

**Etablierung eines *in vitro*-Modells zur Untersuchung der
Regeneration spinaler Motorneurone und ihrer Axone
nach Axotomie und Neurodegeneration**

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

genehmigt durch die Fakultät für Naturwissenschaften

Der Otto-von-Guericke Universität Magdeburg

Von Diplom-Biologin Josephine Pinkernelle

geb. am 14.06.1983 in Magdeburg

Gutachter: Prof. Dr. Gerburg Keilhoff

Prof. Dr. med. Joachim Weis

eingereicht am: 25.07.2014

verteidigt am: 19.03.2015

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV-V
Abbildungsverzeichnis	VI-VII
1 Einleitung	1
1.1 Das Rückenmark	1
1.1.1 Makroskopische Anatomie.....	1
1.1.2 Rückenmarksverletzungen	2
1.2 Spinalnerven	6
1.2.1 Makroskopische Anatomie.....	6
1.2.2 Mikroskopische Anatomie	8
1.2.3 Verletzungen peripherer Nerven	8
1.3 Organotypische Rückenmarkskulturen und Ko-Kulturen als Modell der Regeneration im ZNS und PNS	12
1.4 Magnetische Nanopartikel	14
1.4.1 Fe ₃ O ₄ -NPs.....	14
1.5 Minozyklin	19
1.6 Ziel der Arbeit	21
2 Material und Methoden	23
2.1 Material	23
2.1.1 Tiere	23
2.1.2 Chemikalien, Lösungen, Verbrauchsmaterialien und Geräte	23
2.1.3 Magnetische NPs	23
2.1.4 Minozyklin	26
2.2 Zellkulturen	27
2.2.1 Disperse Zellkulturen	27
2.3 Intervention	30
2.3.1 Magnetische NPs	30
2.3.2 Minozyklin	33
2.4 Verwendete Methoden	34
2.4.1 Disperse Zellkulturen	34
3 Ergebnisse	46
3.1 Magnetische NPs	46
3.1.1 Zytotoxizität	46
3.1.2 zelluläre Aufnahme	50
3.1.3 Zellspezifische Aufnahmehäufigkeit.....	53
3.1.4 NP-Inkubation in organotypischen Rückenmarkskulturen	58

3.2	Minozyklin	66
3.2.1	10 μ M Minozyklin	66
3.2.2	100 μ M Minozyklin	69
4	Diskussion	81
4.1	Magnetische NPs	81
4.1.1	Zytotoxizität	81
4.1.2	Zelluläre Aufnahme.....	82
4.1.3	Anwendung in organotypischen Rückenmarkskulturen.....	86
4.1.4	Zusammenfassung – Magnetische NPs	88
4.2	Minozyklin	90
4.2.1	Neuroprotektive/neurotoxische Potenz	90
4.2.2	Gliarelevanz.....	91
4.2.3	Organotypische Ko-Kulturen	95
4.2.4	Zusammenfassung - Minozyklin.....	96
4.3	Schlussfolgerung	97
5	Zusammenfassung	98
6	Englische Zusammenfassung - Abstract	100
7	Literaturverzeichnis	102
Anhang A: Geräte, Chemikalien, Medien, Puffer		116
Anhang B: Statistik und Werte		120
Danksagung		VIII-IX
Curriculum vitae		X
Publikationen		XI
Erklärung		XII

Abkürzungsverzeichnis

ANOVA	analysis of variance, Varianzanalyse
Anti-Cx43	Connexin 43-Antikörper
Anti-GalC	Galaktocerebrosid-Antikörper
Anti-GFAP	<i>glial fibrillary acidic protein</i> -Antikörper
Anti-GAPDH	Glyceraldehyd-3-phosphat-dehydrogenase-Antikörper
Anti-IBA-1	<i>ionized calcium binding adaptor molecule-1</i> -Antikörper
Anti-MAP2	<i>microtubule associated protein 2</i> -Antikörper
Anti-NeuN	<i>neuronal nuclei</i> -Antikörper
Anti-Pan-NF	<i>pan-neuronal neurofilament</i> -Antikörper
ASIA	<i>American Spinal Injury Association</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DIV	<i>day in vitro</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMEM-KM	DMEM-Kultivierungsmedium
DMEM-PM	DMEM-Präparationsmedium
DMSO	Dimethylsulfoxid
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>
FKS	fötales Kälberserum
GAP-43	<i>growth associated protein 43</i>
GDNF	<i>glial cell line-derived neurotrophic growth factor</i>
Gly	Glycerin
HBSS	<i>Hank's balanced salt solution</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
IMSAT	Institut für medizinische Forschung und Technologie der Universität Dundee, Großbritannien
INA	Aragon Institut für Nanowissenschaften der Universität Saragossa, Spanien
k-NPs	kommerzielle Nanopartikel
MARVENE	<i>Magnetic nanoparticles for nerve regeneration</i>
MEM	<i>Modified Eagle Medium</i>
MF	Magnetfeld
MPTP	1-Methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridin
MRT	Magnet-Resonanz-Tomografie
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NGF	<i>nerve growth factor</i>
NP	Nanopartikel
Null-RM-M	Rückenmarksmedium ohne GDNF
OEC	olfactory ensheathing cells, olfaktorische Hüllzellen
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , phosphatgepufferte Saline
PDL	poly-D-Lysin
PEI-NPs	Polyethylenimin-Nanopartikel

Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PFA	Paraformaldehyd
PNS	Peripheres Nervensystem
RM-M	Rückenmarksmedium
RM-P	Rückenmarkspuffer
ROS	<i>reactive oxygen species</i> , reaktive Sauerstoffspezies
SDS	<i>sodium dodecyl sulphate</i> , Natriumdodecylsulphat
SSSA	Medizinisches wissenschaftliches Labor der Scuola Superiore di Studi Universitari e Perfezionamento Sant'Anna, Pisa, Italien
TBST	<i>Tris buffered saline with Tween-20</i> , Tris-gepufferte Saline mit Tween-20
ZNS	Zentrales Nervensystem

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Anatomie des Rückenmark.....	2
Abbildung 2: Prozesse während einer Verletzung des Rückenmarks..	5
Abbildung 3: Rückenmarkssegmente und dazugehörige Dermatome.	7
Abbildung 4: Mikroskopische Anatomie des peripheren Nerven.	8
Abbildung 5: Verletzung peripherer Nerven.....	11
Abbildung 6: Magnetische Eigenschaften von Elektronen.	15
Abbildung 7: Spins bei verschiedenen Magnetisierungen.....	16
Abbildung 8: Strukturformel von Minozyklin.	19
Abbildung 9: Synthese von PEI-NPs.	25
Abbildung 10: Charakterisierung der PEI-NPs.....	26
Abbildung 11: Experimenteller Aufbau zur Untersuchung magnetischer NPs.....	30
Abbildung 12: Experimenteller Aufbau zur Untersuchung von Minozyklin.	33
Abbildung 13: MTT-Test mit cerebellaren Misch- und Schwanzzell-Kulturen.	35
Abbildung 14: Zelltypabhängige Verwendungszeitpunkte für immunzytochemische Färbung.	37
Abbildung 15: Vergleich der anatomischen Darstellung mit organotypischer Rückenmarkskultur.....	43
Abbildung 16: Beispiel für die Erfassung des prozentualen gefärbten Areal	44
Abbildung 17: Verwachsungszone organotypischer Ko-Kulturen	45
Abbildung 18: MTT-Viabilitätstest neuronenangereicherte Mischkulturen mit k-NPs.....	47
Abbildung 19: MTT-Viabilitätstest gliareiche Mischkulturen mit k-NPs.....	48
Abbildung 20: MTT-Viabilitätstest Schwanzzell-Kulturen mit k-NPs.	48
Abbildung 21: MTT-Viabilitätstest neuronenangereicherte Mischkulturen mit PEI-NPs..	49
Abbildung 22: MTT-Viabilitätstest gliareiche Mischkulturen mit PEI-NPs.	49
Abbildung 23: MTT-Viabilitätstest Schwanzzell-Kulturen mit PEI-NPs.	50
Abbildung 24: Färbung eisenoxidhaltiger k-NPs mit Preußisch-Blau.....	51
Abbildung 25: Konfokale 3-D-Projektionen.	52
Abbildung 26: Elektronenmikroskopische Aufnahmen.....	52
Abbildung 27: Quantifizierung Zellzahl und zellspezifischen Aufnahmehäufigkeit von k-NPs.....	54
Abbildung 28: Fluoreszenzaufnahmen von cerebellaren Mischkulturen mit k-NPs.....	55
Abbildung 29: Quantifizierung Zellzahl und zellspezifischen Aufnahmehäufigkeit von k-NPs.....	56
Abbildung 30: Fluoreszenzaufnahmen von Schwanzzell-Kulturen mit k-NPs.....	57
Abbildung 31: Quantifizierung organotypische Rückenmarkskulturen mit k-NPs.....	59

Abbildung 32: Fluoreszenzaufnahmen organotypische Rückenmarkskulturen mit k-NPs	60
Abbildung 33: Konfokalmikroskopie organotypischer Rückenmarkskulturen mit k-NPs.	61
Abbildung 34: Stabilität der Funktionalisierung von GDNF-PEI-NPs.	63
Abbildung 35: Kultivierung organotypischer Ko-Kulturen mit GDNF-PEI-NPs.	64
Abbildung 36: Einfluss magnetisches Feld auf mit organotypische Ko-Kulturen mit GDNF-PEI-NPs.....	65
Abbildung 37: Organotypische Rückenmarkskulturen mit 10 μ M Minozyklin.	67
Abbildung 38: Fluoreszenzaufnahmen organotypischer Rückenmarkskulturen mit 10 μ M Minozyklin.	68
Abbildung 39: Organotypische Rückenmarkskulturen mit 100 μ M Minozyklin	71
Abbildung 40: Fluoreszenzaufnahmen organotypischer Rückenmarkskulturen mit 100 μ M Minozyklin.	72
Abbildung 41: Zeitreihe organotypischer Rückenmarkskulturen mit 100 μ M Minozyklin	73
Abbildung 42: Fluoreszenzaufnahmen der Zeitreihe organotypischer Rückenmarkskulturen mit 100 μ M Minozyklin.	74
Abbildung 43: Organotypische Ko-Kulturen mit 100 μ M Minozyklin	76
Abbildung 44: Fluoreszenzaufnahmen organotypische Ko-Kulturen mit 100 μ M Minozyklin.	76
Abbildung 45: MTT-Viabilitätstest kortikaler gliareicher Mischkulturen mit Minozyklin ..	78
Abbildung 46: Wundheilungstest an kortikalen gliareichen Mischkulturen mit Minozyklin	79
Abbildung 47: Western Blot kortikaler gliareicher Mischkulturen mit Minozyklin	80
Abbildung 48: Wege der zellulären Aufnahme.	83
Abbildung 49: Mikrogliaaktivierung nach Verletzungen des ZNS.	92

1 Einleitung

1.1 Das Rückenmark

1.1.1 Makroskopische Anatomie

Das Rückenmark ist Teil des Zentralen Nervensystems (ZNS) und liegt im Wirbelkanal. Von ihm aus werden die Extremitäten, der Rumpf und der Hals über Spinalnerven versorgt. Nach den Austritten der Spinalnerven lässt sich das Rückenmark in einen zervikalen (Halsbereich), einen thorakalen (Brustbereich), einen lumbalen (Lendenbereich), einen sakralen Teil (Kreuzbereich) und das Kokzygealmark (Schwanzbereich, beim Menschen rudimentär) gliedern (Abbildung 1 A, B). Das Rückenmark besteht wie das Gehirn aus weißer und grauer Substanz. Im Querschnitt zeigt die graue Substanz, die aus den Zellkörpern der Rückenmarksneurone besteht, eine schmetterlingsähnliche Gestalt. Diese wird gegliedert in das breitere, ventrale Vorderhorn (Motorneurone, die die Skelettmuskeln innervieren) und das schmalere, dorsale Hinterhorn (sensorische Neurone). Den Vorderhörnern entspringen die Vorder- bzw. Ventralwurzeln mit dem motorischen Anteil des Spinalnervs und den Hinterhörnern die Hinter- bzw. Dorsalwurzeln mit dem sensorischen Anteil des Spinalnervs. Beide Anteile vereinigen sich nach dem Austritt aus dem Rückenmark zu einem Spinalnerv (Abbildung 1 C). Die Spinalnerven selbst gehören zum Peripheren Nervensystem (PNS, s. Kapitel 1.2). Sie bringen sensible Informationen aus der Peripherie, die im Hinterhorn des Rückenmarks auf ein Neuron umgeschaltet und in aufsteigenden Bahnen zum Thalamus weitergeleitet werden. Die motorischen Anteile gehören zu absteigenden Bahnen, die von der Großhirnrinde kommen, im Rückenmark verschaltet werden und letztendlich die Skelettmuskulatur innervieren. Jede Nervenwurzel bekommt sensorische Informationen aus einem abgegrenzten Hautareal (Dermatom), innerviert aber mehrere, verschiedene Muskeln (Myotom). Anhand einer systematischen Untersuchung der ausgefallenen Dermatom- und Myotomversorgung lassen sich Verletzungen des Rückenmarks lokalisieren. (Kirshblum et al., 2011; Trepel, 2004).

