert werden (rot), welche monosynaptisch mit dem *Nucleus cuneatus* (NC) verbunden sind, der gleichzeitig Projektionsziel der DRG-Axone ist. Nach einer Läsion der Hinterstrangbahnen kommt es zu einer vermehrten Kollateralisierung dieser Axone (b). Da ein Teil der Interneurone, welche vom NC retrograd markiert sind, nicht über die Hinterstrangbahnen verschaltet werden, können diese nach wie vor viral markiert werden. So konnten gezeigt werden, dass die Anzahl der Kontakte auf die markierten Interneurone zunimmt. Nach 84 Tagen (c) kommt es jedoch wieder zu einem Rückgang der absoluten Kontakte. Dennoch nimmt die Anzahl der Kontakte pro kontaktiertem Neuron weiter zu, sodass neu geschaffene Umgehungskreisläufe persistieren und somit zu einer Regeneration beitragen könnten.

5.2 Methodik zur Darstellung von sensiblen Netzwerken

5.2.1 Ventraler Zugang mit stereotaktischer Injektion zur gezielten Infiltration des *Nucleus cuneatus*

Die Injektion der Rabies-Viren in den *Nucleus cuneatus* erfolgte über einen ventralen stereotaktischen Zugang. Vor dem Beginn der Arbeit war die gezielte Injektion von Farbstoffen und Viren in den *Nucleus cuneatus* der Maus sehr unpräzise (vgl. Abb. 4.4). Aufgrund der geringen Dimensionen des Hirnkerns und der kaudalen Lage stellte dies eine erhebliche technische Herausforderung dar. In Studien an Ratten (Barbaresi und Mensa, 2016) und Affen (Liao *et al.*, 2015, Liao *et al.*, 2018) wurden jeweils dorsale stereotaktische Zugänge verwendet. In der Maus ist dies aufgrund der schwierigen kaudalen Trepanation und der fehlenden Präzision, die am ehesten auf den großen Abstand zu Bregma zurückzuführen ist, nicht möglich.

Eine Alternative hierzu stellt ein ventraler, nicht stereotaktisch gesteuerter Zugang dar. Dieser Zugang ermöglicht eine präzisere Injektion. Als Referenzpunkte für eine Injektion konnten die *Arteriae vertebrales* verwendet werden. Die Vorteile dieses Zugangs sind neben der höheren Präzision eine wesentlich geringere Invasivität. Da keine Trepanation erfolgen muss und der Zugang atraumatisch erfolgt, haben die Versuchstiere im Anschluss an die Operation selten Defizite, jedoch zeigten erste Versuchsreihen mit Injektion von Methylblau, dass auch bei diesem Zugang die Injektion nicht präzise und ausreichend reproduzierbar war, um den *Nucleus cuneatus* sicher zu infiltrieren (vgl. Abb. 4.6). Ein weiterer Nachteil ist die höhere technische Schwierigkeit des Eingriffs, da für den ventralen Zugang die Trachea und die hirnversorgenden Gefäße vorsichtig zur Seite präpariert werden müssen.

Die Methode wurde daher im Rahmen dieser Arbeit erweitert und die stereotaktische Injektion von ventral etabliert. Die Kombination beider Methoden ermöglicht eine präzise Injektion der Viren in den *Nucleus cuneatus* mit einer geringen Morbidität der Versuchstiere und guten Injektionsergebnissen. Nachteile sind die komplexe OP-Technik mit Einspannen des Versuchstiers in den stereotaktischen Rahmen in Rückenlage, ventralem Zugang und anschließender Dura-

Präparation und Injektion, die aufwändigen Materialanforderungen und die etwas verlängerte OP-Dauer auf etwa 25 Minuten bei geübtem Operateur.

5.2.2 Virale Tracer

Für die Darstellung der Plastizität sensiblen Netzwerke wurden zwei verschiedene *Tracing* Methoden mit unterschiedlichen Viren verwendet:

Bei DRG-Injektionen wurden AAV-Viren benutzt. Unter anderem wurde die Methodik bereits in vorangegangenen Studien aus dem Labor (Bareyre *et al.*, 2011) durchgeführt. In diesen Experimenten nutzte die Arbeitsgruppe ein rAAV-ires-GFP – Konstrukt, von dem 1µl Virus-Suspension infiltriert und für 12-14 Tage inkubiert wurde. Die Darstellung der Axone war hingegen für dieses Projekt zu stark, sodass es nicht möglich war, die einzelnen Boutons und Axone voneinander zu unterscheiden und zu quantifizieren. Daher wurden in diesem Projekt lediglich 500µl in einer 1:10 Verdünnung injiziert. Zudem ist für die unter anderem in Abb. 4.1 dargestellten Experimente die Inkubationszeit auf 10-12 Tage verkürzt worden.

Injektionen in den *Nucleus cuneatus* wurden mit einem modifizierten Rabies-Virus durchgeführt. Hierdurch konnten Interneurone mit direktem Kontakt zum *Nucleus cuneatus* retrograd im zervikalen Rückenmark dargestellt werden. SAD CVS Δ G mCherry – Viren sind ein sehr potenter Vektor für die Darstellung von neuronalen Netzwerken. Sie wurden von der Arbeitsgruppe Conzelmann entwickelt (Wickersham *et al.*, 2007a, Wickersham *et al.*, 2007b) und zeigten auch bereits *in vivo* gute Ergebnisse (Romanelli *et al.*, 2016, Hagendorf und Conzelmann, 2015). Die hohe Sensitivität des Systems erlaubt eine große Anzahl an direkt projizierenden Interneuronen darzustellen. Wie aus Abb. 4.9 und 4.14 hervorgeht, werden daher jedoch durch die Injektion in den *Nucleus cuneatus* verschiedenste Zellen im Hirnstamm und auch darüber hinaus angefärbt, sodass initial eine weitflächige Infektion des Virus durch Diffusion ausgeschlossen werden musste. Aus diesem Grund wurde das Viruskonstrukt AAV CAG G + T2A CFP als Kontrolle genutzt. So konnte die Expression des, für die Aufnahme des Rabiesvirus essentiellen Protein Gs, an einen Farbstoff (CFP) gekoppelt werden (Abb. 4.11). Hier zeigte sich, dass die Infektion des AAV CAG G + T2A CFP-Konstrukts lokal umschrieben war. Es konnte somit davon

ausgegangen werden, dass der Großteil der dargestellten Zellen direkt mit dem *Nucleus cuneatus* in Verbindung steht. Eine Aufnahme des Virus in weiteren benachbarten Neuronen der *Formatio reticularis* kann dennoch nicht mit letzter Sicherheit ausgeschlossen werden.

Die Expressionsmuster im zervikalen Rückenmark entsprachen anderen Studien mit höherer Präzision, beispielsweise in Affen. Hier konnten bei einzelnen Tieren elektrophysiologisch kontrollierten Injektionen mit Cholera toxin subunit *B* in den *Nucleus cuneatus* durchgeführt werden (Liao *et al.*, 2015).

5.2.3 Plastizität der aufsteigenden Bahnen

Der erste Teil dieser Studie befasste sich mit der Charakterisierung der aus-sproßenden Interneurone nach einer Durchtrennung der Hinterstrangbahnen auf Höhe C2. Nachdem bereits seit längerem die Plastizität von motorischen Bahnen im Rückenmark der Maus bekannt ist (Bareyre *et al.*, 2004, Bareyre, 2008, van den Brand *et al.*, 2012, Courtine *et al.*, 2008), konnte erstmals das Kollateralisieren von Axonen der Hinterstrangbahnen nach Rückenmarksläsionen gezeigt werden (Abb. 4.1). In diesen Untersuchungen zeigte sich 21 Tage nach der isolierten Läsion der Hinterstrangbahnen eine hochsignifikante Zunahme von intraspinalen, segmentalen DRG Kollateralen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Zu einem chronischen Zeitpunkt (84 Tage) zeigen sich deutlich weniger Kollateralen im Vergleich zum Zeitpunkt von 21 Tagen nach Läsion, jedoch nach wie vor signifikant mehr Kollateralen als in der Kontrolle. Es sollte daher eruiert werden, ob diese neuen DRG Kollateralen eine funktionelle Bedeutung für die Erholung der Tiere nach Rückenmarksläsionen haben, oder ob dieses Phänomen keinen funktionellen Nutzen darstellt.

Wie aus der Literatur bekannt ist, übertragen DRG-Axone unterschiedliche sensible Qualitäten und projizieren bereits auf Ebene des Rückenmarks in unterschiedliche Zielgebiete (Mirnics und Koerber, 1995, Sanes und Yamagata, 1999). Grundsätzlich können drei intraspinale Zielgebiete mit unterschiedlicher Funktion unterschieden werden: Nozizeptive, mechanorezeptive und propriozeptive Subgruppen (Marmigere und Ernfors, 2007). Nozizeptiv afferente Neuronen dringen in das Rückenmarkshorn ein und enden in den Laminae I und II. Mechanorezeptive Axone dringen in die mediale graue Substanz des Rücken-

marks ein, drehen sich dann und treten ventral in das Rückenhorn ein, um schließlich in den Laminae III und IV des Rückenorns zu enden. Propriozeptive Afferenzen passieren den medialen Teil des Hinterorns ohne sich zu verzweigen und erreichen das ventrale Rückenmark, wo sie schließlich Synapsen mit den Motoneuronen bilden (Caspary und Anderson, 2003).

Um die kollateralisierten Axone besser charakterisieren zu können und gegebenenfalls auch anatomisch bekannten Traktsystemen zuzuordnen, wurde im Rahmen dieser Arbeit zunächst die Lokalisation der DRG-Kollateralen und ihrer synaptischen Boutons quantifiziert und deren Lokalisation entlang der Laminae von Rexed (Watson *et al.*, 2009) zugeordnet. Zur besseren Evaluation wurden die Laminae I-IV als dorsale, V-VII + X als intermediäre und VIII-IX als ventrale Gruppe zusammengefasst. Bei diesen Auswertungen zeigte sich, dass Kontrolltiere (ohne Läsion) vor allem Kontakte in den intermediären Schichten ausbilden. Weniger axonale Boutons konnten auch in den dorsalen und ventralen Laminae gezählt werden (vgl. Abb. 4.2). Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass mit den durchgeführten AAV-Injektionen in die Spinalganglia unselektiv verschiedene neuronale Subpopulationen mit unterschiedlichen Projektionsarealen dargestellt werden konnten.