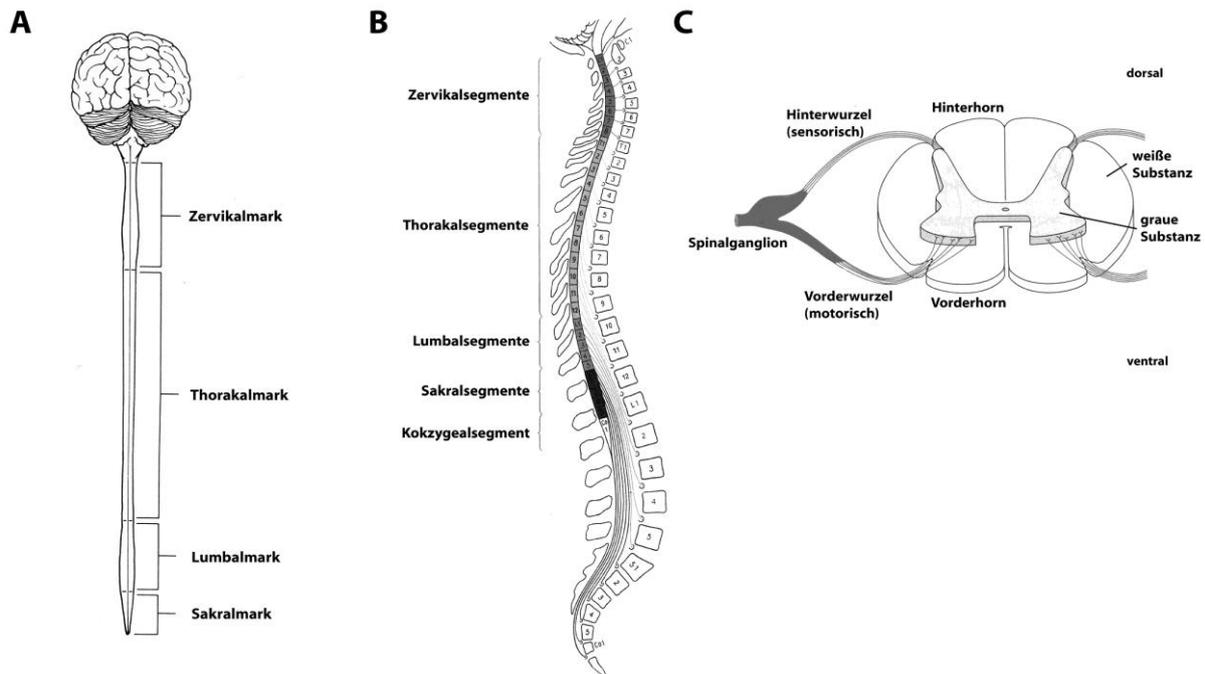


Abbildung 1: Anatomie des Rückenmarks. (A) Außenansicht ZNS mit Gehirn und Rückenmark, (B) Rückenmark im Wirbelkanal mit der topografischen Lage der Rückenmarkssegmente zu den Wirbeln, (C) Querschnitt Rückenmark mit austretendem Spinalnerven. (A) modifiziert nach Kandel (2000), (B, C) modifiziert nach Trepel (1999).

1.1.2 Rückenmarksverletzungen

Traumatische Rückenmarksverletzungen stellen Gesundheitssysteme vor immense Kosten, da Patienten oft eine lebenslange medizinische Betreuung benötigen. Die Prävalenz in Europa beträgt nach Wyndaele und Wyndaele (2006) durchschnittlich 252 Millionen Einwohner, pro Jahr kommen durchschnittlich 19,4 Millionen Neuerkrankungen hinzu. Dabei stellen junge Männer zwischen 15-34 eine Risikogruppe dar. Traumatische Rückenmarksverletzungen können aus einer Kompression, Quetschung oder Penetration des Rückenmarks resultieren. Häufig kommt es zu Gewebeschädigungen durch z. B. Wirbelfragmente nach einem Unfall, Bandscheiben oder Tumore. Die Verletzung verursacht dabei einen Ausfall der Sensorik und der willkürlichen Bewegungen in den Körperarealen, die unterhalb der Läsion angesiedelt sind. In der Literatur werden neurologische Schäden meist nach den Standards der American Spinal Injury Association (ASIA) klassifiziert. Grad A beschreibt dabei eine komplette, die Grade B-D teilweise Schädigungen des Rückenmarks. Zusätzlich werden Rückenmarksverletzungen in Paraplegien (Paralyse der Beine aufgrund thorakaler und lumbaler Verletzungen) oder Tetraplegien (Paralyse der Arme und Beine aufgrund zervikaler Verletzungen) eingeteilt.

Der Großteil traumatischer Rückenmarksverletzungen resultiert in Paraplegien und teilweisen Schädigungen (Wyndaele und Wyndaele, 2006). Patienten mit teilweiser Schädigung können einen Teil der neurologischen Funktion unterhalb der Schädigung erhalten und eventuell rehabilitieren, während die Aussicht dafür bei kompletten Verletzungen schlecht ist (Kirshblum et al., 2011; Stahel et al., 2012). Die mechanische Verletzung des Gewebes ist dabei zunächst oft geringer als der am Ende geschädigte Bereich. Dies liegt daran, dass Prozesse in Gang gesetzt werden, die zu einer sekundären Gewebeschädigung führen (Zusammenfassung in Abbildung 2). Durch die Verletzung kommt es zunächst zur Zerstörung von Zellen und ihrer Zell-Zell-Kontakte. Die extrazellulären Level an Glutamat, Laktat, Kalium-Ionen, Stickstoffoxid (NO) und freie Sauerstoffspezies (reactive oxygen species, ROS) steigen an und können zum Anschwellen von Zellen sowie später zu ihrem Untergang führen. Blutgefäße werden unterbrochen und resultieren in Blutungen im Gewebe. Die Blut-Hirn-Schranke bricht zusammen und macht den Weg frei für eine Infiltrierung des Parenchyms durch Makrophagen (McDonald und Sadowsky, 2002; Norenberg et al., 2004; Donnelly und Popovich, 2008). Insgesamt schwillt das Gewebe an und baut zusätzlichen mechanischen Druck auf, der zu weiteren Schäden führt. Oft kommt es auch zu ischämischen Verhältnissen, die die Zellen zusätzlich schädigen. Mikrogliazellen werden aktiviert, die Zelltrümmer (Debris) phagozytieren und proinflammatorische, aber auch antiinflammatorische Moleküle sezernieren (Loane und Byrnes, 2010; David und Kroner, 2011). Daneben kommt es auch zu einer Aktivierung von Astroglia. Astrogliazellen nehmen Neurotransmitter auf, sind an der Wiederherstellung des extrazellulären Milieus beteiligt und regulieren vermutlich auch die Inflammation. Sie bilden eine sogenannte Glianarbe an der Verletzungsstelle. Diese bildet eine mechanische Barriere, die vermutlich zunächst die Zellen an der Verletzungsstelle schützt, jedoch später die Regeneration von Axonen behindern kann (Faulkner et al., 2004; White und Jakeman, 2008; Rolls et al., 2009).

Im Gegensatz zu Tiermodellen setzt beim Menschen die Wallersche Degeneration erst sehr spät nach dem Verletzungsgeschehen ein und kann über Jahre dauern (Norenberg et al., 2004; Buss, 2004b). Die Wallersche Degeneration beschreibt dabei Prozesse, bei denen im distalen Teil des verletzten Nervs die Myelinscheiden und anderer Debris abgebaut und eine regenerationsfördernde Umgebung für das auswachsende Axon geschaffen werden soll. Der Abbau von Zell- und Myelindebris ist jedoch im ZNS

verlangsamt, da hier nur Mikroglia und Makrophagen phagozytieren. Die myelinbildenden Oligodendrogliazellen werden durch den Verlust ihrer axonalen Kontakte und ihrer Zell-Zell-Kontakte inhibiert und gehen teilweise in Apoptose. Dadurch bleiben regenerationsinhibierende Moleküle, wie sie z. B. in Myelinscheiden vorkommen (Nogo-A, Myelin-assoziiertes Glykoprotein), länger an der Verletzungsstelle vorhanden (Buss, 2004b; Buss, 2004a; Vargas und Barres, 2007). Zusätzlich tritt bei vielen Patienten eine Einwanderung und starke Proliferation von Schwannzellen ins Rückenmark auf, die als mechanische Barriere die Regeneration verletzter Axone zusätzlich behindern (Norenberg et al., 2004; Thuret et al., 2006).

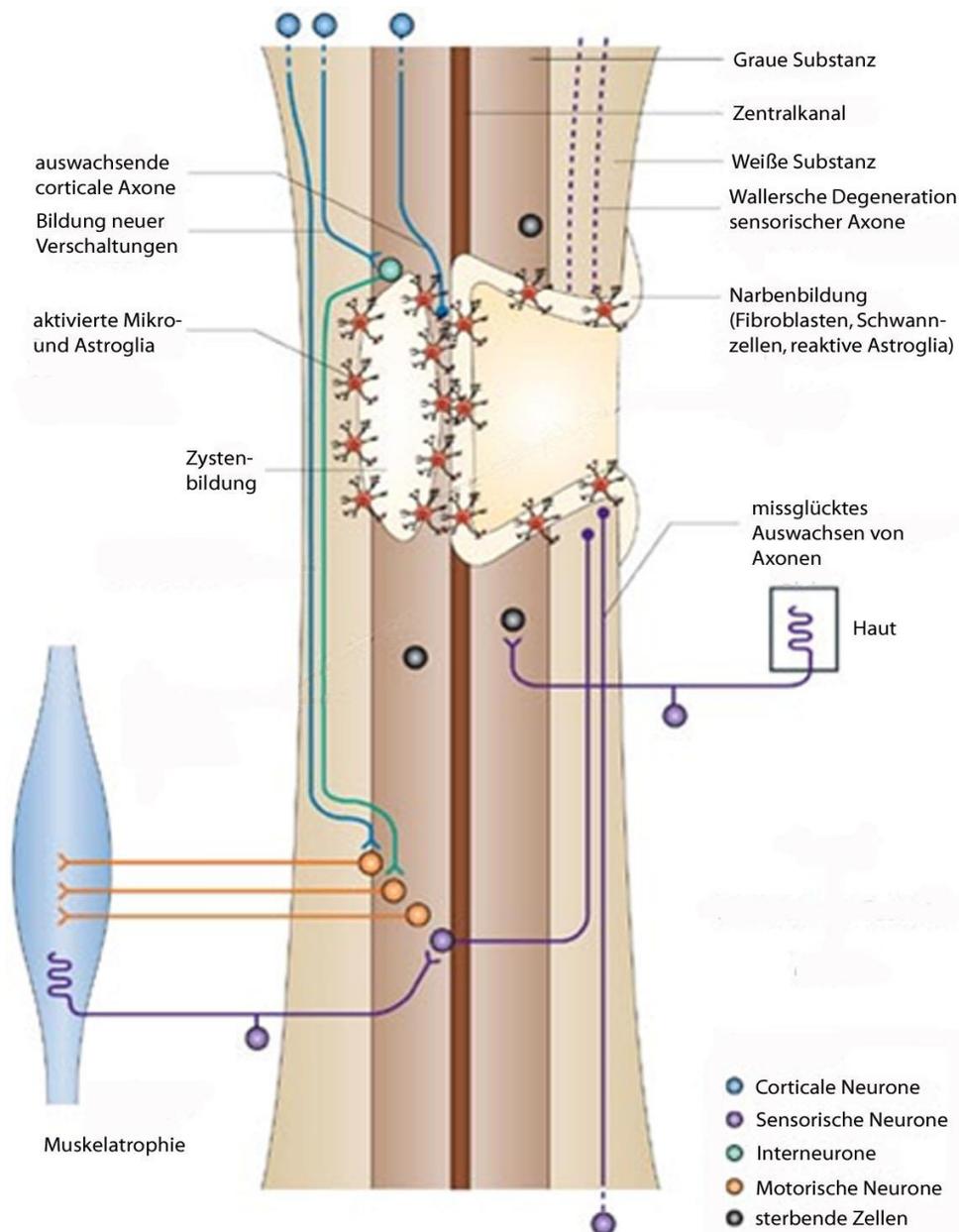


Abbildung 2: Schematische Zusammenfassung verschiedener Prozesse während einer Verletzung des Rückenmarks. Durch Quetschungen des Rückenmarks kommt es oft zur Zystenbildung. Penetrierende Verletzungen führen oft zur Invasion von Zellen des PNS, die in Narbenbildung resultieren. Sensorische und motorische Bahnen werden unterbrochen und regenerieren häufig nicht erfolgreich. Daneben können neue Verschaltungen über Interneurone gebildet werden. Missglückte Regeneration motorischer Bahnen führt letztendlich zur Muskelatrophie. Modifiziert nach Thuret et al. (2006).

Erste Maßnahmen bei akuten Rückenmarksverletzungen zielen vor allem darauf ab, die Wirbelsäule zu immobilisieren und gegebenenfalls durch chirurgische Entfernung, von z. B. Knochensplintern, das Gewebe zu entlasten (Stahel et al., 2012). Da es bis heute keine wirksame Therapiemöglichkeit gibt, wird versucht, die Vergrößerung der Schäden,

die durch die sekundär ablaufenden Prozesse verursacht werden, zu verringern. Das Mittel der Wahl sind oftmals Steroide, die die auftretende Inflammation unterdrücken sollen. Allerdings ist die Verabreichung von Steroiden mittlerweile umstritten. (McDonald und Sadowsky, 2002; Lim und Tow, 2007; Stahel et al., 2012). 2004 wurde eine klinische Studie mit mehr als 10000 Patienten gestoppt, da die Gabe von Kortikosteroiden die Sterberate im Vergleich zu einem Placebo signifikant erhöhte (Roberts, 2004). Neue Therapien werden intensiv erforscht. Erste klinische Studien laufen mit anti-Nogo-Antikörpern, Cethrin (inhibiert die GTPase Rho, welche eine Rolle bei der neuronalen Apoptose und dem Axonwachstum spielt), Magnesium (als NMDA-Antagonist) und auch mit dem Tetrazyklin Minozyklin, welches auch Bestandteil der Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit ist (Kwon et al., 2011).

Findet eine Regeneration verletzter Axone statt, kommt es trotzdem häufig nicht zu einer funktionellen Wiederherstellung. Aussprossende Axone wachsen oftmals nicht zielgerichtet und innervieren wahllos Zielorgane. Dadurch treten Fehlverschaltungen auf, die vermutlich zu den oft auftretenden Schmerzen und autonomen Hyperreflexen bei Patienten mit inkompletten Verletzungen führen (Weaver et al., 2001; Marsh et al., 2002; Gwak et al., 2003). Daneben können auch neue Verschaltungen von nicht verletzten Zellen entstehen, welche die Verletzung umgehen. Generell ist oftmals eine kortikale Umorganisation nötig, um Funktionen wiederzuerlangen. Diese wird in der Rehabilitation durch therapeutische Übungen und Kompensationstechniken unterstützt (Maier und Schwab, 2006; Lim und Tow, 2007).

1.2 Spinalnerven

1.2.1 Makroskopische Anatomie

Spinalnerven sind Teil des PNS. Sie leiten dem ZNS afferente, sensible Informationen zu und führen efferente, motorische Informationen zu den Zielorganen. Das Versorgungsgebiet der Spinalnerven umfasst den Rumpf, die Extremitäten und einen Teil des Halses. Der Kopf- und Halsbereich wird über Hirnnerven versorgt, die auch ein Teil des PNS sind, aber an dieser Stelle nicht weiter besprochen werden. Wie schon in 1.1 erwähnt, vereinigen sich im Spinalganglion sensorische und motorische Anteile zu einem Spinalnerven, der nach dem segmentalen Austritt benannt wird. Nach dem Durchtritt durch das Foramen intervertebrale verzweigt sich der Nerv erneut in einen ventralen

(Rami anterior) und einen dorsalen Ast (Rami posterior). Die Rami posteriores innervieren motorisch den Musculus erector spinae und sensibel die mediale Rücken-, Nacken- und Hinterkopfhaut. Die Rami anteriores versorgen die Extremitäten, den Hals, die Interkostalnerven und die seitliche Rumpfwand. Im Bereich des Rumpfes bleibt die segmentale Gliederung bestehen, so dass Dermatome zugeordnet werden können. Im Bereich der Extremitäten bilden die Rami anteriores sogenannte Plexus, in denen sich die Spinalnerven verflechten und Fasern austauschen. Diese gemischten Nerven enthalten nun Fasern unterschiedlicher Segmente, so dass die innervierten Gebiete nicht den eigentlichen Segmenten entsprechen. Trotzdem enden die einzelnen Fasern dieser Nerven in ihrem Innervationsgebiet segmental voneinander getrennt (Abbildung 3). Auch die Innervation der Skelettmuskulatur erfolgt segmental, so dass Myotome zugeordnet werden können. Dabei können ausschließlich einzelne oder aber mehrere Muskeln von einem Segment versorgt werden (Trepel, 1999).

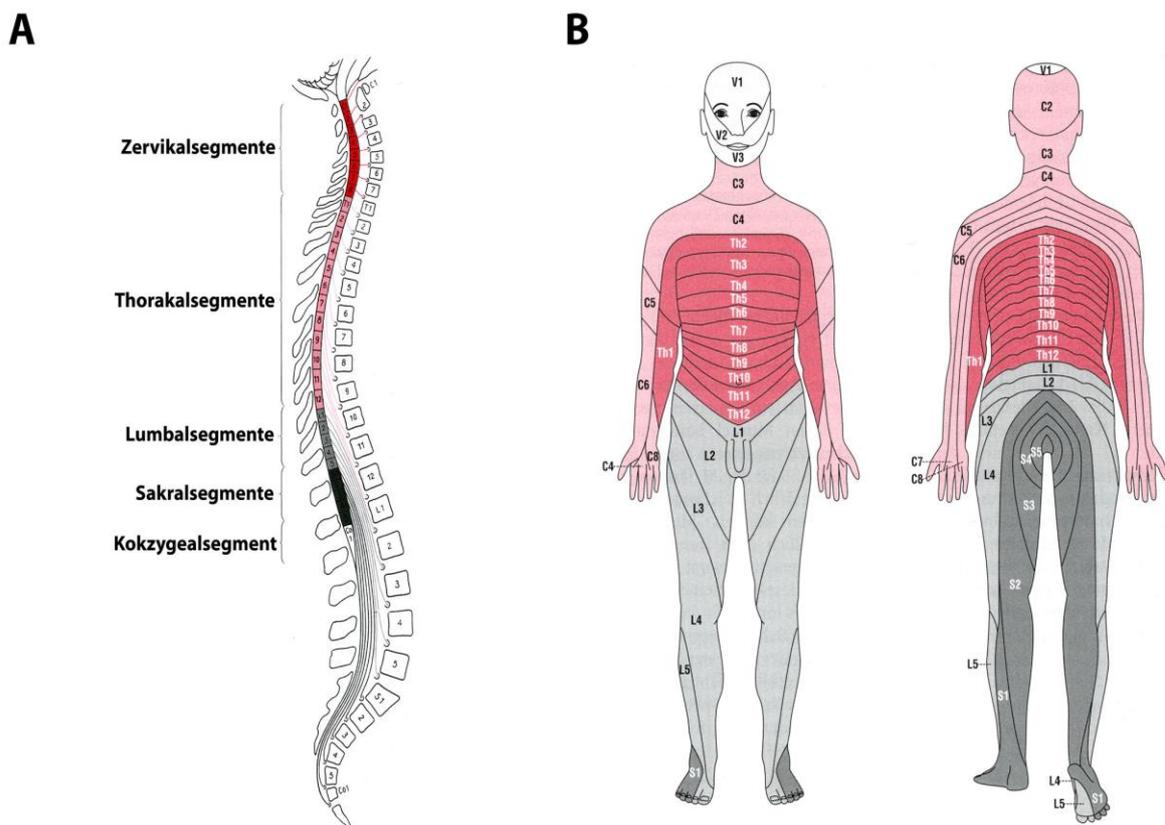


Abbildung 3: Rückenmarkssegmente (A) und dazugehörige Dermatome (B). Modifiziert nach Trepel (1999).

1.2.2 Mikroskopische Anatomie

Ein peripherer Nerv besteht aus einer Vielzahl von Nervenfasern (Faszikeln), die wiederum eine Reihe von Axonen zusammenfassen (Abbildung 4). Die Nervenfasern werden von einer losen kollagenen Matrix umgeben, dem Endoneurium. Darüber befindet sich als dünne Schicht flacher Zellen das Perineurium. Diese Zellen sind durch tight junctions miteinander verbunden, regulieren die Diffusion und geben dem Nerven Zugfestigkeit. Daran schließt sich das Epineurium an, das aus Bindegewebe besteht und die Fasern vor Kompression schützt. Das Epineurium formt eine äußere Hülle um den Nerven und gibt ihm ein Kabelartiges Aussehen (Sunderland, 1990).

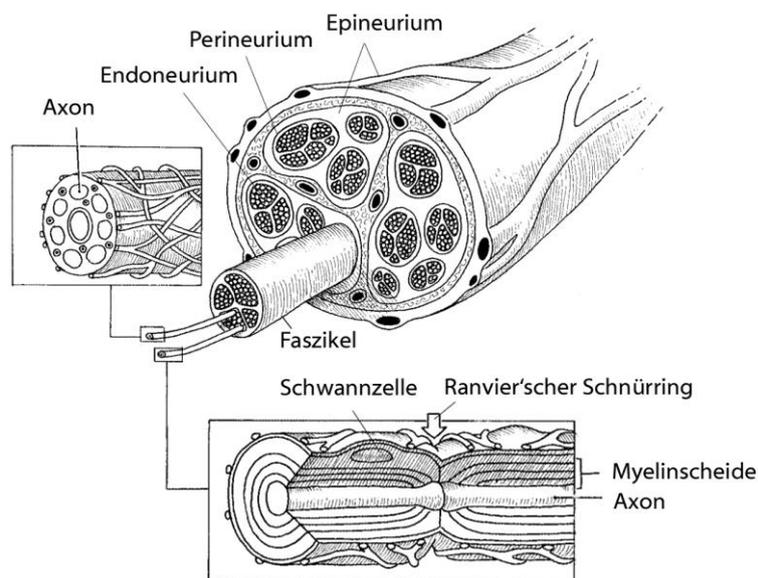


Abbildung 4: Mikroskopische Anatomie des peripheren Nerven. Modifiziert nach Sunderland (1990).

1.2.3 Verletzungen peripherer Nerven

Verletzungen peripherer Nerven treten bei ca. 2-3 % von Traumapatienten auf (Noble et al., 1998; Robinson, 2000). Auch hier stellen junge Männer eine Risikogruppe dar. Aufgrund eingeschränkter Therapiemöglichkeiten behalten viele Patienten dauerhafte Schäden und Behinderungen zurück, die die Lebensqualität deutlich einschränken und zu Lasten der Gesundheitssysteme gehen. Verletzungen peripherer Nerven sind häufig das Resultat von Verkehrsunfällen, können aber auch durch Stürze, Arbeitsunfälle und Gewebepenetrationen auftreten. Eingeteilt werden Verletzungen häufig in 5 Grade: der 1.

Grad beschreibt eine geringe Verletzung, bei der das Myelin geschädigt ist und keine Erregungsleitung stattfindet, das Axon aber intakt bleibt. Diese Verletzung hat sehr gute Aussichten auf eine funktionelle Erholung in wenigen Wochen. Bei den Graden 2-4 treten axonale Schäden auf, wobei mit zunehmenden Grad zusätzliche Verletzungen des Endoneuriums und des Perineuriums hinzukommen. Grad 5 beschreibt schließlich einen Zustand in dem das Axon, das Endoneurium, Perineurium und das Epineurium durchtrennt sind. Die Aussichten auf eine Wiederherstellung der Nervenfunktionen nehmen dabei mit zunehmenden Grad der Schädigung ab (Dillingham, 1998; Robinson, 2000; Griffin et al., 2013). Bei einer axonalen Verletzung kommt es im distalen Segment zunächst zu einer Degeneration des Axons. Die einsetzenden Prozesse der Wallerschen Degeneration sind im PNS schneller als im ZNS, da die im PNS vorkommenden Schwannzellen eine wesentliche Rolle beim Abbau von Debris spielen. Die Schwannzellen werden durch den Kontaktverlust zum Axon aktiviert. Sie stellen die Myelinproduktion ein, dedifferenzieren, proliferieren und beginnen mit der Phagozytose von Myelinscheiden und -debris. Zeitverzögert wandern Makrophagen aus der Peripherie in das verletzte Gewebe ein und beseitigen zusätzlich Debris. Diese „Reinigungsprozesse“ sind Grundvoraussetzung für einen späteren Regenerationserfolg (Keilhoff et al., 2004; Keilhoff et al., 2007). Danach beginnen die Schwannzellen mit der Ausschüttung regenerationsfördernder Wachstumsfaktoren wie dem Nervenwachstumsfaktor (nerve growth factor, NGF) und ordnen sich regelmäßig an. Dies ergibt eine Art Leitschiene für das neu auswachsende Axon, die Büngnerschen Bänder (Wiesmann et al., 2014; Lim und Tow, 2007; Fansa und Keilhoff, 2003; Chen et al., 2007; Vargas und Barres, 2007; Trepel, 2012). Proximal zur Verletzung kommt es zu einer Chromatolyse des Neurons, bei der sich die Nissl-Körperchen auflösen, der Zellkern zur Zellperipherie wandert und das Soma aufgrund hoher metabolischer Aktivität anschwillt (Navarro et al., 2007). Das Neuron beginnt, die Synthese wachstumsfördernder Proteine, wie des GAP-43 (growth-associated protein 43) und der Zytoskelettproteine zu erhöhen und das Auswachsen des Axons voranzutreiben. Dieses orientiert sich dabei an chemotaktischen Signalen, wie z. B. NGF, oder an noch intakten Teilen der Basallamina und verlängert sich, wenn möglich, bis in den distalen Bereich der Verletzung, um das Zielorgan wieder zu reinnervieren (Navarro et al., 2007; Griffin et al., 2013) (Zusammenfassung in Abbildung 5). Diese Reinnervation ist jedoch häufig inadäquat. Der Durchmesser, die Erregungsleitung und die Erregbarkeit ist bei regenerierten Axonen für lange Zeit

vermindert (Fields und Ellisman, 1986a; Fields und Ellisman, 1986b). Häufig kommt es zur Reinnervation von Zielorganen, die vorher nicht von diesen Axonen versorgt wurden. Zusätzlich können sich die Axone verzweigen, so dass die Anzahl der Synapsen zunehmen kann. Beides führt dazu, dass die Projektionen im Rückenmark, aber auch im Kortex nicht mehr mit den ursprünglichen übereinstimmen. Es kommt zu funktionellen Verlusten, die selbst durch plastische Prozesse schwer auszugleichen sind (Navarro et al., 2007). Daneben können Schmerzen, übermäßige Schmerzempfindlichkeit und eine Zunahme von Reflexen auftreten.

Erfolgt keine Regeneration des Axons, weil z. B. die Lücke zwischen proximalen und distalen Stumpf zu groß ist, sterben die Neurone letztendlich ab. Dabei ist die Überlebenschance der Neurone abhängig vom Alter, des Neuronentyps, der Distanz der Axotomie zum Soma und der Spezies. Generell scheinen adulte Neurone besser zu überleben als sich noch entwickelnde; spinale Motorneurone besser als kraniale; Neurone mit distalen Verletzungen besser als Neurone mit somanahen Axotomien und spinale Motorneurone besser als spinale sensorische Neurone (Koliatsos et al., 1994; Li et al., 1998; Goldberg und Barres, 2000; Abrams und Widenfalk, 2005).