Nach einer Läsion der Hinterstrangbahn auf Höhe C2 kommt es, wie in Abb. 4.1 und 4.2 gezeigt wird, im zervikalen Rückenmark zu einer deutlichen Zunahme der Kollateralisierung aufsteigender DRG-Axone. Das Verteilungsmuster der Kollateralen verändert zu Gunsten dorsaler Kontakte (vgl. Abb. 4.2). Diese Veränderung besteht auch noch zu dem von uns gewählten chronischen Zeitpunkt, nach 84 Tagen. In Zusammenschau mit der oben erwähnten Literatur, könnte es sich bei den kontaktierten Interneuronen daher vor allem um Neurone mit mechanozeptiven Funktionen und nozizeptiven Funktionen handeln, da diese die gleiche anatomische Zielregion haben. Jedoch könnten auch neue Neuronpopulationen kontaktiert werden, die bei unverletzten Tieren keine Kontakte mit DRG-Axonon bilden und ebenfalls in den dorsalen Laminae lokalisiert sind. Insbesondere könnten hier auch LPSN eine Rolle spielen, welche bei der Bildung von motorischen Umgehungskreisläufen nach inkompletten Rückenmarksverletzungen eine wichtige Rolle spielen und in den Laminae V-VIII lokalisiert sind (Bareyre *et al.*, 2004, Loy *et al.*, 2018, Kerschensteiner *et al.*, 2004).

5.3 Spinale Neurone mit direkten Afferenzen zum *Nucleus cuneatus*

Durch die Injektion modifizierter Rabiesviren in den *Nucleus cuneatus* und anschließendes Imaging des zervikalen Rückenmarks konnten Neuronen-Populationen dargestellt werden, die unmittelbar mit dem *Nucleus cuneatus* in Kontakt stehen (vgl. Abb. 4.9- 4.14). Hierbei zeigte sich in der Kontrollgruppe ohne Läsion entlang des gesamten zervikalen Rückenmarks eine Neuronen-Population, die hauptsächlich in den intermediären Laminae V-VII + X lokalisiert ist. In der von Liao et al. 2015 veröffentlichten Studie, bei der Cholera toxin B (CTB) in den *Nucleus cuneatus* im Affenmodell injiziert wurde (Liao et al., 2015), sowie auch in Ratten- (de Pommery et al., 1984, Giesler, 1984) und Katzenmodellen (Weisberg und Rustioni, 1979, Enevoldson und Gordon, 1989) konnten ähnliche Interneuronen-Populationen durch retrograde Markierung nachgewiesen werden. Am spezifischsten ist hierbei sicherlich die Studie von Liao et al. aus dem Jahr 2015 (vgl. Abb. 5.2), da die Injektion unter elektrophysiologischem Monitoring erfolgte. Hier zeigt sich im Vergleich zu unseren Ergebnissen kein wesentlicher Unterschied, obwohl die anderen Tiermodelle aufgrund der Größe der anatomischen Strukturen eine selektivere Darstellung aufweisen könnten (Liao et al., 2015).

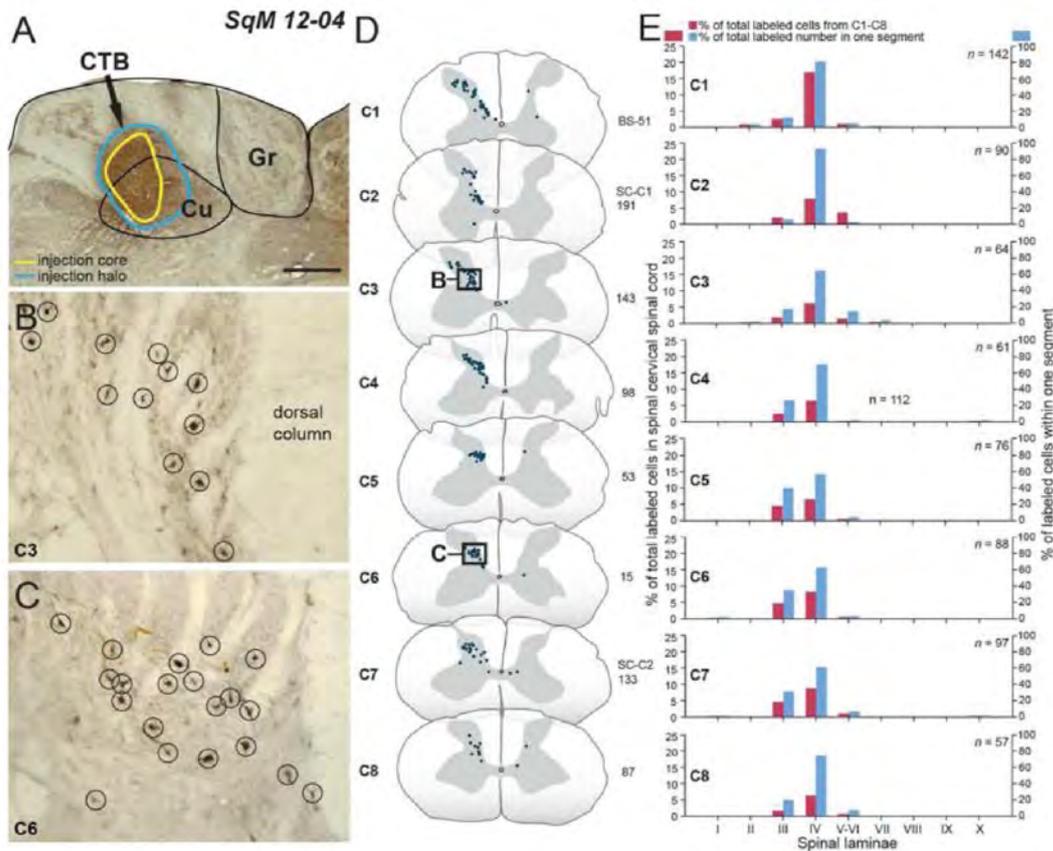


Abb. 5.2 Verteilung von NC-Neuronen im zervikalen Rückenmark im Affenmodell

Verteilung der spinalen Interneurone nach ipsilateraler Injektion von Cholera toxin B in den *Nucleus cuneatus* von einem Totenkopffaffen. (a) Darstellung des Injektionsortes, der neben dem *Nucleus cuneatus* auch den angrenzenden *Fasciculus cuneatus* im Hirnstamm auf der linken Seite umfasst. Die dargestellten Neurone sind vom rostralen (b), bis hin zum kaudalen (c) zervikalen Rückenmark lokalisiert und befinden sich vor allem im Hinterhorn auf der Seite der Injektion (d). Quantifizierung (e) der Verteilung. Maßstab: 500µm in (a) und 100 µm in (b-c) Abbildung und Legende aus Abbildung 4 von Liao *et al.* (2015).

Nachdruck mit Genehmigung von John Wiley & Sons, Inc.: Journal of Comparative Neurology, Spinal cord neuron inputs to the cuneate nucleus that partially survive dorsal column lesions: A pathway that could contribute to recovery after spinal cord injury, © 2015

Im Mausmodell konnte aufgrund des verwendeten *Tracers* eine Population spinaler Interneurone dargestellt werden, welche monosynaptisch mit dem *Nucleus cuneatus* verschaltet sind (vgl. Abb. 4.9-4.14). Offen ist jedoch die Frage der Funktion dieser Interneuronen-Population. Experimente aus den 1980er und 1990er Jahren zeigten, dass ein Teil der Neurone der Hinterstrangbahnen über Neurone der intermediären Laminae im Rückenmark verschaltet werden (Maxwell *et al.*, 1985, Krames und Foreman, 2007, Condes-Lara *et al.*, 2018, Cliffer und Giesler, 1989, de Pommery *et al.*, 1984). Es ist wahrscheinlich, dass es sich bei den dargestellten Interneuronen um einen Teil dieses Signalwegs handelt. Verschiedene Funktionen werden für den Signalweg beschrieben: So

konnten bereits in den spinalen Verschaltungsneuronen Reaktionen auf leichte mechanische Reize (Giesler und Cliffer, 1985) und schädliche taktile Reize (Bennett *et al.*, 1984) gezeigt werden, welche direkt über den *Lemniscus medialis* an den kontralateralen Thalamus weitergeleitet werden (Watson *et al.*, 2009). Darüber hinaus ist dieser, auch als postsynaptische Hinterstrangbahn in der Literatur bezeichnete Signalweg als Bestandteil der Wahrnehmung von viszeralem Schmerzen etabliert (Watson *et al.*, 2009, Al-Chaer *et al.*, 1999). Hierbei steht jedoch der *Tractus gracilis* im Vordergrund, welcher in dieser Studie nicht untersucht wurde. Zusätzlich konnten in der Lamina V des Rückenmarks bereits in Experimenten in den 1980er Jahren insbesondere multirezeptive Neurone identifiziert werden, hierunter nozizeptive und mechanorezeptive Neurone (Watson *et al.*, 2009, Ritz und Greenspan, 1985). Lamina VI und VII enthalten vor allem Neurone der Reflexverschaltung, beziehungsweise prämotorische Interneurone (Watson *et al.*, 2009).

In Zusammenschau der Ergebnisse ist es daher höchst wahrscheinlich, dass es sich bei den, in unseren Experimenten dargestellten Neuronenpopulation um Interneurone der postsynaptischen Hinterstrangbahnen handelt.