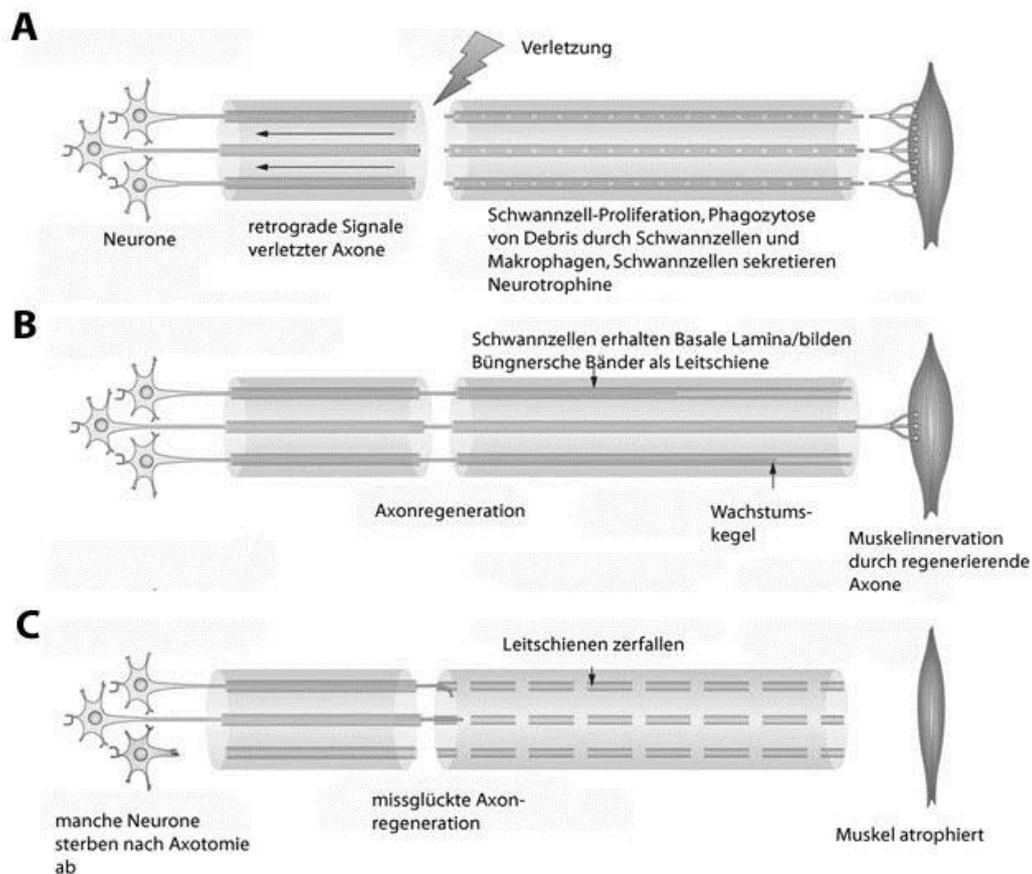


Abbildung 5: Verletzung peripherer Nerven. Wallersche Degeneration in (A) führt zu regenerationsfördernden Bedingungen im distalen Nerv. (B) erfolgreiche Regeneration, (C) missglückte Regeneration. Modifiziert nach Scheib und Höke (2013).

Um die Axonregeneration zu unterstützen, werden in der Klinik vor allem mikrochirurgische Techniken verwendet, die die Lücken zwischen proximalem und distalem Stumpf schließen und den auswachsenden Axonen eine Leitschiene bieten sollen. Neben dem direkten Vernähen der Stümpfe kommen bei größeren Lücken venöse Eigentransplantate, aber auch Spendertransplantate in Betracht. Zunehmend werden auch Transplantate aus Silikon oder vom Körper abbaubare Röhren eingesetzt, die teilweise mit Wachstumsfaktoren oder Zellen bestückt werden. All diese Therapien zielen allerdings nur darauf ab, die auswachsenden Axone zu den distalen Strukturen zu leiten. Die fehlerhafte Reinnervation von Muskeln oder Hautbereichen, die oftmals entscheidend zum schlechten funktionellen Ergebnis beiträgt, wird damit nicht verhindert (IJKema-Paassen et al., 2004).

1.3 Organotypische Rückenmarkskulturen und Ko-Kulturen als Modell der Regeneration im ZNS und PNS

Verletzungen des Rückenmarks und Verletzungen peripherer Nerven haben trotz aller Unterschiede einige Gemeinsamkeiten: Beide Verletzungen können bei nicht erfolgreicher Regeneration des Axons zum Verlust von Motorneuronen führen, sie führen zu einer Unterbrechung des Informationsflusses im peripheren Nerven, und die zielgerichtete Regeneration mit der Wiederherstellung der Funktionen ist häufig sehr schwierig. Therapiemöglichkeiten sind bei beiden Arten von Verletzungen trotz intensiver Forschung beschränkt. Die Forschung verwendet vor allem Tiermodelle, um neue potentielle Medikamente oder Therapieansätze zu untersuchen. Die Durchführung von Tierversuchen ist jedoch ethisch umstritten, kostenintensiv und zeitaufwendig. Für die Untersuchung potentieller Therapieansätze oder Substanzen sind Tierversuche eigentlich nicht geeignet, da durch die Komplexität des Organismus häufig Kompensationsmechanismen auftreten, die die Ergebnisse schwer interpretierbar machen. Oft fehlt es jedoch an Alternativen. Hier bieten sich organotypische Kulturen an. Sie basieren auf Gewebeschnitten, sind 3-dimensional und enthalten alle Zellen, die in diesem Gewebe vorkommen und deren Zell-Zell-Kontakte. Der Tierverbrauch zum Anlegen dieser Kulturen ist geringer als der für klassische *in vivo*-Experimente, da hier aus einem Tier mehrere Kulturen hergestellt werden können. Die zelluläre Organisation des Gewebes bleibt während der Kultivierung zum großen Teil erhalten (Stavridis et al., 2005). Organotypische Kulturen können daher komplexe Vorgänge besser abbilden als 2-dimensionale Zellkulturen einzelner Zellarten. Damit stellen sie eine Verbindung zwischen hohem Durchsatz von *in vitro*-Modellen und der Abbildung von Prozessen in Tiermodellen dar und eignen sich somit besonders zum Sichten von pharmazeutisch funktionellen Substanzen (Sundstrom et al., 2005).

In dieser Arbeit wurden organotypische Kulturen vom Rückenmark und Ko-Kulturen aus Rückenmark und peripheren Nerven verwendet. Beide basieren auf einem modifiziertem Protokoll nach Vyas et al. (2010) und ermöglichen es, sowohl die direkte Verletzung der Motorneuronen-Axone in der ZNS-Umgebung zu betrachten als auch die indirekte Schädigung der Neurone durch eine Verletzung des peripheren Nervs. Zusätzlich bildet das hier verwendete Modell eine Brücke zwischen der Kultivierbarkeit von Motorneuronen und ihrem Reifegrad. Die Kultivierung von primären Motorneuronen ist schwierig. Dies resultiert vor allem aus ihrer mit der Reifung zunehmenden Abhängigkeit von

Wachstumsfaktoren und ihren Zielprojektionen. Der Verlust der Projektion und der Wachstumsfaktoren nach einer Axotomie führt zum Absterben der Neurone (Kashihara et al., 1987; Li et al., 1994; Rossiter et al., 1996; Eggers et al., 2010). Daher verwenden die meisten Studien embryonale Motoneurone als 2-dimensionale Zellkultur oder als 3-dimensionale organotypische Kultur. Das macht die Übertragung der Ergebnisse auf eine klinische Situation schwierig, da in der Klinik Verletzungen von adulten Motoneuronen und peripheren Nerven behandelt werden müssen. Für die von mir angelegten organotypischen Kulturen wurden neonatale Tiere verwendet. Bei ihnen ist die Reifung der Motoneurone zwar noch nicht abgeschlossen, aber sehr viel weiter als bei embryonalen Kulturen. Die Präparation des Rückenmarksgewebes selbst induziert, ähnlich wie bei einer Rückenmarksverletzung, eine proximale Axotomie der Motoneurone. Durch die Zugabe des Wachstumsfaktors GDNF (glial cell line-derived neurotrophic growth factor) können jedoch ca. 60 % der Motoneurone in der Kultur am Leben erhalten werden (Rakowicz et al., 2002; Vyas et al., 2010; Pinkernelle et al., 2013). Generell scheint das von Vyas et al. (2010) entwickelte Mausmodell, auf dem mein Modell basiert, einerseits sehr flexibel, aber zugleich sehr reproduzierbar zu sein. Auch die Gruppe um G. Brook veröffentlichte kürzlich eine auf diesem Modell basierende Arbeit, in der sie zeigten, dass Motoneurone ihre Neuriten in transplantierte Nervenwurzeln, aber auch Kollagengerüste regenerieren und mit Schwannzellen interagieren können (Gerardo-Nava et al., 2014).

In meiner Arbeit stellen nun die einfachen organotypischen Rückenmarkskulturen, welche nur aus einem Rückenmarksschnitt bestehen, einen Schwerpunkt dar. Sie dienen der Sichtung und Charakterisierung von Effekten verwendeter Substanzen, da ihre Präparation im Vergleich zu den Ko-Kulturen schneller ist und daher größere Probenzahlen erlaubt. Die zusätzliche Verwendung von organotypischen Ko-Kulturen aus Rückenmark und peripherem Nerven ermöglichte es, den Bezug zum PNS herzustellen und die regenerationsfördernden Eigenschaften von Schwannzellen mit in das Versuchssystem einzubringen.

1.4 Magnetische Nanopartikel

Nanopartikel (NP) haben in den letzten Jahren durch ihre Vielzahl an Verwendungsmöglichkeiten große Aufmerksamkeit erregt. Als NPs werden Partikel bezeichnet, die zwischen 1 und 100 nm groß sind und dadurch andere Eigenschaften aufweisen als originale chemische Substanz. Z. B. ist Gold als Feststoff relativ reaktionsträge, als NPs jedoch stark katalytisch wirksam und findet daher Verwendung bei Schnelltests (Schwangerschaftstests, Bakterientests) (Huang, 2006; Rojanathanes et al., 2008).

Neben NPs aus Kohlenstoffen (Fullerene, einwandige Kohlenstoffröhren), Silizium, Polymeren und Halbleitern bieten vor allem die metallischen und Metalloxid-NPs wie z. B. Gold-, Silber-, Titanoxid-, Zinkoxid- und Eisen(II-III)oxid (Fe_3O_4)-NPs eine Reihe von Anwendungsmöglichkeiten.

Titanoxid- und Zinkoxid-NPs sorgen z. B. in Sonnencremes für ausreichenden Schutz vor ultravioletter Strahlung und in Zahnpasta für den Abrieb von Zahnverfärbungen. Silber-NPs werden als antibakterielle Beschichtungen von z. B. chirurgischem Besteck erforscht. Fe_3O_4 -NPs finden besonders in den Lebenswissenschaften Verwendung.

1.4.1 Fe_3O_4 -NPs

1.4.1.1 *Magnetische Eigenschaften*

Fe_3O_4 ist ein Feststoff, der aus Eisen(II)- und Eisen(III)-Ionen besteht und in der Natur als mineralisches Magnetit vorkommt. Es besitzt ferromagnetische Eigenschaften. Sein Magnetismus basiert auf der Anordnung einzelner Spins der Elektronen eines Atoms. Elektronen besitzen Welleneigenschaften und können mit Hilfe von Quantenzahlen beschrieben werden. Eine dieser Quantenzahlen ist die Spinmagnetquantenzahl, die sich durch die Annahme ergibt, dass sich Elektronen ständig um die eigene Achse drehen und dadurch ein Magnetfeld erzeugen. Dieses nennt man Spin. Der Spin eines Elektrons kann zwei Werte annehmen: $+1/2$ oder $-1/2$. Die magnetischen Eigenschaften zweier entgegen gesetzter Spins heben sich auf. Die Bewegung der Elektronen um den Atomkern ergibt ebenfalls ein magnetisches Moment (Mortimer und Müller, 2003). Spin und Bewegung der Elektronen um den Atomkern sind miteinander gekoppelt und ergeben zusammen das magnetische Moment eines Atoms (Abbildung 6).

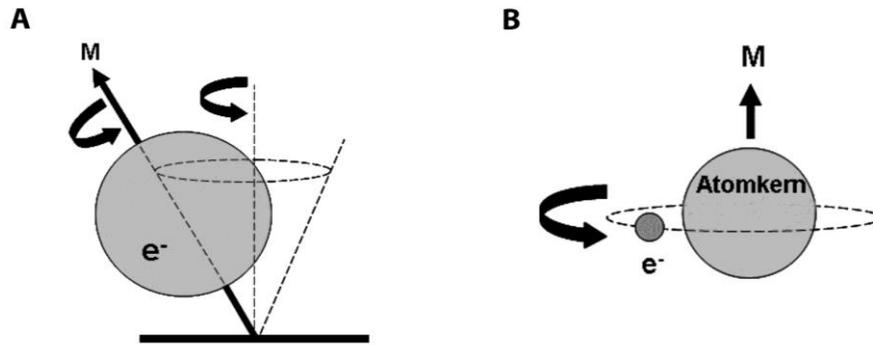


Abbildung 6: Magnetische Eigenschaften von Elektronen. Das magnetische Moment (M) eines Atoms ergibt sich aus (A) der Eigenrotation des Elektrons e^- um die eigene Achse (Spin) und (B) der Rotation des e^- um den Atomkern.