Zur weiteren Charakterisierung der Neuronenpopulation dient die Beobachtung der lokalen Verteilung sowie deren Veränderung nach Läsion der Hinterstrangbahn. Wie aus der Literatur entnommen werden kann, erfolgt die Fortleitung der postsynaptischen Signale zum *Nucleus cuneatus* zum Großteil über den *Tractus cuneatus* (Condes-Lara *et al.*, 2018, Cliffer und Willis, 1994). Deshalb überrascht es nicht, dass nach einer rostralen Läsion ein Teil der Neurone bei einer vom *Nucleus cuneatus* ausgehenden Darstellung fehlt (vgl. Abb. 4.17). Für einen funktionsfähigen Umgehungskreislauf ist es jedoch zwingend erforderlich, dass die Neurone über andere Faserbahnen zum *Nucleus cuneatus* projizieren. Unsere Daten bestätigen diese Hypothese. Zwar reduziert sich nach einer Läsion die absolute Anzahl der markierten Interneurone distal der Läsion, jedoch können weiterhin Interneurone im zervikalen Rückenmark dargestellt werden (vgl. Abb. 4.16 und 4.17).

Fraglich ist nun, ob die angefärbten Interneurone ihre Signale über andere Fasertrakte in den *Nucleus cuneatus* übermitteln, oder ob durch methodische Mängel eine unvollständige Durchtrennung der Hinterstrangbahn dazu geführt hat, dass ein fortwährender Kontakt der Interneurone über den *Tractus*

cuneatus zum Hirnstamm bestand.

Als Kontrolle der durchgeführten Läsion wurden drei unabhängige Methoden verwendet: Erstens wurde regelhaft die Läsionsstelle histologisch aufgearbeitet und Tiere mit unvollständigen Läsionen aus der Studie ausgeschlossen. Zweitens wurden die mittels AAV-Virus injizierten Spinalganglien histologisch kontrolliert. Sobald sich das Signal des Rabiesvirus in einem Spinalganglion darstellte, wurde dies als unvollständige Läsion bewertet und das Tier aus der Studie ausgeschlossen. Drittens wurden Tiere mit Zeichen von DRG- *Labelling* rostral der Läsion oder im *Nucleus cuneatus* ausgeschlossen. Ein weiterer systematischer Fehler wäre die unspezifische Injektion in den *Nucleus cuneatus*, welche unter 5.2 diskutiert wird. Übereinstimmend mit unseren Ergebnissen konnten auch Arbeitsgruppen um Giesler und Liao geringe Anzahlen von Neuronen distal der Läsion feststellen (vgl. Abb. 4.17) (Giesler *et al.*, 1984, Liao *et al.*, 2015). Die in unseren Experimenten verhältnismäßig größere Anzahl der Neurone nach Läsion könnte am ehesten der geringeren Sensitivität der, in den Vorstudien verwendeten, nichtviralen *Tracer* zuzuschreiben sein (Giesler *et al.*, 1984, Liao *et al.*, 2015).

Zusammenfassend ist es daher wahrscheinlich, dass die von uns verwendete Methode valide ist und die dargestellten Interneurone unabhängig vom ipsilateralen *Tractus cuneatus* zum *Nucleus cuneatus* verschaltet werden.

Die Auswertung der Verteilung der Interneurone 21 Tage nach Läsion ergab keine signifikante Abweichung hinsichtlich der Lokalisation im Vergleich mit der Kontrollgruppe. Dieses Ergebnis stimmt ebenfalls mit der Studie von Liao aus dem Jahr 2015 überein, bei der ein ähnlicher Versuch im Primatenmodell durchgeführt wurde (Liao *et al.*, 2015). Die unveränderte Verteilung könnte ein Hinweis darauf sein, dass die kontaktierten Interneurone nach der Läsion nicht Teil einer Subpopulation sind, die im Vorfeld nicht durch DRG-Kollaterale kontaktiert wurde. Vielmehr stellt sie ein Teil der auch physiologisch bestehenden Verschaltungen mit Interneuronen dar, welche nach einer Läsion intensiviert werden könnten.

5.4 Komplettierung des Umgehungskreislaufs

Für die Analyse eines möglichen Umgehungskreislaufs um eine Läsion der Hinterstrangbahn war es erforderlich, die Kontakte der aussproßenden, aufsteigenden Fasertrakte mit den, zum *Nucleus cuneatus* projizierenden, Interneuronen zu erfassen. Zunächst sollte kritisch hinterfragt werden, warum die Ergebnisse der durchgeführten Experimente, welche in Abb. 4.21 dargestellt sind, von den späteren Experimenten in Abb. 4.22 abweichen. Dies könnte einerseits an der Art der Auswertung durch verschiedene Experimentatoren trotz identischer Methodik liegen. Andererseits ist es aber auch denkbar, dass die Daten aufgrund der verschieden großen Anzahl der untersuchten Tiere und vergleichsweise kleinen Stichprobe voneinander abweichen. In den Kontrollversuchen ohne Läsion zeigte sich, dass die Kollateralen der C6-Axone die Interneurone in den Segmenten C2 bis C6 kontaktieren (vgl. Abb. 4.21, 4.22). Diese Kontakte sind jedoch nur schwach ausgeprägt. Nur ein geringer Anteil der Interneurone wird durch die Axone aus einem Spinalganglion kontaktiert. In der Literatur finden sich nur wenige Informationen über die genaue Höhe der Verschaltung auf das postsynaptische Interneuron der Hinterstrangbahn. Eine Studie von Jankowska *et al.* zeigte die mehrsegmentale elektrophysiologische Erregbarkeit von Interneuronen nach Stimulation auf Segmentebene (Jankowska *et al.*, 1979). Unsere Daten bestätigen dies, da im unverletzten Tier die Verschaltung auf das postsynaptische Interneuron über mehrere Segmente erfolgt (vgl. Abb. 4.1).

In den weiteren Experimenten untersuchten wir die Kontakte in einem Zeitraum von 21 sowie 84 Tagen nach Läsion. Die Daten zeigen, dass hier die Anzahl der, von den C6 DRG Kollateralen kontaktierten, Interneurone 21 Tage nach Läsion signifikant erhöht ist. Nach 84 Tagen reduziert sich jedoch die absolute Anzahl der Kontakte, sodass hier im Vergleich zur Kontrollgruppe kein signifikanter Unterschied mehr besteht (vgl. Abb. 4.22a). Anders verhält es sich mit der Anzahl der Kontakte pro kontaktiertem Neuron. Hier nimmt die Anzahl auch bis zum chronischen Zeitpunkt weiter zu (vgl. Abb. 4.22c), sodass postuliert werden kann, dass bestehende Kontakte im Zeitverlauf weiter verstärkt werden. Diese Daten unterstützen somit unsere Hypothese, dass die Reorganisation der sensiblen Netzwerke zur funktionalen Kompensation nach einer Rückenmarksläsion beiträgt.

Betrachtet man nun die Verteilung der kontaktierten Interneurone genauer, so zeigt sich, dass der initial hohe Anteil an kontaktierten dorsalen Interneuronen mit der Zeit rückläufig ist (vgl. Abb. 4.22a). Es ist somit unwahrscheinlich, dass viele der dorsal lokalisierten Kontakte eine dauerhafte Funktion haben. Viel wahrscheinlicher ist es jedoch, dass die Interneurone der intermediären Laminae eine wichtige Rolle bei der funktionellen Kompensation spielen (Maxwell *et al.*, 1985, Krames und Foreman, 2007, Condes-Lara *et al.*, 2018, Cliffer und Giesler, 1989, de Pommery *et al.*, 1984). In der Literatur werden die postsynaptischen Hinterstrangbahnen auch der viszeralen Schmerzempfindung zugeordnet, hier kann unter Umständen eine Intensivierung der neuronalen Signalwege zu einem diffusen Schmerzbild führen (Willis *et al.*, 1999) oder als Ursache für die verstärkte neuropathische Schmerzwahrnehmung im Sinne des Phantomschmerzes angenommen werden (Siddall und McClelland, 1999).

Für die Differenzierung und weitere funktionelle Einordnung dieser Fasertrakte sind jedoch noch weitere Untersuchungen, wie beispielsweise die weitere Charakterisierung der Interneurone anhand ihrer Neurotransmitter nötig. In Abb. 4.24 ist bereits ein initiales Experiment dargestellt, bei dem sich zumindest teilweise eine Übereinstimmung zum *Nucleus cuneatus* projizierenden Neuronenpopulationen und den transgen markierten glyzinerger Interneuronen zeigt.

In Zusammenschau der Ergebnisse lässt sich nun postulieren, dass es unter Verletzung der Hinterstrangbahnen zu einer Zunahme der axonalen Kontakte zu den kaudal der Läsion gelegenen Interneuronen kommt. Bei Letzteren handelt es sich am wahrscheinlichsten um Relaisstationen der postsynaptischen Hinterstrangbahnen. Die Neurone stehen somit unabhängig von der Läsion des *Tractus cuneatus* weiterhin mit dem *Nucleus cuneatus* indirekt im Kontakt.

Im motorischen System entstehen beispielsweise in Form von LPSN ähnliche Relaisstationen, welche Teile der Funktionen der motorischen Bahnen übernehmen können und somit zur Regeneration nach Verletzungen beitragen (Bareyre *et al.*, 2004, Goldstein *et al.*, 1997, Flynn *et al.*, 2011, Courtine *et al.*, 2008, van den Brand *et al.*, 2012). Mit dieser Arbeit konnte daher nun das Bild der intrinsischen Reparaturmechanismen durch die Darstellung der plastischen Reorganisation axonaler Verbindungen im sensomotorischen System nach Läsion der Hinterstrangbahnen ergänzt werden. Neben dem Hinweis auf eine Plastizität innerhalb der Hinterstrangbahnen ergab sich zudem der Anhalt, dass

die Ausbildung von Umgehungskreisläufen nach inkompletten Rückenmarksverletzung nicht auf das motorische System begrenzt ist und diese Umgehungswege einen wichtigen Beitrag zur funktionellen Erholung nach inkompletter spinaler Läsion leisten. Um dies jedoch genauer zu charakterisieren, sind Folgestudien, insbesondere auch mit funktionellen Testungen, erforderlich.