In ferromagnetischen Stoffen neigen die magnetischen Momente der Atome dazu, sich parallel auszurichten, während in antiferromagnetischen Stoffen eine antiparallele Ausrichtung bevorzugt wird (Abbildung 7 A). Die Summe dieser magnetischen Momente der Atome ergibt die Magnetisierung des Stoffes. Aus energetischen Gründen ist jedoch die parallele Ausrichtung aller magnetischen Momente der Atome eines Stoffes ungünstig, und es kommt zur Bildung einzelner Domänen. Innerhalb dieser Domänen sind die magnetischen Momente der Atome parallel ausgerichtet. Einzelne Domänen haben jedoch verschieden ausgerichtete Momente, die in der Summe zur Aufhebung der Magnetisierung, der Minimierung der Energie und einer Nullmagnetisierung des Stoffes führen. Legt man nun ein starkes externes Magnetfeld an, kommt es zu einer Vergrößerung der zum Magnetfeld günstig ausgerichteten Domänen auf Kosten benachbarter Domänen. Diese Ausrichtung bleibt nach Entfernen des Magnetfeldes teilweise erhalten und führt so zu einer permanenten Magnetisierung wie z. B. bei Haftmagneten (Abbildung 7 B).

Reduziert man nun die Größe des Stoffes auf Nanometergröße, sind diese Domänen gezwungen, in einem immer kleineren Raum nebeneinander zu existieren. Unterhalb einer kritischen Größe kommt es dadurch zu einer Verschmelzung der Domänen zu einer einzelnen. Diese NPs heißen dann Einzel-Domänen-Partikel und weisen die Eigenschaft des Superparagnetismus auf. Dieser beruht darauf, dass sich die magnetischen Momente der Einzel-Domänen-Partikel permanent bewegen, aber durch ein externes Magnetfeld zur Ausrichtung gezwungen werden können und dadurch eine Magnetisierung entsteht. Nimmt man nun den Einfluss des externen Magnetfeldes wieder weg, verlieren

die NPs im Gegensatz zu ferromagnetischen NPs ihre Magnetisierung wieder (Abbildung 7 C) (Harms, 2004; Gupta und Gupta, 2005; Harten, 2007).

Fe_3O_4 -NPs liegen bei einer Größe von 5-20 nm superparamagnetisch vor. Größere Fe_3O_4 -NPs sind ferromagnetisch.

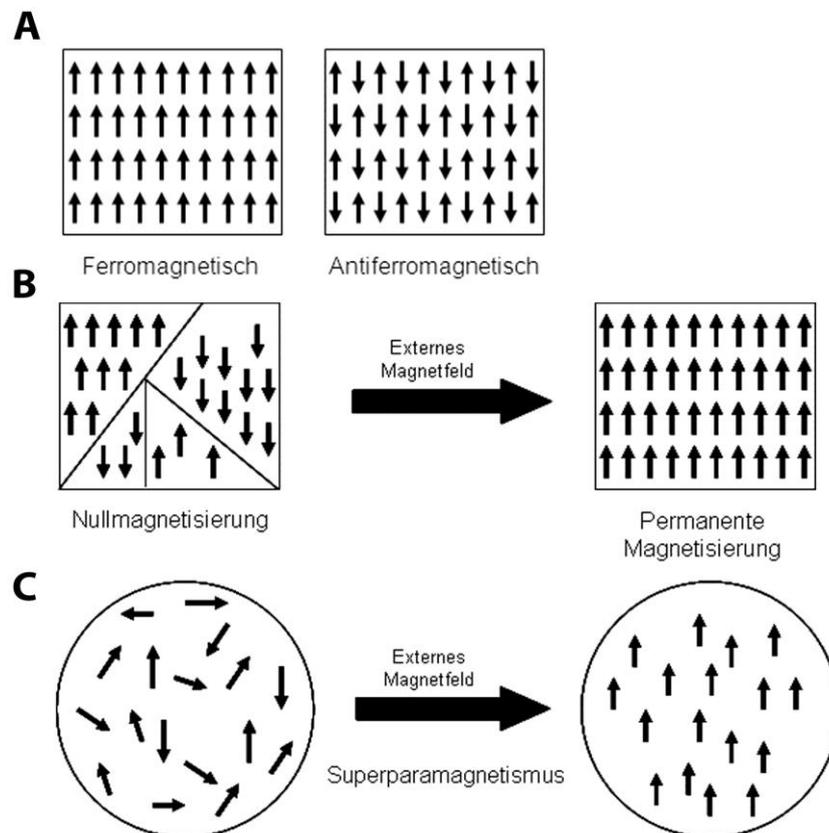


Abbildung 7: Anordnung der Spins bei verschiedenen Magnetisierungen. Ferromagnetische Stoffe weisen wie in (A, li) parallel, gleichgerichtete Spins auf während bei antiferromagnetischen Stoffe eine parallele, aber entgegengesetzt gerichtete Anordnung vorliegt (A, re). Bei Stoffen mit Nullmagnetisierung heben sich die Magnetisierungen der Spins einzelner Domänen auf. Durch das Anlegen eines starken externen Magnetfeldes richten sich die Spins gleich aus und ergeben eine permanente Magnetisierung des Stoffes (B). Bei NPs liegen Substanzen oft nur noch im Einzeldomänenbereich vor und sind superparamagnetisch. Innerhalb der Domänen fluktuiert die Ausrichtung der Spins, so dass keine Magnetisierung auftritt. Für die Dauer des Einflusses durch ein externes Magnetfeld richten sich die Spins gleich aus und die NPs werden magnetisch (C).

1.4.1.2 Funktionalisierung und Anwendungen

Durch zusätzliche Beschichtung der NP-Oberfläche mit chemischen Gruppen, organischen Molekülen oder Antikörpern können ihre Eigenschaften zusätzlich modifiziert werden; sie werden funktionalisiert.

Nicht zusätzlich beschichtete magnetische Fe_3O_4 -NPs weisen hydrophobe Oberflächen auf. Aufgrund dieser kommt es zur Zusammenlagerung der einzelnen NPs zu größeren Klumpen. Dies führt zu ferromagnetischen Eigenschaften und zur Ausbildung von magnetischen Anziehungskräften zwischen den einzelnen Klumpen (Ditsch et al., 2005). Nicht zusätzlich beschichtete NPs neigen also zur Aggregation und mit zunehmender Größe der Klumpen zum Ausfallen aus einer Lösung. Um diesen Effekt zu verhindern, werden Oberflächen von NPs mit Tensiden, Polymeren oder anorganischen Molekülen umgeben. Häufig verwendete Beschichtungen bestehen aus Polyethylenglycol, Dextran, Gelatine, Polyacrylsäure, Polypeptiden aber auch Silika und Gold (Gupta und Gupta, 2005). Diese Moleküle werden über Konjugation funktioneller Gruppen an die Oberfläche der NPs gebunden. An die Beschichtungen können nun wiederum Proteine, Nukleinsäuren, andere Moleküle und sogar Antikörper gebunden werden. Vor allem in den Lebenswissenschaften und in der Medizin eröffnen sich dadurch eine Reihe von neuen Behandlungs- und Verwendungsmöglichkeiten (Gupta und Gupta, 2005; Shubayev et al., 2009).

Eine der ersten Anwendungen von Fe_3O_4 -NPs in der Medizin war der Einsatz als Kontrastmittel in der Magnet-Resonanz-Tomografie (MRT). Durch das Binden zellspezifischer Liganden ergibt sich zudem die Möglichkeit, Zellen zu markieren und damit Tumore im MRT besser zu lokalisieren (Fleige et al., 2001; Dunning et al., 2006; Chertok et al., 2008). Intensive Forschung gibt es auch zur gezielten Tumorthherapie mit Hilfe von NPs, die zusätzlich mit Medikamenten funktionalisiert werden (Brannon-Peppas und Blanchette, 2012). Ein anderer Ansatz ist die Hyperthermie. Hier werden superparamagnetische NPs in Gehirntumore eingeschleust und durch ein äußeres, wechselndes starkes Magnetfeld erhitzt. Die NPs erzeugen dabei eine zytotoxische Wärme, die lokal auf die Tumorzellen beschränkt bleibt (Jordan et al., 1999; Jordan et al., 2001). 2010 wurde die erste europäische Zulassung für die Nano-Krebs® Therapie der MagForce Nanotechnologies AG erteilt.

Auch die Anwendung bei der Regeneration von Axonen wird intensiv beforscht. Neben Studien zum verbesserten Neuritenwachstum in PC12-Zellen (Zelllinie aus einem Ratten-Nebennieren-Pheochromozytom) (Mittnacht et al., 2010; Kim et al., 2011), der Beeinflussung von regenerationsunterstützenden Schwannzellen mit siRNA-beschichteten NPs (Nichterwitz et al., 2010; Hoffmann et al., 2011), wurden auch Studien an komplexeren Zellkultursystemen durchgeführt. Hamasaki et al., 2007 markierte z. B. neuronale Vorläuferzellen mit magnetischen NPs und schleuste diese in organotypische Ko-Kulturen aus Kortex und Rückenmark ein. Durch ein angelegtes externes Magnetfeld wurde ein stärkeres Axonwachstum vom Kortex in das Rückenmark erzielt als in Ko-Kulturen, die nicht mit einem Magnetfeld behandelt wurden.

1.4.1.3 ERA-Net Projekt MARVENE - magnetic nanoparticles for nerve regeneration

Das von mir in Zusammenarbeit mit anderen internationalen Gruppen aus Italien, Spanien und Großbritannien bearbeitete ERA-Net Projekt MARVENE befasste sich mit der Möglichkeit, magnetische NPs zur Unterstützung und Verbesserung der Regeneration im Nervensystem zu nutzen. Die Idee war, die magnetischen NPs mit Hilfe eines externen Magnetfeldes zur Lenkung von neu auswachsenden Neuriten zu nutzen. Dazu sollten sie in die regenerierenden Axone eingebracht werden und durch das externe Magnetfeld in Richtung des distalen Nervenendes gezogen werden. Eine physikalische Führung bzw. Lenkung regenerierender Axone ist ein wichtiger Punkt in der erfolgreichen Regeneration peripherer Nerven. Die aus Schwannzellen formierten Büngnersche Bänder ermöglichen es den Axonen, die Verbindung zum distalen Nerven wiederherzustellen. Selten ist jedoch die Verbindung erfolgreich. Oft wachsen mehrere Wachstumskegel aus und bilden zufällige Synapsen. Dies resultiert in einer unzureichenden funktionellen Genesung der Patienten. Die zielgerichtete Einschleusung magnetischer NPs in die neu auswachsenden Axone und ihre Ausrichtung im externen magnetischen Feld könnte bei der Lösung dieses Problems helfen.

1.5 Minozyklin

Pharmakologische Therapien bei Rückenmarksverletzungen und Verletzungen peripherer Nerven werden besonders intensiv erforscht. Bei akuten Rückenmarksverletzungen ist die Verwendung von Methylprednisolon mittlerweile klinischer Standard, um sekundär ablaufende Entzündungsprozesse zu verringern. Allerdings wird der Einsatz von Kortikosteroiden immer mehr in Frage gestellt, da klinische Studien keine überzeugende verbessernde Wirkung belegen konnten, die den Einsatz trotz hoher Risiken der Nebenwirkungen rechtfertigen (Baptiste und Fehlings, 2006; Lim und Tow, 2007; Stahel et al., 2012). Ein weiterer Hoffnungsträger, zu dem erste klinische Studien durchgeführt werden, ist das Minozyklin (Kwon et al., 2011; Casha et al., 2012).

Minozyklin ist ein semisynthetisches Tetrazyklin (Abbildung 8) mit antibiotischen Funktionen. Diese beruhen auf der Inhibierung der bakteriellen Proteinbiosynthese. Das Einsatzgebiet reicht von schweren Formen der Akne bis zu Erkrankungen der Atemwege.

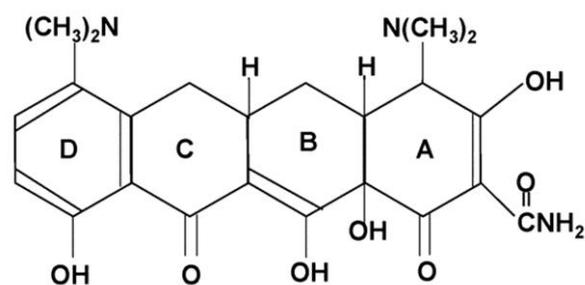


Abbildung 8: Strukturformel von Minozyklin.

Zusätzlich zu den antibiotischen Wirkungen werden in der Literatur auch neuroprotektive und antiinflammatorische Eigenschaften des Minozyklins beschrieben. Zahlreiche *in vivo*-Studien lassen vermuten, dass Minozyklin die funktionellen Ergebnisse bei zerebraler Ischämie, Amyotropher Lateraler Sklerose, Morbus Parkinson, Chorea Huntington, Multipler Sklerose und Rückenmarksverletzungen verbessern könnte (Kim und Suh, 2009; Plane et al., 2010). Z. B. zeigten Ratten mit einer inkompletten Kompressionsverletzung des Rückenmarks nach Minozyklinbehandlung eine Reduktion der Läsion und wiesen weniger apoptotische Marker auf als Kontrolltiere ohne Minozyklinbehandlung (Lee et al., 2003). Eine andere Rattenstudie berichtete von einer verbesserten Wiederherstellung der motorischen Funktion und einer Abschwächung der mechanischen Hyperalgesie durch Minozyklin nach einer Hemisektion des Rückenmarks (Cho et al., 2011). Ähnliche

Ergebnisse konnten auch in Mäusen mit extraduraler Kompression des Rückenmarks gefunden werden (Wells et al., 2003).