5.5 Relevanz der Ergebnisse für die Entwicklung von Therapien

Die Therapie der Rückenmarksverletzungen stellt eine klinische Herausforderung dar. Aktuelle klinische Studien zeigten unterschiedliche Therapieansätze, welche jedoch bislang keine komplette Erholung nach Verletzungen ermöglichen konnten (Ahuja *et al.*, 2017). Hierzu zählen Strategien der Neuroprotektion, beispielsweise mit Minocyclin (Wells *et al.*, 2003, Lee *et al.*, 2003), Neuromodulation, etwa mit spinalen Stimulatoren (Harkema *et al.*, 2011) und die Transplantation von Stammzellen (Ahuja und Fehlings, 2016, Ahuja *et al.*, 2017). Diese Arbeit bezieht sich auf das Konzept der axonalen Reorganisation. Nachdem das intrinsische System der plastischen Reorganisation immer besser verstanden wird, gibt es verschiedene Ansätze zur Stärkung der axonalen Reorganisation als Kompensationsmechanismus. Grundsätzlich kann hier die Rehabilitation von medikamentösen Ansätzen zur Steigerung des Wachstums unterschieden werden (Cote *et al.*, 2017).

Aktuell befinden sich zwei vielversprechende Präparate in klinischer Testung: Cethrin (UIndreaj *et al.*, 2017), eine rekombinante Version des Bakterientoxins VX-210, ist in der Lage den RHOA-Pathway herabzuregulieren. Dieser Signalweg spielt eine wesentliche Rolle in der Inhibition des axonalen Wachstums (Dergham *et al.*, 2002). In einer Vorstudie zeigte sich bereits im Tiermodell eine Zunahme der axonalen Regeneration anhand der Verbesserung in Verhaltensexperimenten (Kwon *et al.*, 2010). Auch im Rahmen einer klinischen Phase I/IIa Studie konnte bereits eine Verbesserung des ASIA-Scores nach 12 Monaten im Vergleich zur Kontrollgruppe gezeigt werden (Ahuja *et al.*, 2017, Fehlings *et al.*, 2011).

Bei dem zweiten Präparat handelt es sich um Anti Nogo-A-Antikörper. Auch hier konnten neben den präklinischen Studien bereits vielversprechende Ergebnisse

im Rahmen einer klinischen Phase I Studie gezeigt werden. (Freund *et al.*, 2007, Zorner und Schwab, 2010, Ahuja *et al.*, 2017).

Um Zielstrukturen für medikamentöse Therapieansätze zu finden, die einen Einfluss auf die Ausbildung von neuen neuronalen Netzwerken haben, müssen auch die molekularen Mechanismen, beispielsweise für die Ausbildung von Synapsen, verstanden werden. Während die Ausbildung von Synapsen in der Embryonalentwicklung näher untersucht wurde, (Sanes und Lichtman, 2001, Williams *et al.*, 2010) ist es weiterhin unklar, ob dieselben Mechanismen auch für die Neuroplastizität nach Abschluss der Entwicklung gelten (Jacobi *et al.*, 2015). Einzelnen Wachstumsfaktoren, wie der Fibroblasten Wachstumsfaktor 22 (FGF-22), konnten jedoch bereits regulative Einflüsse auf die Synaptogenese in Umgehungskreisläufen nach Rückenmarksverletzungen nachgewiesen werden (Jacobi *et al.*, 2015). Ob diese Mechanismen auf das motorische System beschränkt sind, oder ob sie auch eine Rolle bei der Ausbildung von sensiblen Umgehungskreisläufen haben, ist bislang unzureichend erforscht.

Neben der Suche nach medikamentösen *Targets* spielt auch die Rehabilitation nach iSCI eine mögliche fördernde Rolle für die axonale Reorganisation (Ahuja und Fehlings, 2016, Cote *et al.*, 2017, Loy *et al.*, 2018, Loy und Bareyre, 2019). Unsere Arbeitsgruppe konnte in diesem Zusammenhang mittels Mausmodell zeigen, dass durch eine Beübung im Laufrad die Ausbildung von Kontakten zwischen serotonergen Axonen und cholinergen Motorneuronen verstärkt wird (Loy *et al.*, 2018, Loy und Bareyre, 2019).

Eine große Herausforderung für die Entwicklung von therapeutischen Strategien ist die Translation in den Menschen. Viele Therapieansätze, die im Tiermodell vielversprechend waren, konnten bis dato auf Grund von Nebenwirkungen nicht in das humane System übertragen werden. Insbesondere bei der Verstärkung von Wachstum durch Wachstumsfaktoren muss die mögliche Entstehung von Neoplasien berücksichtigt werden. (Ahuja und Fehlings, 2016, Cote *et al.*, 2017, Loy *et al.*, 2018). Ob zudem ein Transfer der Ergebnisse im Bereich der motorischen Fasertrakte auf die Reorganisation der Hinterstrangbahn möglich ist, bleibt ungeklärt. Hierbei sollte jedoch berücksichtigt werden, dass auch neuropathische Schmerzsyndrome intensiviert werden können.

5.6 Abschließende Bemerkungen und Ausblick

Verletzungen des Rückenmarks sind weltweit eine häufige Ursache von hochgradigen Querschnittssyndromen. Ein großer Teil der Verletzungen ist inkomplett, jedoch kommt es auch hierbei zu einer unvollständigen Regeneration mit bleibenden neurologischen Defiziten. Bestehende Therapieansätze zeigen bis heute keinen durchschlagenden Erfolg, sodass alternative Therapiekonzepte erforscht werden. Die Kenntnis der anatomischen Gegebenheiten und der spinalen Plastizität spielt eine wichtige Rolle, um neuroregenerative Therapieansätze entwickeln zu können. Diesbezüglich wurden primär die motorischen Systeme untersucht. Die Rolle der Reorganisation in den somatosensiblen Bahnen für die funktionelle Erholung nach Rückenmarksverletzungen blieb jedoch bislang weitestgehend unerforscht und bildet deshalb den Schwerpunkt dieser Arbeit. Konkret wurde die Reorganisation der somatosensiblen Traktsysteme nach Rückenmarksverletzungen im murinen Modell näher untersucht.

Zunächst konnte gezeigt werden, dass die Projektionen der DRG-Axone im Wesentlichen in den dorsalen und intermediären Laminae des Rückenmarks enden und somit wahrscheinlich nozizeptive und mechanozeptive Funktionen haben.

Zur weiteren Charakterisierung der kontaktierten Interneurone wurde eine Injektionsmethode entwickelt, die eine zielgenaue Infiltration des *Nucleus cuneatus* in der Maus ermöglicht. Mit Hilfe dieser Methode und einem modifizierten Rabiesvirus konnten schließlich Populationen von Interneuronen im zervikalen Rückenmark mit direktem Kontakt zum *Nucleus cuneatus* dargestellt und deren Interaktionen mit den aussprossenden DRG Kollateralen festgehalten werden. Zusammenfassend kann auf Basis dieser Ergebnisse von einer Komplettierung des entstandenen Umgehungskreislaufes auf spinaler Ebene ausgegangen werden, die eine Überbrückung von verletzten Faserbahn ermöglicht. In weiteren Versuchen mit transgenen Tieren und fluoreszent markierten inhibitorischen Neuronen ergaben sich bereits erste Hinweise, dass die Interneurone teilweise glyzinerge Synapsen besitzen.

Aufbauend auf den Ergebnissen dieser Studie wurden in weiteren Experimenten die Interneurone insbesondere hinsichtlich der Neurotransmitter immunhistochemisch untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass ein signifikanter Anteil

der kontaktierten, primär exzitatorisch fungierenden Interneuronen auch inhibitorische Neurotransmitter exprimierten. Hierunter fand sich insbesondere die Expression von Parvalbumin, einem für die propriozeptiven Neurone bekannten Neurotransmitter (Shortland und Mahns, 2016). Dies könnte ein Hinweis für eine Strategie einer funktionellen Wiederherstellung sein, indem explizit Kontakt zu den Neuronen hergestellt wird, die propriozeptive Informationen auch verarbeiten können. In zusätzlichen Verhaltensexperimenten konnte gezeigt werden, dass sich die Propriozeption von Mäusen nach einer einseitigen Hinterstrang-Läsion verschlechterte. Auch diese Ergebnisse können auf eine Form der spinalen Plastizität hindeuten.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass auch im sensiblen System eine Plastizität auf spinaler Ebene nach Verletzungen des Rückenmarks existiert. DRG-Axone kontaktieren spinale Interneurone, die wiederum im Kontakt mit übergeordneten Neuronen des *Nucleus cuneatus* stehen. Hieraus ergeben sich potenzielle Therapieansätze zur Förderung der axonalen Reorganisation, welche nicht nur in den motorischen, sondern auch in den somatosensiblen Traktsystemen nach Rückenmarksverletzungen stattfindet.

6 Literaturverzeichnis

- AHUJA, C. S. & FEHLINGS, M. 2016. Concise Review: Bridging the Gap: Novel Neuroregenerative and Neuroprotective Strategies in Spinal Cord Injury. *Stem Cells Transl Med*, 5, 914-24.
- AHUJA, C. S., WILSON, J. R., NORI, S., KOTTER, M. R. N., DRUSCHEL, C., CURT, A. & FEHLINGS, M. G. 2017. Traumatic spinal cord injury. *Nat Rev Dis Primers*, 3, 17018.
- AL-CHAER, E. D., FENG, Y. & WILLIS, W. D. 1999. Comparative study of viscerosomatic input onto postsynaptic dorsal column and spinothalamic tract neurons in the primate. *J Neurophysiol*, 82, 1876-82.
- ALIZADEH, A., DYCK, S. M. & KARIMI-ABDOLREZAEI, S. 2019. Traumatic Spinal Cord Injury: An Overview of Pathophysiology, Models and Acute Injury Mechanisms. *Front Neurol*, 10, 282.
- ALSTERMARK, B., LUNDBERG, A., PETTERSSON, L. G., TANTISIRA, B. & WALKOWSKA, M. 1987. Motor recovery after serial spinal cord lesions of defined descending pathways in cats. *Neurosci Res*, 5, 68-73.
- AMERICAN COLLEGE OF SURGEONS, C. O. T. 2018. *ATLS advanced trauma life support : student course manual*, Chicago, American College of Surgeons.
- BÄHR, M. & FROTSCHER, M. 2009. *Neurologisch-topische Diagnostik Anatomie-Funktion-Klinik*, Stuttgart, Thieme.
- BARBARESI, P. & MENSA, E. 2016. Connections from the rat dorsal column nuclei (DCN) to the periaqueductal gray matter (PAG). *Neurosci Res*, 109, 35-47.
- BAREYRE, F. M. 2008. Neuronal repair and replacement in spinal cord injury. *J Neurol Sci*, 265, 63-72.
- BAREYRE, F. M., GARZORZ, N., LANG, C., MISGELD, T., BUNING, H. & KERSCHENSTEINER, M. 2011. In vivo imaging reveals a phase-specific role of STAT3 during central and peripheral nervous system axon regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108, 6282-7.
- BAREYRE, F. M., KERSCHENSTEINER, M., MISGELD, T. & SANES, J. R. 2005. Transgenic labeling of the corticospinal tract for monitoring axonal responses to spinal cord injury. *Nat Med*, 11, 1355-60.
- BAREYRE, F. M., KERSCHENSTEINER, M., RAINETEAU, O., METTENLEITER, T. C., WEINMANN, O. & SCHWAB, M. E. 2004. The injured spinal cord spontaneously forms a new intraspinal circuit in adult rats. *Nat Neurosci*, 7, 269-77.