Aufgrund der vielfältigen, positiven Ergebnisse in Tierversuchen startete 2004 eine klinische Studie mit Minozyklin an Patienten mit Rückenmarksverletzungen. Die ersten Ergebnisse dieser Humanstudie wurden 2012 veröffentlicht (Casha et al., 2012). Dabei zeigte sich, dass vor allem Patienten mit zervikaler Verletzung des Rückenmarks profitierten, aber nicht Patienten mit thorakalen Verletzungen. Patienten mit zervikaler Rückenmarksverletzung wiesen nach einer Minozyklinbehandlung einen signifikant besseren Status bei der klinischen Bewertung von Sensorik und Motorik auf als Patienten, welche ein Placebo erhielten. Allerdings konnte keine generelle signifikant funktionelle Verbesserung bei den Minozyklinpatienten nachgewiesen werden.

Die Mechanismen der antiinflammatorischen und neuroprotektiven Wirkung von Minozyklin sind noch nicht vollständig aufgeklärt. Die antiinflammatorische Wirkung scheint vor allem auf einer Inhibierung von Mikroglia zu beruhen. Diese resultiert in einer Inhibition des p38 MAPK Signalweges (Tikka et al., 2001; Cui et al., 2008), der Reduktion von β -Integrin und Kv1.3 Kaliumkanälen (Nutile-McMenemy et al., 2007), der Reduktion von Matrix-Metalloproteinasen (Machado et al., 2006) und der Prostaglandin E Synthase (Silva Bastos et al., 2011) sowie einer Verlangsamung der Zellmotilität (Nutile-McMenemy et al., 2007).

Antiapoptotische Minozyklinwirkungen scheinen über die Verringerung der Öffnungswahrscheinlichkeit der mitochondrialen Permeabilitätspore (Gieseler et al., 2009), über eine Reduktion der Ca^{2+} -Aufnahme unter Stressbedingungen (Garcia-Martinez et al., 2010), eine verringerte Bildung von ROS (Garcia-Martinez et al., 2010; Chen-Roetling et al., 2009) und die Inhibierung des p38 MAPK Signalweges vermittelt zu werden (Pi et al., 2004; Guo und Bhat, 2007).

Trotz aller Studien, die einen positiven Effekt des Minozyklins bei neurodegenerativen Erkrankungen und Verletzungen des ZNS und PNS zeigen, ist die neuroprotektive Wirkung des Minozyklins umstritten (Diguët et al., 2004b). Einige Studien zeigten das genaue Gegenteil. Minozyklin verstärkte z. B. den schädigenden Effekt von 1-Methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridin (MPTP) auf dopaminerge Neurone (Yang et al., 2003). In Tiermodellen für Morbus Parkinson und Huntington erhöhte Minozyklin den Verlust dopaminergere Nervenenden und den Zelltod (Diguët et al., 2004a). In einem anderen Tiermodell für Amyotrophe Lateral Sklerose führte der Einsatz von Minozyklin nach

Krankheitsausbruch zu einer verstärkten Neuroinflammation und einem veränderten Gliaverhalten (Keller et al., 2011). In Versuchen an isolierten Rattenmitochondrien induzierte Minozyklin eine verstärkte Schwellung und die Freisetzung von Cytochrom C (Kupsch et al., 2009). Im PNS führte Minozyklin zu einer Verlangsamung der Wallerschen Degeneration und daraus resultierend einer verminderten Nervenregeneration (Keilhoff et al., 2007).

1.6 Ziel der Arbeit

Die Entwicklung alternativer Versuchsmodelle für die Untersuchung von Verletzungen des Rückenmarks und der peripheren Nerven rückt immer mehr in den Fokus der klinisch-theoretischen Forschung. Das Ziel dieser Arbeit war es, ein *in vitro*-System zu etablieren, das axonale Verletzungen des Rückenmarks, aber auch peripher Nerven widerspiegelt. Gleichzeitig sollte die Untersuchung pharmakologischer Substanzen einfach zu handhaben sein und eine verlässliche Auswertung und Beurteilung erlauben.

Die in 1.3 vorgestellte organotypische Rückenmarkskultur und die darauf aufbauende organotypische Ko-Kultur aus Rückenmark und peripherem Nerv stellen ein solches Modell dar. Die Rückenmarksschnitte ermöglichen es, Motoneurone und Glia nach einer Axotomie zu betrachten. Durch die Ko-Kultivierung der Schnitte mit Stücken peripherer Nerven lassen sich auch Verletzungen des PNS und ihre Auswirkungen auf Motoneurone simulieren. Die Dicke der Rückenmarksschnitte vereint die Vorteile des Erhalts der 3-D-Gewebestruktur mit einer guten Anfärbbarkeit und Mikroskopierbarkeit von Zellen und zellulären Strukturen. Als erstes stellte sich mir also die Aufgabe, diese beiden Kultursysteme gut reproduzierbar zu etablieren. Danach sollten sie genutzt werden, um potentiell regenerationsfördernde Substanzen zu testen. Zu meinen Aufgaben gehörte deshalb auch, nachvollziehbare Analysemethoden zu entwickeln, die eine Aussage zum Überleben von Motoneuronen und anderen Neuronen sowie der Regeneration von Axonen erlauben. Als erste zu untersuchende Substanz dienten magnetische NPs. Da der biologische Einsatz von NPs relativ neu ist, wurden zunächst eine Reihe von Vorversuchen an cerebellaren Mischkulturen und Schwanzzell-Kulturen durchgeführt. Diese sollten klären, ob die NPs in primären Zellkulturen des ZNS und PNS überhaupt nutzbar sind und wie sie von den unterschiedlichen Zellelementen aufgenommen werden. Nach den Vorversuchen sollten die NPs in die organotypischen Rückenmarkskulturen und Ko-Kulturen eingebracht werden, um letztendlich zu testen, ob Motoneurone NPs

aufnehmen und es möglich ist, regenerierende Axone damit zu beladen und durch ein externes Magnetfeld zu lenken.

Die zweite zu testende Substanz war das Antibiotikum Minozyklin. Seine in einer Reihe von Tiermodellen beschriebene neuroprotektive Wirkung umstritten. Aufgrund der Literatur ließ sich trotzdem zunächst auf eine erhöhte Überlebensrate von Neuronen in den organotypischen Kulturen hoffen und damit auch auf eine verbesserte Regenerationsfähigkeit der durch die Präparation beschädigten Axone. Um Aussagen über die Wirkung von Minozyklin auf das Überleben von Motoneuronen und ihre Axonregeneration in den organotypischen Rückenmarkskulturen treffen zu können, sollten die zuvor etablierten Analysemethoden genutzt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Tiere

Für die Zellkulturexperimente wurden 2-8 Tage alte Rattensäuglinge (Wistar, Harlan-Winkelmann; Borchon, Deutschland, Zucht des zentralen Tierlabors der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke Universität Magdeburg) aus Dauerverpaarungen verwendet. Die Ratten wurden unter kontrollierten Bedingungen (Temperatur 21 ± 1 °C, Luftfeuchtigkeit 50-65 %) mit einem Hell-Dunkel-Rhythmus von je 12 h (06.00-18.00 Uhr) und freiem Zugang zu Futter und Wasser gehalten. Alle Experimente wurden durch die Tierschutzkommission des Landes Sachsen-Anhalt genehmigt (IBZ_G-02-946-09; AZ: 2-946 Otto-von-Guericke Universität Magdeburg).

2.1.2 Chemikalien, Lösungen, Verbrauchsmaterialien und Geräte

Verwendete Chemikalien, Lösungen, Verbrauchsmaterialien und Geräte sind im Anhang A aufgelistet und beschrieben.

2.1.3 Magnetische NPs

Die Versuche mit magnetischen NPs erfolgten zunächst mit kommerziell produzierten NPs. Diese ermöglichten den Einsatz größerer Mengen, eine gleichbleibende Qualität und die Nutzung fluoreszierender und nicht fluoreszierender NPs. Daneben wurde ein Teil der Experimente im Rahmen eines ERA-NET geförderten Projektes MARVENE mit nichtkommerziellen magnetischen NPs durchgeführt. Die Entwicklung und die biologische Charakterisierung dieser NPs wurde in Zusammenarbeit aller am Projekt beteiligten Partner durchgeführt (Italien: Medizinisches wissenschaftliches Labor der Scuola Superiore di Studi Universitari e Perfezionamento Sant'Anna (SSSA, finale Funktionalisierung), Spanien: Aragon Institut für Nanowissenschaften der Universität Saragossa (INA, Produktion der NP), Großbritannien: Institut für medizinische Forschung und Technologie der Universität Dundee (IMSAT), Deutschland: Institut für Biochemie und Zellbiologie der Otto-von-Guericke Universität Magdeburg). Im Rahmen meiner

Arbeit untersuchte ich beide NPs auf ihre Anwendungsmöglichkeiten in primären *in vitro*-Systemen des ZNS und PNS.

2.1.3.1 Kommerzielle magnetische NPs

Kommerzielle NPs (k-NPs) wurden von der Firma Chemicell (Berlin, Germany) bezogen. Sie bestanden aus einem inneren Fe_3O_4 -Kern, den eine Polymerschicht aus Glucuronsäure (fluidMAG-ARA, 4115, Chemicell) umgab. Sie verhinderte die NP-Aggregation und erlaubte zusätzlich die Bindung anderer Moleküle über funktionelle Gruppen. Die ferromagnetischen NPs hatten einen hydrodynamischen Durchmesser von 200 nm. Für die mikroskopische Analyse wurden mit grüner Fluoreszenz gekoppelte fluidMAG-ARA (nano-screenMAG-ARA, 4415, Chemicell) NPs ausgewählt. Diese wiesen dieselben Eigenschaften auf, hatten jedoch zwischen dem Fe_3O_4 -Kern und der Glucuronsäurehülle noch einen grünen fluoreszierenden lipophilen Farbstoff gebunden.

2.1.3.2 Nichtkommerzielle NPs

Polyethylenimin-NPs (PEI-NPs) wurden im INA nach der Methode der oxidativen Hydrolyse (Andrés Vergés et al., 2008) synthetisiert. Dabei präzipitierten Fe_3O_4 -NPs aus einem Eisensalz in einem basischen Medium unter Hilfe eines milden Oxidationsmittels.



Die Synthese ist in Abbildung 9 dargestellt.

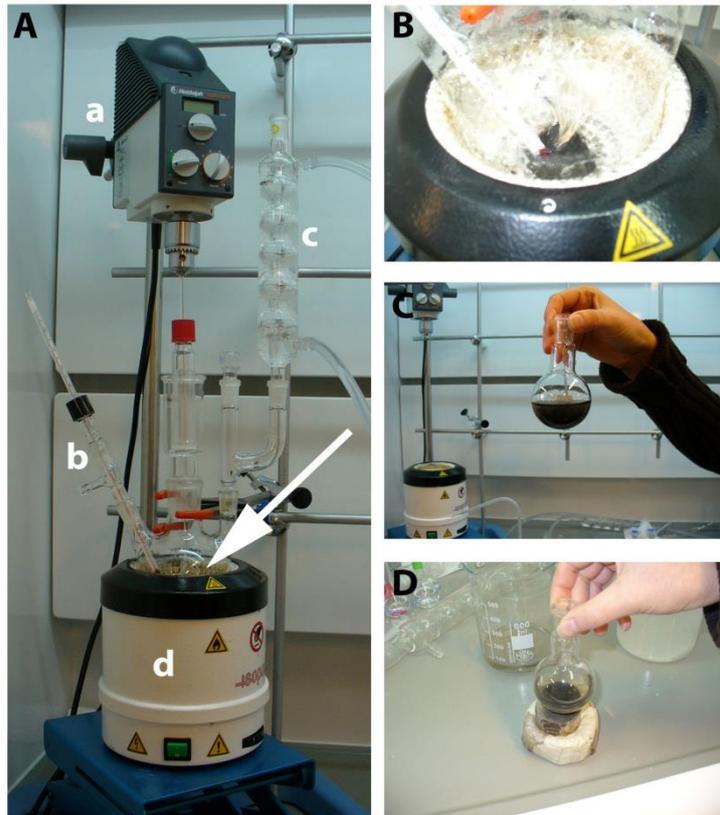


Abbildung 9: Synthese von PEI-NPs. (A) zeigt den Reaktionsaufbau für die Synthese von PEI-NPs. Dieser besteht im Wesentlichen aus (a) dem Rührer, (b) einem Thermometer zur Temperaturkontrolle, (c) einem Kühler, um entstehenden Wasserdampf zu kondensieren und (d) einem Heizpilz. (B) zeigt das Präzipitat während der Synthese, (C) das Präzipitat nach der Synthese und (D) die Separierung magnetischer Bestandteile des Präzipitats mit Hilfe eines starken Magneten.

Die NPs wurden mit Hilfe eines Transmissionselektronenmikroskops (FEI Tecnai T20 Mikroskop, Hillsboro, USA) charakterisiert. Die durchschnittliche NP-Größe betrug 25 ± 5 nm (Abbildung 10 C). Sie besaßen eine oktaedrische Morphologie und waren mit einer dünnen Schicht PEI überzogen (Abbildung 10 A und B). Diese PEI-Beschichtung ermöglichte eine zusätzliche Bindung organischer Moleküle wie z. B. Wachstumsfaktoren.