- BECK, K. D., NGUYEN, H. X., GALVAN, M. D., SALAZAR, D. L., WOODRUFF, T. M. & ANDERSON, A. J. 2010. Quantitative analysis of cellular inflammation after traumatic spinal cord injury: evidence for a multiphasic inflammatory response in the acute to chronic environment. *Brain*, 133, 433-47.
- BELLVER-LANDETE, V., BRETHEAU, F., MAILHOT, B., VALLIERES, N., LESSARD, M., JANELLE, M. E., VERNOUX, N., TREMBLAY, M. E., FUEHRMANN, T., SHOICHET, M. S. & LACROIX, S. 2019. Microglia are an essential component of the neuroprotective scar that forms after spinal cord injury. *Nat Commun*, 10, 518.
- BENNETT, G. J., NISHIKAWA, N., LU, G. W., HOFFERT, M. J. & DUBNER, R. 1984. The morphology of dorsal column postsynaptic spinomedullary neurons in the cat. *J Comp Neurol*, 224, 568-78.
- BLESCH, A. & TUSZYNSKI, M. H. 2009. Spinal cord injury: plasticity, regeneration and the challenge of translational drug development. *Trends Neurosci*, 32, 41-7.
- BLIGHT, A. R. 2004. Just one word: plasticity. *Nat Neurosci*, 7, 206-8.
- BROWN, A. R. & MARTINEZ, M. 2019. From cortex to cord: motor circuit plasticity after spinal cord injury. *Neural Regen Res*, 14, 2054-2062.
- BUNGE, R. P., PUCKETT, W. R. & HIESTER, E. D. 1997. Observations on the pathology of several types of human spinal cord injury, with emphasis on the astrocyte response to penetrating injuries. *Adv Neurol*, 72, 305-15.
- BURNS, S. P., GOLDING, D. G., ROLLE, W. A., JR., GRAZIANI, V. & DITUNNO, J. F., JR. 1997. Recovery of ambulation in motor-incomplete tetraplegia. *Arch Phys Med Rehabil*, 78, 1169-72.
- BUTT, A. M., PAPANIKOLAOU, M. & RIVERA, A. 2019. Physiology of Oligodendroglia. *Adv Exp Med Biol*, 1175, 117-128.
- CADOTTE, D. W., BOSMA, R., MIKULIS, D., NUGAEVA, N., SMITH, K., POKRUPA, R., ISLAM, O., STROMAN, P. W. & FEHLINGS, M. G. 2012. Plasticity of the injured human spinal cord: insights revealed by spinal cord functional MRI. *PLoS One*, 7, e45560.
- CARONI, P. & SCHWAB, M. E. 1988. Antibody against myelin-associated inhibitor of neurite growth neutralizes nonpermissive substrate properties of CNS white matter. *Neuron*, 1, 85-96.
- CASPARY, T. & ANDERSON, K. V. 2003. Patterning cell types in the dorsal spinal cord: what the mouse mutants say. *Nat Rev Neurosci*, 4, 289-97.
- CHAMBERLIN, N. L., DU, B., DE LACALLE, S. & SAPER, C. B. 1998. Recombinant adeno-associated virus vector: use for transgene expression and anterograde tract tracing in the CNS. *Brain Res*, 793, 169-75.

- CHEN, K., MARSH, B. C., COWAN, M., AL'JOBOORI, Y. D., GIGOUT, S., SMITH, C. C., MESSENGER, N., GAMPER, N., SCHWAB, M. E. & ICHIYAMA, R. M. 2017. Sequential therapy of anti-Nogo-A antibody treatment and treadmill training leads to cumulative improvements after spinal cord injury in rats. *Exp Neurol*, 292, 135-144.
- CHEN, Y., HE, Y. & DEVIVO, M. J. 2016. Changing Demographics and Injury Profile of New Traumatic Spinal Cord Injuries in the United States, 1972-2014. *Arch Phys Med Rehabil*, 97, 1610-9.
- CHOO, A. M., LIU, J., LAM, C. K., DVORAK, M., TETZLAFF, W. & OXLAND, T. R. 2007. Contusion, dislocation, and distraction: primary hemorrhage and membrane permeability in distinct mechanisms of spinal cord injury. *J Neurosurg Spine*, 6, 255-66.
- CLIFFER, K. D. & GIESLER, G. J., JR. 1989. Postsynaptic dorsal column pathway of the rat. III. Distribution of ascending afferent fibers. *J Neurosci*, 9, 3146-68.
- CLIFFER, K. D. & WILLIS, W. D. 1994. Distribution of the postsynaptic dorsal column projection in the cuneate nucleus of monkeys. *J Comp Neurol*, 345, 84-93.
- CONDES-LARA, M., MARTINEZ-LORENZANA, G., ROJAS-PILONI, G., TELLO-GARCIA, I. A., MANZANO-GARCIA, A., RUBIO-BELTRAN, E. & GONZALEZ-HERNANDEZ, A. 2018. Axons of Individual Dorsal Horn Neurons Bifurcated to Project in Both the Anterolateral and the Postsynaptic Dorsal Column Systems. *Neuroscience*, 371, 178-190.
- CONFORTI, L., GILLEY, J. & COLEMAN, M. P. 2014. Wallerian degeneration: an emerging axon death pathway linking injury and disease. *Nat Rev Neurosci*, 15, 394-409.
- COTE, M. P., MURRAY, M. & LEMAY, M. A. 2017. Rehabilitation Strategies after Spinal Cord Injury: Inquiry into the Mechanisms of Success and Failure. *J Neurotrauma*, 34, 1841-1857.
- COURTINE, G., GERASIMENKO, Y., VAN DEN BRAND, R., YEW, A., MUSIENKO, P., ZHONG, H., SONG, B., AO, Y., ICHIYAMA, R. M., LAVROV, I., ROY, R. R., SOFRONIEW, M. V. & EDGERTON, V. R. 2009. Transformation of nonfunctional spinal circuits into functional states after the loss of brain input. *Nat Neurosci*, 12, 1333-42.
- COURTINE, G., SONG, B., ROY, R. R., ZHONG, H., HERRMANN, J. E., AO, Y., QI, J., EDGERTON, V. R. & SOFRONIEW, M. V. 2008. Recovery of supraspinal control of stepping via indirect propriospinal relay connections after spinal cord injury. *Nat Med*, 14, 69-74.
- CREGG, J. M., DEPAUL, M. A., FILOUS, A. R., LANG, B. T., TRAN, A. & SILVER, J. 2014. Functional regeneration beyond the glial scar. *Exp Neurol*, 253, 197-207.

- CRIPPS, R. A., LEE, B. B., WING, P., WEERTS, E., MACKAY, J. & BROWN, D. 2011. A global map for traumatic spinal cord injury epidemiology: towards a living data repository for injury prevention. *Spinal Cord*, 49, 493-501.
- DE POMMERY, J., ROUDIER, F. & MENETREY, D. 1984. Postsynaptic fibers reaching the dorsal column nuclei in the rat. *Neurosci Lett*, 50, 319-23.
- DERGHAM, P., ELLEZAM, B., ESSAGIAN, C., AVEDISSIAN, H., LUBELL, W. D. & MCKERRACHER, L. 2002. Rho signaling pathway targeted to promote spinal cord repair. *J Neurosci*, 22, 6570-7.
- DESHPANDE, A. 2012. *Unravelling the presynaptic connectome of adult-generated neurons: Rabies virus-mediated tracing of monosynaptic connections onto newborn neurons*. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München.
- DEUTSCHE GESELLSCHAFT FÜR ORTHOPÄDIE UND ORTHOPÄDISCHE CHIRURGIE + BERUFSVERBAND DER ÄRZTE FÜR ORTHOPÄDIE. 2002. *Querschnittlähmung* [Online]. Köln: Deutscher Ärzte-Verlag. URL: <http://www.leitliniensekretariat.de/files/MyLayout/pdf/querschnittlaehmung.pdf> [Zitiert am 14.07.2018].
- DEVIVO, M. J. 2012. Epidemiology of traumatic spinal cord injury: trends and future implications. *Spinal Cord*, 50, 365-72.
- ENEVOLDSON, T. P. & GORDON, G. 1989. Postsynaptic dorsal column neurons in the cat: a study with retrograde transport of horseradish peroxidase. *Exp Brain Res*, 75, 611-20.
- FAULKNER, J. R., HERRMANN, J. E., WOO, M. J., TANSEY, K. E., DOAN, N. B. & SOFRONIEW, M. V. 2004. Reactive astrocytes protect tissue and preserve function after spinal cord injury. *J Neurosci*, 24, 2143-55.
- FEHLINGS, M. G., THEODORE, N., HARROP, J., MAURIS, G., KUNTZ, C., SHAFFREY, C. I., KWON, B. K., CHAPMAN, J., YEE, A., TIGHE, A. & MCKERRACHER, L. 2011. A phase I/IIa clinical trial of a recombinant Rho protein antagonist in acute spinal cord injury. *J Neurotrauma*, 28, 787-96.
- FIGLEY, S. A., KHOSRAVI, R., LEGASTO, J. M., TSENG, Y. F. & FEHLINGS, M. G. 2014. Characterization of vascular disruption and blood-spinal cord barrier permeability following traumatic spinal cord injury. *J Neurotrauma*, 31, 541-52.
- FILBIN, M. T. 2003. Myelin-associated inhibitors of axonal regeneration in the adult mammalian CNS. *Nat Rev Neurosci*, 4, 703-13.
- FILLI, L., ENGMANN, A. K., ZORNER, B., WEINMANN, O., MORAITIS, T., GULLO, M., KASPER, H., SCHNEIDER, R. & SCHWAB, M. E. 2014. Bridging the gap: a reticulo-propriospinal detour bypassing an incomplete spinal cord injury. *J Neurosci*, 34, 13399-410.

- FLYNN, J. R., GRAHAM, B. A., GALEA, M. P. & CALLISTER, R. J. 2011. The role of propriospinal interneurons in recovery from spinal cord injury. *Neuropharmacology*, 60, 809-22.
- FOUAD, K., PEDERSEN, V., SCHWAB, M. E. & BROSAMLE, C. 2001. Cervical sprouting of corticospinal fibers after thoracic spinal cord injury accompanies shifts in evoked motor responses. *Curr Biol*, 11, 1766-70.
- FRANKEL, H. L., HANCOCK, D. O., HYSLOP, G., MELZAK, J., MICHAELIS, L. S., UNGAR, G. H., VERNON, J. D. & WALSH, J. J. 1969. The value of postural reduction in the initial management of closed injuries of the spine with paraplegia and tetraplegia. I. *Paraplegia*, 7, 179-92.
- FREUND, P., WANNIER, T., SCHMIDLIN, E., BLOCH, J., MIR, A., SCHWAB, M. E. & ROUILLER, E. M. 2007. Anti-Nogo-A antibody treatment enhances sprouting of corticospinal axons rostral to a unilateral cervical spinal cord lesion in adult macaque monkey. *J Comp Neurol*, 502, 644-59.
- GARCIA-ALIAS, G., TRUONG, K., SHAH, P. K., ROY, R. R. & EDGERTON, V. R. 2015. Plasticity of subcortical pathways promote recovery of skilled hand function in rats after corticospinal and rubrospinal tract injuries. *Exp Neurol*, 266, 112-9.
- GIESLER, G. J., JR. & CLIFFER, K. D. 1985. Postsynaptic dorsal column pathway of the rat. II. Evidence against an important role in nociception. *Brain Res*, 326, 347-56.
- GIESLER, G. J., JR., NAHIN, R. L. & MADSEN, A. M. 1984. Postsynaptic dorsal column pathway of the rat. I. Anatomical studies. *J Neurophysiol*, 51, 260-75.
- GIESLER, R. H. 1984. How to plan and implement a downtown convenience medical care center. *Hosp Top*, 62, 20-1.
- GODEMENT, P., VANSELOW, J., THANOS, S. & BONHOEFFER, F. 1987. A study in developing visual systems with a new method of staining neurones and their processes in fixed tissue. *Development*, 101, 697-713.
- GOLDSTEIN, B., LITTLE, J. W. & HARRIS, R. M. 1997. Axonal sprouting following incomplete spinal cord injury: an experimental model. *J Spinal Cord Med*, 20, 200-6.
- HADLEY, M. N., WALTERS, B. C., GRABB, P. A., OYESIKU, N. M., PRZYBYLSKI, G. J., RESNICK, D. K. & RYKEN, T. C. 2002. Cervical spine immobilization before admission to the hospital. *Neurosurgery*, 50, S7-17.
- HAGENDORF, N. & CONZELMANN, K. K. 2015. Recombinant Fluorescent Rabies Virus Vectors for Tracing Neurons and Synaptic Connections. *Cold Spring Harb Protoc*, 2015, pdb top089391.

- HALBERSTADT, A. L. & BALABAN, C. D. 2007. Selective anterograde tracing of the individual serotonergic and nonserotonergic components of the dorsal raphe nucleus projection to the vestibular nuclei. *Neuroscience*, 147, 207-23.
- HALDER, P., KAMBI, N., CHAND, P. & JAIN, N. 2018. Altered Expression of Reorganized Inputs as They Ascend From the Cuneate Nucleus to Cortical Area 3b in Monkeys With Long-Term Spinal Cord Injuries. *Cereb Cortex*, 28, 3922-3938.
- HANSEBOUT, R. R. K., E. 2018. *Acute traumatic spinal cord injury* [Online]. Waltham, MA: UpToDate. URL: <https://www.uptodate.com/contents/acute-traumatic-spinal-cord-injury> Abgerufen am 18.09.2018.
- HARKEMA, S., GERASIMENKO, Y., HODES, J., BURDICK, J., ANGELI, C., CHEN, Y., FERREIRA, C., WILLHITE, A., REJC, E., GROSSMAN, R. G. & EDGERTON, V. R. 2011. Effect of epidural stimulation of the lumbosacral spinal cord on voluntary movement, standing, and assisted stepping after motor complete paraplegia: a case study. *Lancet*, 377, 1938-47.
- HASLER, R. M., EXADAKTYLOS, A. K., BOUAMRA, O., BENNEKER, L. M., CLANCY, M., SIEBER, R., ZIMMERMANN, H. & LECKY, F. 2012. Epidemiology and predictors of cervical spine injury in adult major trauma patients: a multicenter cohort study. *J Trauma Acute Care Surg*, 72, 975-81.
- HAUSMANN, O. N. 2003. Post-traumatic inflammation following spinal cord injury. *Spinal Cord*, 41, 369-78.
- HILL, C. E., BEATTIE, M. S. & BRESNAHAN, J. C. 2001. Degeneration and sprouting of identified descending supraspinal axons after contusive spinal cord injury in the rat. *Exp Neurol*, 171, 153-69.
- HINTIRYAN, H., FOSTER, N. N., BOWMAN, I., BAY, M., SONG, M. Y., GOU, L., YAMASHITA, S., BIENKOWSKI, M. S., ZINGG, B., ZHU, M., YANG, X. W., SHIH, J. C., TOGA, A. W. & DONG, H. W. 2016. The mouse cortico-striatal projectome. *Nat Neurosci*, 19, 1100-14.
- HOLMQVIST, B. I., OSTHOLM, T. & EKSTROM, P. 1992. Dil tracing in combination with immunocytochemistry for analysis of connectivities and chemoarchitectonics of specific neural systems in a teleost, the Atlantic salmon. *J Neurosci Methods*, 42, 45-63.
- HUH, Y., OH, M. S., LEBLANC, P. & KIM, K. S. 2010. Gene transfer in the nervous system and implications for transsynaptic neuronal tracing. *Expert Opin Biol Ther*, 10, 763-72.
- JACOBI, A., LOY, K., SCHMALZ, A. M., HELLSTEN, M., UMEMORI, H., KERSCHENSTEINER, M. & BAREYRE, F. M. 2015. FGF22 signaling regulates synapse formation during post-injury remodeling of the spinal cord. *EMBO J*, 34, 1231-43.

- JAIN, N., CATANIA, K. C. & KAAS, J. H. 1997. Deactivation and reactivation of somatosensory cortex after dorsal spinal cord injury. *Nature*, 386, 495-8.
- JAIN, N., QI, H. X., COLLINS, C. E. & KAAS, J. H. 2008. Large-scale reorganization in the somatosensory cortex and thalamus after sensory loss in macaque monkeys. *J Neurosci*, 28, 11042-60.
- JANKOWSKA, E., RASTAD, J. & ZARZECKI, P. 1979. Segmental and supraspinal input to cells of origin of non-primary fibres in the feline dorsal columns. *J Physiol*, 290, 185-200.
- KAMBI, N., HALDER, P., RAJAN, R., ARORA, V., CHAND, P., ARORA, M. & JAIN, N. 2014. Large-scale reorganization of the somatosensory cortex following spinal cord injuries is due to brainstem plasticity. *Nat Commun*, 5, 3602.
- KERSCHENSTEINER, M., BAREYRE, F. M., BUDDEBERG, B. S., MERKLER, D., STADELMANN, C., BRUCK, W., MISGELD, T. & SCHWAB, M. E. 2004. Remodeling of axonal connections contributes to recovery in an animal model of multiple sclerosis. *J Exp Med*, 200, 1027-38.
- KRAMES, E. S. & FOREMAN, R. 2007. Spinal Cord Stimulation Modulates Visceral Nociception and Hyperalgesia via the Spinothalamic Tracts and the Postsynaptic Dorsal Column Pathways: A Literature Review and Hypothesis. *Neuromodulation*, 10, 224-37.
- KUCHER, K., JOHNS, D., MAIER, D., ABEL, R., BADKE, A., BARON, H., THIETJE, R., CASHA, S., MEINDL, R., GOMEZ-MANCILLA, B., PFISTER, C., RUPP, R., WEIDNER, N., MIR, A., SCHWAB, M. E. & CURT, A. 2018. First-in-Man Intrathecal Application of Neurite Growth-Promoting Anti-Nogo-A Antibodies in Acute Spinal Cord Injury. *Neurorehabil Neural Repair*, 32, 578-589.
- KUYPERS, H. G. & UGOLINI, G. 1990. Viruses as transneuronal tracers. *Trends Neurosci*, 13, 71-5.
- KWON, B. K., SEKHON, L. H. & FEHLINGS, M. G. 2010. Emerging repair, regeneration, and translational research advances for spinal cord injury. *Spine (Phila Pa 1976)*, 35, S263-70.
- KWON, B. K., TETZLAFF, W., GRAUER, J. N., BEINER, J. & VACCARO, A. R. 2004. Pathophysiology and pharmacologic treatment of acute spinal cord injury. *Spine J*, 4, 451-64.
- LAMBERT, T. 2018. tlambert03/FPbase. URL: https://zenodo.org/record/1316956#.XcQW_i1oS8o
Abgerufen am am 18.09.2018.
- LANG, C., GUO, X., KERSCHENSTEINER, M. & BAREYRE, F. M. 2012. Single collateral reconstructions reveal distinct phases of corticospinal remodeling after spinal cord injury. *PLoS One*, 7, e30461.
- LAVAIL, J. H. 1975. The retrograde transport method. *Fed Proc*, 34, 1618-24.