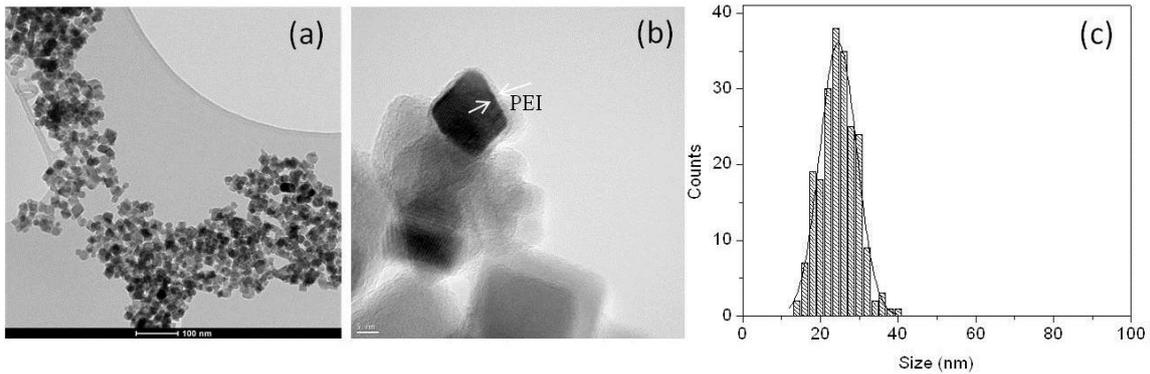


Abbildung 10: Charakterisierung der PEI-NPs. (A) Elektronenmikroskopische Aufnahme der PEI-NPs. (B) Vergrößerung, bei der die Beschichtung mit PEI erkennbar ist (Pfeile). (C) Größenverteilung der synthetisierten PEI-NPs. Abbildung übernommen aus Calatayud et al. (2013).

Um eine zellspezifischere Aufnahme zu erreichen, wurden die NPs in Kooperation mit dem SSSA zusätzlich mit GDNF funktionalisiert. Ziel war es eine stabile Bindung von GDNF über PEI an die NPs und eine Bindung des grün fluoreszierenden Alexa 488 Moleküls für die mikroskopische Analyse zu erreichen. Zur Stabilisierung wurden zusätzlich bovines Serumalbumin (BSA) und 15 % Glycerin (Gly) zugefügt.

2.1.4 Minozyklin

Minozyklin-Stammlösung wurde hergestellt, indem 5 mg Minozyklinhydrochlorid (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) in 1 ml steriler phosphatgepufferter Saline (PBS) gelöst wurden. Da Minozyklinhydrochlorid eine molare Masse von 494 g/mol besitzt, ergeben 494 mg/ml eine Molarität von 1 M, 5 mg/ml von 10 mM (Stammlösung) und 50 µg/ml von 100 µM.

Um die für die Versuche notwendigen Konzentrationen von 10 µM und 100 µM zu erhalten, wurde die Stammlösung in den jeweiligen Medien verdünnt. Die beiden Konzentrationen resultierten aus verschiedenen vorangegangenen *in vitro*-Studien (Machado et al., 2006; Haroon et al., 2007; Keilhoff et al., 2008; Kupsch et al., 2009; Gieseler et al., 2009).

2.2 Zellkulturen

2.2.1 Disperse Zellkulturen

2.2.1.1 Cerebellare Mischkulturen

Für die cerebellaren Mischkulturen wurden alle verwendeten Zellkulturplastiken mit sterilem poly-D-Lysin (PDL, 0,1 mg/ml) für 30 min inkubiert und anschließend mit sterilem Aqua dest. gründlich gespült.

Das Anlegen der Kulturen erfolgte aus den Cerebelli von 5-8 Tage alten Rattensäuglingen. Die Tiere wurden unter sterilen Bedingungen dekapitiert und die Schädel gewaschen (70 % Ethanol und PBS). In Präparationsmedium (DMEM-PM; Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM), 6 g/l D-Glukose, 1 % Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep)) wurden die Cerebelli entnommen und von den Meningen befreit. Das Hirngewebe wurde mechanisch mit 18 und 23 Gauge-Kanülen dissoziiert und für 5 min bei 300 x g abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in DMEM-Kultivierungsmedium (DMEM-KM; DMEM, 10 % fötales Kälberserum (FKS), 6 g/l D-Glukose, 1 % Pen/Strep) resuspendiert und die Zellen erneut mit einer 18 Gauge-Kanüle dissoziiert. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mittels einer Neubauer-Zählkammer oder dem Fluorescence activated cell sorting (FACS). Die Zellen wurden je nach Experiment in unterschiedlicher Zelldichte ausgesät und bei 37 °C und 5 % CO₂ Atmosphäre inkubiert. Nach 1-2 Tagen *in vitro* (day *in vitro*, DIV) wurde das Medium erneut gewechselt, um restliche Zelltrümmer zu entfernen.

Granularzellen lassen sich länger kultivieren, wenn sie dauerhaft depolarisiert sind (Gallo et al., 1987). Dafür wurde DMEM-KM mit 25 mM KCl versetzt. Die so kultivierten Zellen werden nachfolgend als „neuronenangereichert“ bezeichnet. Eine Quantifizierung der Kulturzusammensetzung mit Hilfe einer immunzytochemischen Färbung (s. Kapitel 2.4.1.1.3) ergab an DIV 4 50,8 ± 12,2 % Granularzellen und Neurone (Mittelwert ± Standardabweichung), 4,4 ± 8,2 % Astroglia, 15,1 ± 10,1 % Mikroglia und noch keine Oligodendroglia. Diese entwickelt sich erst ab DIV 8 (Levi et al., 1987; Aloisi et al., 1988; Rakowicz et al., 2002).

DMEM-KM ohne KCl-Zusatz begünstigt dagegen die gliale Fraktion der Mischkulturen. Die in diesem Medium kultivierten Zellen werden nachfolgend als „gliareich“ bezeichnet. Die Quantifizierung ihrer Kulturzusammensetzung an DIV 10 ergab 0,6 ± 1,4 %

Granularzellen und Neurone, $59,0 \pm 23,7$ % Astroglia, $49,4 \pm 19,3$ % Mikroglia und $1,9 \pm 3,5$ % Oligodendroglia.

2.2.1.2 Kortikale gliale Mischkulturen

Primäre kortikale gliareiche Mischkulturen wurden aus dem Kortex von 2-4 Tage alten Rattensäuglingen gewonnen. Dafür wurden die Ratten dekapitiert, die Schädel in 70 % Ethanol aufgefangen und unter die sterile Werkbank überführt. Alle weiteren Arbeitsschritte erfolgten steril. Das Gehirn wurde von Meningen befreit. Der Kortex wurde separiert und mechanisch mit 18 und 23 Gauge-Kanülen dissoziiert. Die Zellsuspension wurde für 5 min bei $300 \times g$ abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in Astroglia-DMEM-KM (DMEM, 10 % FKS, 4,5 g/l D-Glukose, 1 % Pen/Strep) resuspendiert. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mittels einer Neubauer-Zählkammer oder dem FACS. Die Zellen wurden zunächst in mit PDL beschichteten Zellkulturplastikflaschen ausgesät und bei 37 °C und 5 % CO₂ Atmosphäre im Inkubator aufbewahrt. Nach 2-3 DIV wurde das Medium erneut gewechselt, um restliche Zelltrümmer zu entfernen. Nach 11-14 DIV wurden die Zellen auf Serum-reduziertes Astroglia-DMEM-KM mit 3 % FKS umgestellt und für die Experimente genutzt (Saadoun et al., 2005). Die Zellkulturen enthielten zum Zeitpunkt der Experimente $60,9 \pm 19,0$ % Astroglia, $20,0 \pm 12,2$ % Mikroglia, $1,5 \pm 1,1$ % Oligodendroglia und $1,4 \pm 3,0$ % Granularzellen und Neurone.

2.2.1.3 Schwannzell-Kulturen

Die Zellkulturschalen für Schwannzell-Kulturen wurden mit Laminin (0,05 mg/ml) beschichtet und ohne Waschschrift im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ Atmosphäre bis zur Verwendung getrocknet.

Für die Präparation der Schwannzellen wurden 5-8 Tage alte Rattensäuglinge verwendet. Nach der Dekapitation unter sterilen Bedingungen wurde der Rumpf gewaschen (70 % Ethanol, PBS), die Wirbelsäule freipräpariert und das Rückenmark entfernt. Danach wurden die sich zwischen den Wirbeln befindlichen Spinalganglien entnommen und für 3-4 h in einem Mix aus 2 ml DMEM-PM, 2 ml Dispase II (1,25 U/ml), 100 µl Hyaluronidase (0,1 %) und 40 µl Kollagenase (0,05 %) inkubiert. Anschließend folgten die mechanische Dissoziation mit 18 und 23 Gauge-Kanülen, ihre Kollektion durch Zentrifugation (10 min, 300 g) und die Resuspension in DMEM-KM. Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauerzählkammer oder dem FACS ermittelt und die Zellen in einer dem Experiment entsprechenden Zelldichte ausgesät. Die Kulturen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂

inkubiert. Nach 1-2 DIV wurde das Medium erneut gewechselt um restliche Zelltrümmer zu entfernen.

Die Quantifizierung der Kulturzusammensetzung ergab an DIV 7 $62,7 \pm 17 \%$ Schwanzzellen und $37,3 \pm 17 \%$ Fibroblasten.

2.2.1.4 Organotypische Zellkulturen

2.2.1.4.1 Rückenmarkskulturen

Organotypische Rückenmarkskulturen wurden aus 3-5 Tage alten Rattensäuglingen nach einem modifizierten Protokoll von Vyas et al. (2010) präpariert. Dafür wurden die Rattensäuglinge dekapitiert und der Rumpf in 70 % Ethanol aufgefangen. Nach der Überführung unter die sterile Werkbank erfolgten alle weiteren Arbeitsschritte unter sterilen Bedingungen. Die Wirbelsäulen wurden herausgelöst und in eisgekühlten Rückenmarkspuffer (RM-P, Hank's balanced salt solution (HBSS), 33,3 mM D-Glukose, 10 mM 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES), 5,8 mM MgSO_4 , 4,3 mM NaHCO_3 , 0,03 % BSA, 1 % Pen/Strep) aufgefangen. Die Wirbel wurden geöffnet, das Rückenmark von den Meningen befreit, herausgelöst und in eisgekühltem RM-P von den Nervenwurzeln befreit. Nun wurde es in einen zervikal-thorakalen und einen lumbal-sakralen Teil geteilt. Der lumbal-sakrale Anteil wurde mit Hilfe eines McIlwain Tissue Chopper in 350 μm dicke Schnitte zerteilt. Pro Tier konnten bis zu 10 lumbale Schnitte separiert werden. Diese wurden anhand des Durchmessers der Schnittfläche von sakralen Schnitten unterschieden. Nur die Schnitte mit dem größten Durchmesser der Schnittflächen wurden für die Kultivierung ausgewählt. Die Kultivierung erfolgte nach der von Stoppini et al. (1991) beschriebenen Methode, bei der die organotypischen Kulturen auf porösen, transparenten Kunststoffmembranen mit Luft- und Medienkontakt kultiviert werden. Je 2 bis 6 Schnitte wurden daher auf einen Millicell-Membraneinsatz in 1 Well einer 6-Well Platte gelegt. Der Raum zwischen Wellboden und Membraneinsatz wurde mit 1 ml Rückenmarksmedium (RM-M, 50 % Eagle's minimal essential medium (MEM), 25 % HBSS, 25 % FKS, 35 mM D-Glukose, 25 mM HEPES, 2 mM L-Alanin-L-Glutamin, 1 % Pen/Strep, 100 ng/ml GDNF) befüllt und der Membraneinsatz mindestens 2 h im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO_2 Atmosphäre vor der Verwendung inkubiert.

2.2.1.4.2 Ko-Kulturen aus Rückenmark und peripherem Nerv

Für die organotypischen Ko-Kulturen wurden zusätzlich periphere Nervenstücke benötigt, die aus den Nervi ulnaris/medianus der Vorderextremitäten der gleichen Tiere gewonnen und in eisgekühltem DMEM-PM gesammelt wurden. Nach dem Zerschneiden in ca. 2-5 mm lange Teile wurden die einzelnen Nervenstücke mit einer möglichst geraden Schnittkante an den Ursprung der Ventralwurzel der bereits vorbereiteten Rückenmarksschnitte angelegt. Die Nervenstücke wurden schließlich der Länge nach gerade ausgerichtet und die Kulturen anschließend zurück in den Inkubator überführt. Die organotypischen Kulturen bzw. Ko-Kulturen wurden im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ Atmosphäre für bis zu 8 Tagen kultiviert. Dabei erfolgte ein erster Wechsel des Mediums nach 24 h und später nach jeweils weiteren 2-3 Tagen.

2.3 Intervention

2.3.1 Magnetische NPs

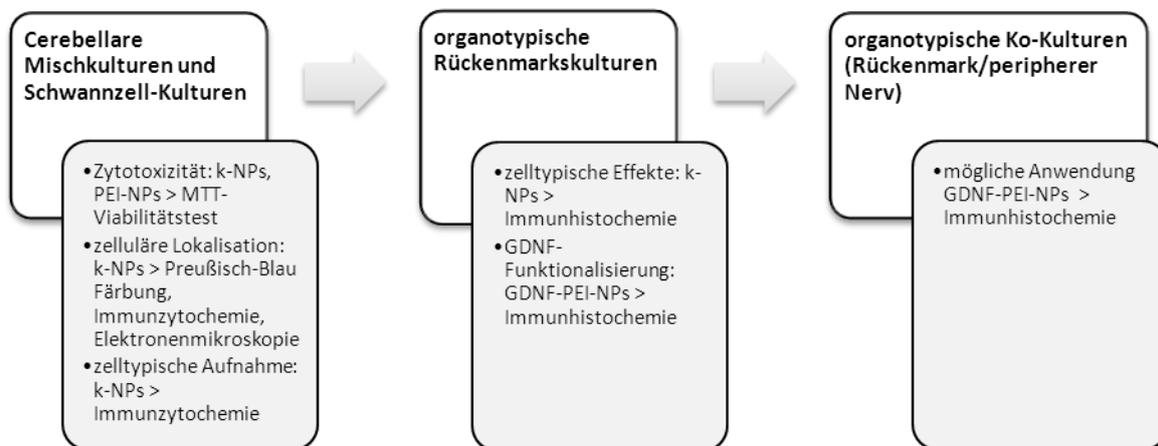


Abbildung 11: Experimenteller Aufbau zur Untersuchung magnetischer NPs. Voruntersuchungen zur Zytotoxizität, Viabilität, Lokalisation und zelltypischer Aufnahme wurden hauptsächlich an k-NPs durchgeführt (li). Darauf aufbauend folgten Experimente an organotypischen Rückenmarkskulturen mit k-NPs und GDNF-PEI-NPs (Mitte). Als letztes wurden GDNF-PEI-NPs an organotypischen Ko-Kulturen untersucht, um mögliche Standardprozeduren für die Anwendung zu erproben (re).