- LAWRENCE, D. G. & KUYPERS, H. G. 1968a. The functional organization of the motor system in the monkey. I. The effects of bilateral pyramidal lesions. *Brain*, 91, 1-14.
- LAWRENCE, D. G. & KUYPERS, H. G. 1968b. The functional organization of the motor system in the monkey. II. The effects of lesions of the descending brain-stem pathways. *Brain*, 91, 15-36.
- LEE, S. M., YUNE, T. Y., KIM, S. J., PARK, D. W., LEE, Y. K., KIM, Y. C., OH, Y. J., MARKELONIS, G. J. & OH, T. H. 2003. Minocycline reduces cell death and improves functional recovery after traumatic spinal cord injury in the rat. *J Neurotrauma*, 20, 1017-27.
- LI, S., MEALING, G. A., MORLEY, P. & STYS, P. K. 1999. Novel injury mechanism in anoxia and trauma of spinal cord white matter: glutamate release via reverse Na⁺-dependent glutamate transport. *J Neurosci*, 19, RC16.
- LI, S. & STYS, P. K. 2000. Mechanisms of ionotropic glutamate receptor-mediated excitotoxicity in isolated spinal cord white matter. *J Neurosci*, 20, 1190-8.
- LIAO, C. C., DICARLO, G. E., GHARBAWIE, O. A., QI, H. X. & KAAS, J. H. 2015. Spinal cord neuron inputs to the cuneate nucleus that partially survive dorsal column lesions: A pathway that could contribute to recovery after spinal cord injury. *J Comp Neurol*, 523, 2138-60.
- LIAO, C. C., REED, J. L., QI, H. X., SAWYER, E. K. & KAAS, J. H. 2018. Second-order spinal cord pathway contributes to cortical responses after long recoveries from dorsal column injury in squirrel monkeys. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 115, 4258-4263.
- LITTLE, J. W., DITUNNO, J. F., JR., STIENS, S. A. & HARRIS, R. M. 1999. Incomplete spinal cord injury: neuronal mechanisms of motor recovery and hyperreflexia. *Arch Phys Med Rehabil*, 80, 587-99.
- LOY, K. & BAREYRE, F. M. 2019. Rehabilitation following spinal cord injury: how animal models can help our understanding of exercise-induced neuroplasticity. *Neural Regen Res*, 14, 405-412.
- LOY, K., SCHMALZ, A., HOCHÉ, T., JACOBI, A., KREUTZFELDT, M., MERKLER, D. & BAREYRE, F. M. 2018. Enhanced Voluntary Exercise Improves Functional Recovery following Spinal Cord Injury by Impacting the Local Neuroglial Injury Response and Supporting the Rewiring of Supraspinal Circuits. *J Neurotrauma*, 35, 2904-2915.
- MARMIGERE, F. & ERNFORS, P. 2007. Specification and connectivity of neuronal subtypes in the sensory lineage. *Nat Rev Neurosci*, 8, 114-27.
- MAXWELL, D. J., KOERBER, H. R. & BANNATYNE, B. A. 1985. Light and electron microscopy of contacts between primary afferent fibres and neurones with axons ascending the dorsal columns of the feline spinal cord. *Neuroscience*, 16, 375-94.

- MCKENNA, J. E. & WHISHAW, I. Q. 1999. Complete compensation in skilled reaching success with associated impairments in limb synergies, after dorsal column lesion in the rat. *J Neurosci*, 19, 1885-94.
- MIRNICS, K. & KOERBER, H. R. 1995. Prenatal development of rat primary afferent fibers: II. Central projections. *J Comp Neurol*, 355, 601-14.
- MOHAMMED, H. & HOLLIS, E. R., 2ND 2018. Cortical Reorganization of Sensorimotor Systems and the Role of Intracortical Circuits After Spinal Cord Injury. *Neurotherapeutics*.
- MUSIENKO, P., VAN DEN BRAND, R., MARZENDORFER, O., ROY, R. R., GERASIMENKO, Y., EDGERTON, V. R. & COURTINE, G. 2011. Controlling specific locomotor behaviors through multidimensional monoaminergic modulation of spinal circuitries. *J Neurosci*, 31, 9264-78.
- NORENBERG, M. D., SMITH, J. & MARCILLO, A. 2004. The pathology of human spinal cord injury: defining the problems. *J Neurotrauma*, 21, 429-40.
- PAXINOS, G. & FRANKLIN, K. B. J. 2001. *The mouse brain in stereotaxic coordinates*, San Diego ; London, Academic Press.
- PICOLI, C. C., COIMBRA-CAMPOS, L. M. C., GUERRA, D. A. P., SILVA, W. N., PRAZERES, P., COSTA, A. C., MAGNO, L. A. V., ROMANO-SILVA, M. A., MINTZ, A. & BIRBRAIR, A. 2019. Pericytes Act as Key Players in Spinal Cord Injury. *Am J Pathol*, 189, 1327-1337.
- PINEAU, I. & LACROIX, S. 2007. Proinflammatory cytokine synthesis in the injured mouse spinal cord: multiphasic expression pattern and identification of the cell types involved. *J Comp Neurol*, 500, 267-85.
- PIVOVAROVA, N. B. & ANDREWS, S. B. 2010. Calcium-dependent mitochondrial function and dysfunction in neurons. *FEBS J*, 277, 3622-36.
- QI, H. X., STEPNIEWSKA, I. & KAAS, J. H. 2000. Reorganization of primary motor cortex in adult macaque monkeys with long-standing amputations. *J Neurophysiol*, 84, 2133-47.
- RAINETEAU, O. & SCHWAB, M. E. 2001. Plasticity of motor systems after incomplete spinal cord injury. *Nat Rev Neurosci*, 2, 263-73.
- REINER, A., VEENMAN, C. L., MEDINA, L., JIAO, Y., DEL MAR, N. & HONIG, M. G. 2000. Pathway tracing using biotinylated dextran amines. *J Neurosci Methods*, 103, 23-37.
- RHODES, C. H., STIEBER, A. & GONATAS, N. K. 1987. Transneuronally transported wheat germ agglutinin labels glia as well as neurons in the rat visual system. *J Comp Neurol*, 261, 460-5.
- RITZ, L. A. & GREENSPAN, J. D. 1985. Morphological features of lamina V neurons receiving nociceptive input in cat sacrocaudal spinal cord. *J Comp Neurol*, 238, 440-52.

- ROBERTS, T. T., LEONARD, G. R. & CEPELA, D. J. 2017. Classifications In Brief: American Spinal Injury Association (ASIA) Impairment Scale. *Clin Orthop Relat Res*, 475, 1499-1504.
- ROJAS-VITE, G., CORONADO-LEIJA, R., NARVAEZ-DELGADO, O., RAMIREZ-MANZANARES, A., MARROQUIN, J. L., NOGUEZ-IMM, R., ARANDA, M. L., SCHERRER, B., LARRIVA-SAHD, J. & CONCHA, L. 2019. Histological validation of per-bundle water diffusion metrics within a region of fiber crossing following axonal degeneration. *Neuroimage*, 201, 116013.
- ROMANELLI, E., MERKLER, D., MEZYDLO, A., WEIL, M. T., WEBER, M. S., NIKIC, I., POTZ, S., MEINL, E., MATZNICK, F. E., KREUTZFELDT, M., GHANEM, A., CONZELMANN, K. K., METZ, I., BRUCK, W., ROUTH, M., SIMONS, M., BISHOP, D., MISGELD, T. & KERSCHENSTEINER, M. 2016. Myelinosome formation represents an early stage of oligodendrocyte damage in multiple sclerosis and its animal model. *Nat Commun*, 7, 13275.
- SALEEBA, C., DEMPSEY, B., LE, S., GOODCHILD, A. & MCMULLAN, S. 2019. A Student's Guide to Neural Circuit Tracing. *Front Neurosci*, 13, 897.
- SANES, J. R. & LICHTMAN, J. W. 2001. Induction, assembly, maturation and maintenance of a postsynaptic apparatus. *Nat Rev Neurosci*, 2, 791-805.
- SANES, J. R. & YAMAGATA, M. 1999. Formation of lamina-specific synaptic connections. *Curr Opin Neurobiol*, 9, 79-87.
- SAWCHENKO P, G., CR 1985. Plant lectins and bacterial toxins as tools for tracing neuronal connections. *Trends in Neurosciences*, 8, 378-384.
- SCHANNE, F. A., KANE, A. B., YOUNG, E. E. & FARBER, J. L. 1979. Calcium dependence of toxic cell death: a final common pathway. *Science*, 206, 700-2.
- SCHMUED, L. C. & FALLON, J. H. 1986. Fluoro-Gold: a new fluorescent retrograde axonal tracer with numerous unique properties. *Brain Res*, 377, 147-54.
- SCHNEIDER, M. P., SARTORI, A. M., INEICHEN, B. V., MOORS, S., ENGMANN, A. K., HOFER, A. S., WEINMANN, O., KESSLER, T. M. & SCHWAB, M. E. 2019. Anti-Nogo-A Antibodies As a Potential Causal Therapy for Lower Urinary Tract Dysfunction after Spinal Cord Injury. *J Neurosci*, 39, 4066-4076.
- SCHNELL, L. & SCHWAB, M. E. 1990. Axonal regeneration in the rat spinal cord produced by an antibody against myelin-associated neurite growth inhibitors. *Nature*, 343, 269-72.
- SCHNELL, M. J., MCGETTIGAN, J. P., WIRBLICH, C. & PAPANERI, A. 2010. The cell biology of rabies virus: using stealth to reach the brain. *Nat Rev Microbiol*, 8, 51-61.

- SCHWAB, M. E., JAVOY-AGID, F. & AGID, Y. 1978. Labeled wheat germ agglutinin (WGA) as a new, highly sensitive retrograde tracer in the rat brain hippocampal system. *Brain Res*, 152, 145-50.
- SEKHON, L. H. & FEHLINGS, M. G. 2001. Epidemiology, demographics, and pathophysiology of acute spinal cord injury. *Spine (Phila Pa 1976)*, 26, S2-12.
- SHORTLAND, P. J. & MAHNS, D. A. 2016. Differing roles for parvalbumin neurons after nerve injury. *Neural Regen Res*, 11, 1241-2.
- SIDDALL, P. J. & MCCLELLAND, J. 1999. Non-painful sensory phenomena after spinal cord injury. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 66, 617-22.
- SILVER, J. & MILLER, J. H. 2004. Regeneration beyond the glial scar. *Nat Rev Neurosci*, 5, 146-56.
- SPARKS, D. L., LUE, L. F., MARTIN, T. A. & ROGERS, J. 2000. Neural tract tracing using Di-I: a review and a new method to make fast Di-I faster in human brain. *J Neurosci Methods*, 103, 3-10.
- STOLL, G. & MULLER, H. W. 1999. Nerve injury, axonal degeneration and neural regeneration: basic insights. *Brain Pathol*, 9, 313-25.
- TERVO, D. G., HWANG, B. Y., VISWANATHAN, S., GAJ, T., LAVZIN, M., RITOLA, K. D., LINDO, S., MICHAEL, S., KULESHOVA, E., OJALA, D., HUANG, C. C., GERFEN, C. R., SCHILLER, J., DUDMAN, J. T., HANTMAN, A. W., LOOGER, L. L., SCHAFFER, D. V. & KARPOVA, A. Y. 2016. A Designer AAV Variant Permits Efficient Retrograde Access to Projection Neurons. *Neuron*, 92, 372-382.
- THANOS, S., VIDAL-SANZ, M. & AGUAYO, A. J. 1987. The use of rhodamine-B-isothiocyanate (RITC) as an anterograde and retrograde tracer in the adult rat visual system. *Brain Res*, 406, 317-21.
- TREPEL, M. 2012. *Neuroanatomie Struktur und Funktion*, München, Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH.
- UENO, M., HAYANO, Y., NAKAGAWA, H. & YAMASHITA, T. 2012. Intraspinal rewiring of the corticospinal tract requires target-derived brain-derived neurotrophic factor and compensates lost function after brain injury. *Brain*, 135, 1253-67.
- UGOLINI, G. 1995. Specificity of rabies virus as a transneuronal tracer of motor networks: transfer from hypoglossal motoneurons to connected second-order and higher order central nervous system cell groups. *J Comp Neurol*, 356, 457-80.
- UGOLINI, G. 2010. Advances in viral transneuronal tracing. *J Neurosci Methods*, 194, 2-20.

- ULNDREAJ, A., BADNER, A. & FEHLINGS, M. G. 2017. Promising neuroprotective strategies for traumatic spinal cord injury with a focus on the differential effects among anatomical levels of injury. *F1000Res*, 6, 1907.
- VAN DEN BRAND, R., HEUTSCHI, J., BARRAUD, Q., DIGIOVANNA, J., BARTHOLDI, K., HUERLIMANN, M., FRIEDLI, L., VOLLENWEIDER, I., MORAUD, E. M., DUIS, S., DOMINICI, N., MICERA, S., MUSIENKO, P. & COURTINE, G. 2012. Restoring voluntary control of locomotion after paralyzing spinal cord injury. *Science*, 336, 1182-5.
- VERFASSER, O. 2014. Spinal cord injury facts and figures at a glance. *J Spinal Cord Med*, 37, 117-8.
- WANG, Y., WU, W., WU, X., SUN, Y., ZHANG, Y. P., DENG, L. X., WALKER, M. J., QU, W., CHEN, C., LIU, N. K., HAN, Q., DAI, H., SHIELDS, L. B., SHIELDS, C. B., SENGLAUB, D. R., JONES, K. J., SMITH, G. M. & XU, X. M. 2018. Remodeling of lumbar motor circuitry remote to a thoracic spinal cord injury promotes locomotor recovery. *Elife*, 7.
- WARRELL, M. J. & WARRELL, D. A. 2004. Rabies and other lyssavirus diseases. *Lancet*, 363, 959-69.
- WATERS, R. L., ADKINS, R. H. & YAKURA, J. S. 1991. Definition of complete spinal cord injury. *Paraplegia*, 29, 573-81.
- WATERS, R. L., SIE, I., ADKINS, R. H. & YAKURA, J. S. 1995. Injury pattern effect on motor recovery after traumatic spinal cord injury. *Arch Phys Med Rehabil*, 76, 440-3.
- WATSON, C., CHRISTOPHER & DANA REEVE, F. 2009. *The Spinal cord : a Christopher and Dana Reeve Foundation text and atlas*, London, Academic.
- WEIDNER, N., NER, A., SALIMI, N. & TUSZYNSKI, M. H. 2001. Spontaneous corticospinal axonal plasticity and functional recovery after adult central nervous system injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 3513-8.
- WEISBERG, J. A. & RUSTIONI, A. 1979. Differential projections of cortical sensorimotor areas upon the dorsal column nuclei of cats. *J Comp Neurol*, 184, 401-21.
- WELLS, J. E., HURLBERT, R. J., FEHLINGS, M. G. & YONG, V. W. 2003. Neuroprotection by minocycline facilitates significant recovery from spinal cord injury in mice. *Brain*, 126, 1628-37.
- WICKERSHAM, I. R., FINKE, S., CONZELMANN, K. K. & CALLAWAY, E. M. 2007a. Retrograde neuronal tracing with a deletion-mutant rabies virus. *Nat Methods*, 4, 47-9.

- WICKERSHAM, I. R., LYON, D. C., BARNARD, R. J., MORI, T., FINKE, S., CONZELMANN, K. K., YOUNG, J. A. & CALLAWAY, E. M. 2007b. Monosynaptic restriction of transsynaptic tracing from single, genetically targeted neurons. *Neuron*, 53, 639-47.
- WILLIAMS, M. E., DE WIT, J. & GHOSH, A. 2010. Molecular mechanisms of synaptic specificity in developing neural circuits. *Neuron*, 68, 9-18.
- WILLIS, W. D., AL-CHAER, E. D., QUAST, M. J. & WESTLUND, K. N. 1999. A visceral pain pathway in the dorsal column of the spinal cord. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 7675-9.
- WU, C. W. & KAAS, J. H. 1999. Reorganization in primary motor cortex of primates with long-standing therapeutic amputations. *J Neurosci*, 19, 7679-97.
- XIAO, X., LI, J., MCCOWN, T. J. & SAMULSKI, R. J. 1997. Gene transfer by adeno-associated virus vectors into the central nervous system. *Exp Neurol*, 144, 113-24.
- YOSHIHARA, Y., MIZUNO, T., NAKAHIRA, M., KAWASAKI, M., WATANABE, Y., KAGAMIYAMA, H., JISHAGE, K., UEDA, O., SUZUKI, H., TABUCHI, K., SAWAMOTO, K., OKANO, H., NODA, T. & MORI, K. 1999. A genetic approach to visualization of multisynaptic neural pathways using plant lectin transgene. *Neuron*, 22, 33-41.
- ZEILHOFER, H. U., STUDLER, B., ARABADZISZ, D., SCHWEIZER, C., AHMADI, S., LAYH, B., BOSL, M. R. & FRITSCHY, J. M. 2005. Glycinergic neurons expressing enhanced green fluorescent protein in bacterial artificial chromosome transgenic mice. *J Comp Neurol*, 482, 123-41.
- ZORNER, B., BACHMANN, L. C., FILLI, L., KAPITZA, S., GULLO, M., BOLLIGER, M., STARKEY, M. L., ROTH LISBERGER, M., GONZENBACH, R. R. & SCHWAB, M. E. 2014. Chasing central nervous system plasticity: the brainstem's contribution to locomotor recovery in rats with spinal cord injury. *Brain*, 137, 1716-32.
- ZORNER, B. & SCHWAB, M. E. 2010. Anti-Nogo on the go: from animal models to a clinical trial. *Ann N Y Acad Sci*, 1198 Suppl 1, E22-34.

7 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt einigen Personen und Institutionen, ohne deren Hilfe die Umsetzung des Projektes sowie dessen Durchführung und Finalisierung nicht möglich gewesen wäre:

Ganz besonders herzlich möchte ich mich bei meiner Betreuerin Frau Privatdozentin Dr. rer. nat. Florence Bareyre und meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. med. Martin Kerschensteiner für die Möglichkeit bedanken, durch dieses spannende Projekt den Einstieg in die experimentelle Forschung erhalten zu haben. Durch ihre fachliche Kompetenz sowie das Vertrauen in mein selbstständiges Arbeiten wurde ich an das wissenschaftliche Denken und Arbeit herangeführt und habe Begeisterung für diese entwickelt. Es ist mir eine große Freude, mit den Ergebnissen meiner Arbeit zu einer gemeinsamen Publikation beitragen zu dürfen. Die intensive, erfahrungsreiche Zeit in ihrer Arbeitsgruppe stellt nun eine wichtige Grundlage meiner klinisch-wissenschaftlichen Tätigkeit dar.

Auch Dr. Anne Jacobi, Anja Schmalz und Dr. Peter Bradley sowie den weiteren Mitgliedern der Arbeitsgruppe danke ich für das Einlernen in die Methoden sowie für die uneingeschränkte Unterstützung bei der Durchführung der Experimente.

Des Weiteren gilt mein Dank der medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München für die finanzielle Unterstützung des Projektes im Rahmen des Promotionsstudiums FöFoLe.

Abschließend möchte ich mich bei meinen Eltern, meinem Bruder Jonas, sowie bei meiner Freundin Stéphanie Bieber für ihr Zuhören, konstruktive Kritiken und ganz besonders für die unermüdliche und liebevolle Unterstützung bedanken.

8 Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

**Die Reorganisation von somatosensiblen Traktsystemen nach
Rückenmarksverletzungen
im Mausmodell**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 10.07.2020

Ort, Datum

Julian Schwarting

Unterschrift Doktorand