2.3.1.1 Disperse Kulturen

2.3.1.1.1 k-NPs

Cerebellare Misch- und Schwanzzell-Kulturen wurden für die Preußisch-Blau-Färbung und die elektronenmikroskopische Analyse mit 10 µg/ml k-NPs inkubiert. Für die immunzytochemische Analyse wurde die Konzentration der NPs auf 50 µg/ml (24 h) erhöht.

Für den Viabilitätstest mit MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) wurden steigende Konzentrationen von NPs verwendet: 1, 5, 10, 20 und 50 µg/ml für die Dauer von 24 oder 72 h.

Kontrollen wurden parallel geführt und erhielten keine NPs im Medium.

2.3.1.1.2 PEI-NPs

Da die verfügbare Menge der PEI-NPs gering war, wurden sie lediglich im Viabilitätstest eingesetzt. Dafür wurden cerebellare Misch- und Schwanzzell-Kulturen für 24 oder 72 h mit 1, 5, 10, 20 und 50 µg/ml PEI-NPs inkubiert.

Kontrollen wurden parallel geführt und erhielten keine NPs im Medium.

2.3.1.2 Organotypische Kulturen

2.3.1.2.1 k-NPs

Die Kulturen erhielten von DIV 0 bis zum Ende der Kultivierung RM-M mit 50 µg/ml k-NPs. Kontrollkulturen wurden parallel kultiviert und erhielten partikelfreies RM-M über den gesamten Kultivierungszeitraum.

2.3.1.2.2 PEI-NPs

Um die Funktionalisierung der PEI-NPs mit GDNF zu überprüfen, wurden zunächst organotypische Kulturen mit folgenden Medien über den gesamten Kultivierungszeitraum inkubiert:

- mit RM-M (Kontrolle100, Medium enthält 100 ng/ml GDNF) als Kontrolle der Präparations- und Kultivierungsbedingungen
- mit reduziertem RM-M (Kontrolle50, Medium enthält 50 ng/ml GDNF), da die Menge an GDNF, die an die NPs gebunden war, im Vergleich zum RM-M reduziert war

- mit Mediumüberstand von GDNF-PEI-NPs, die zuerst in Null-RM-M (kein GDNF) suspendiert und anschließend wieder getrennt wurden (Überstand GDNF-PEI-NPs)
- mit in Null-RM-M erneut resuspendierten GDNF-PEI-NPs (resuspendierte GDNF-PEI-NPs).

Für die beiden letzten aufgeführten Medien wurden 10 µg/ml GDNF-PEI-NPs in Null-RM-M verdünnt und für 1 h bei 4 °C stehend inkubiert. Die NPs wurden mit Hilfe eines Neodym-Magneten aus dem Medium separiert. Mit Hilfe der organotypischen Ko-Kulturen sollten als nächstes die Anwendungsmöglichkeiten der funktionalisierten GDNF-PEI-NPs im Hinblick auf das Überleben von Motoneuronen und eine Verbesserung des gerichteten Neuritenwachstums in ein peripheres Nerventransplantat untersucht werden. Dafür wurden folgende parallel behandelten experimentellen Gruppen gebildet:

- Kontrolle100
- Kontrolle50
- Kultivierung mit Null-RM-M (Negativkontrolle)
- 2 Kulturen, die mit Null-RM-M + 10 µg/ml GDNF-PEI-NPs inkubiert wurden. Davon wurde 1 Kultur ohne magnetischen Applikator (-MF) und 1 Kultur mit magnetischen Applikator (+MF) inkubiert (GDNF-PEI-NPs - MF oder + MF).

Von 12 Tieren wurde je 1 Rückenmarksschnitt pro Tier in jede experimentelle Gruppe integriert. Für die Kultivierung ausgewählte Rückenmarksschnitte erhielten vor dem Auflegen auf den Millicell-Membraneinsatz eine 30-minütige Inkubation bei 4 °C in RM-P. Dieser enthielt GDNF-PEI-NPs für Schnitte der GDNF-PEI-NP ± MF Gruppen. Dies sollte eine erhöhte Aufnahme der NPs in Gewebe und Zellen ermöglichen. Alle weiteren Schnitte erhielten parallel eine Inkubation mit RM-P, der mit den in den NPs vorkommenden Mengen BSA und Gly versetzt wurde.

Die Applikation eines starken externen Magnetfeldes wurde mit Hilfe eines magnetischen Applikators erreicht, der von unserem spanischen Kooperationspartner INA entwickelt wurde. Er bestand aus einer Vielzahl flacher Neodym-Magnete, die in einem Ring angeordnet waren. Der Ring umfasste eine Petrischale mit 35 mm Durchmesser. Innerhalb des Ringes herrschte durch die Anordnung der einzelnen Magnete ein sehr starkes, homogenes Magnetfeld. Dieses war an beliebigen Punkten der Petrischale, mit dem gleichen Abstand zum Magnetring, identisch. Um das auf die NPs einwirkende

magnetische Feld gleich zu halten, mussten die einzelnen Ko-Kulturen daher alle denselben Abstand zum Ring haben und dieselbe Orientierung der Nervenstücke aufweisen. Dafür wurden die Rückenmarksschnitte mit Hilfe vorgefertigter Markierungen positioniert und an die ventrale Seite (zum Rand ausgerichtet) entlang des Radius des Membraneinsatzes je ein Nervenstransplantat pro Schnitt gerade angelegt.

Der magnetische Applikator wurde an DIV 3 hinzugefügt. Nach einem Medienwechsel wurde der Applikator entfernt und frühestens nach 3 h wieder angelegt, um eine sofortige Entfernung der magnetischen NPs aus dem frischen Medium zu verhindern.

2.3.2 Minozyklin

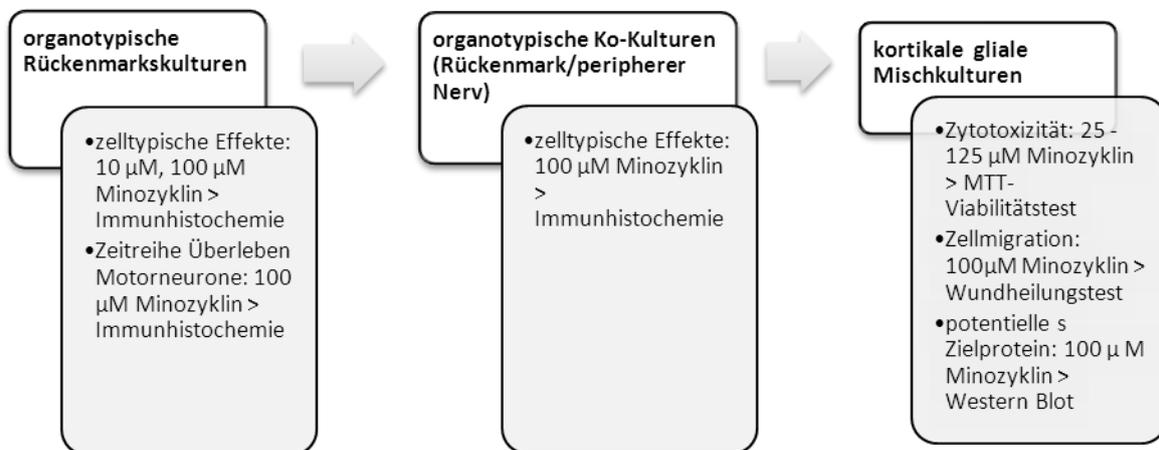


Abbildung 12: Experimenteller Aufbau zur Untersuchung von Minozyklin. Minozyklin wurde zunächst an Rückenmarkskulturen angewendet (li). Aufbauend darauf folgte der Einsatz in organotypischen Ko-Kulturen (Mitte). Da sich aus den Ergebnissen der organotypischen Kulturen eine Reihe von Fragen zum Glia-Verhalten ergaben, wurden zusätzliche Experimente an kortikalen glialen Mischkulturen durchgeführt (re).

2.3.2.1 Disperse Kulturen

Kortikale gliale Mischkulturen wurden für 24 h, 72 h oder 7 Tagen mit 0 (Kontrolle), 25, 50, 75, 100 oder 125 μ M Minozyklin inkubiert und mit Hilfe eines MTT-Viabilitätstests auf zytotoxische Effekte des Minozyklins untersucht. Um Beeinflussungen der glialen Zellmigration näher zu betrachten, wurden die Kulturen für 72 h mit 100 μ M behandelt und in einem Wundheilungstest untersucht. Zellen für die Western Blot Untersuchung wurden ebenfalls für 72 h mit 100 μ M Minozyklin behandelt. Kontrollen wurden parallel gehandhabt, erhielten jedoch kein Minozyklin im Medium.

2.3.2.2 Organotypische Kulturen

Hier wurde Minozyklin in 2 verschiedenen Konzentrationen (10 und 100 μM) eingesetzt. Diese Konzentrationen wurden aufgrund vorheriger Experimente mit primären Schwanzzell-Kulturen (Keilhoff et al., 2008) und *in vivo*-Experimenten zur Regeneration von peripheren Nerven gewählt (Keilhoff et al., 2007). Die Zugabe von Minozyklin zum RM-M erfolgte zu verschiedenen Zeitpunkten der Kultivierung. Die Inkubation startete entweder an DIV 1 oder DIV 4 der Kultivierung und endete mit dem Fixieren an DIV 7. Bei Medienwechsel wurde das frische Medium erneut mit der jeweiligen Konzentration versetzt. Zusätzlich wurde eine Zeitreihe mit der höheren Konzentration von 100 μM Minozyklin durchgeführt. Dafür startete die Inkubation entweder an DIV 1, DIV 3, DIV 4 und DIV 6 und endete mit der Fixierung der Kulturen an DIV 7.

2.4 Verwendete Methoden

2.4.1 Disperse Zellkulturen

2.4.1.1 Magnetische NPs

Alle nachfolgenden verwendeten Methoden zur Untersuchung der zellulären Effekte magnetischer NPs wurden an cerebellaren Misch- und Schwanzzell-Kulturen durchgeführt.

2.4.1.1.1 Viabilitätstest

Der hier verwendete MTT-Viabilitätstest beruht auf der Verstoffwechslung eines gelben, löslichen Tetrazoliumsalzes durch lebende Zellen in unlösliches, violettes Formazan. Nach der Zelllyse lässt sich die Absorption bestimmen. Diese ist dabei proportional zu der Zellzahl der lebenden Zellen. Zytotoxische Effekte von Substanzen können daher anhand der Absorption der behandelten Zellen im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen erkannt werden.

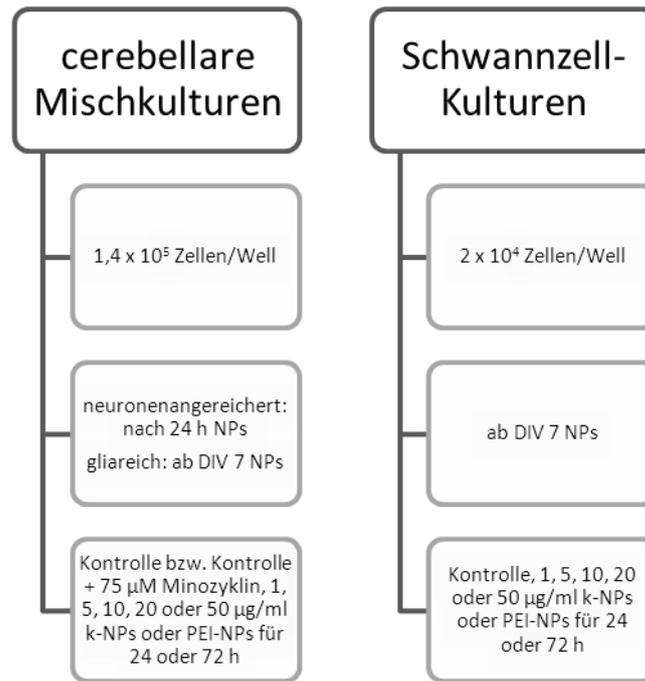


Abbildung 13: MTT-Test mit cerebellaren Misch- und Schwannzell-Kulturen – ausgesäte Zellzahl, Start der Inkubation mit NPs und verwendete Konzentrationen.

Nach Ende der Inkubationszeit wurde das Medium abgenommen und durch frisches Kultivierungsmedium ersetzt. Zu diesem wurde 1 mg/ml MTT-Reagenz gegeben und die Zellen für 3 h im Inkubator bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde das Medium mit 100 µl Dimethylsulfoxid (DMSO) ersetzt und die Zellen lysiert. Die Absorption des gelösten Formazans wurde nach kurzem, kräftigem Schütteln mit Hilfe eines Tecan M200 Mikroplattenreaders (Tecan, Männedorf, Schweiz) bei 570 nm Wellenlänge gemessen. Durch die Inkubation von Zellen mit NPs kann es jedoch zu Interferenzen bei der Absorptionsmessung kommen, welche zu falschen Messwerten führen können (Kroll et al., 2009). Einwandige Kohlenstoffröhren zeigten zum Beispiel einen großen zytotoxischen Effekt im MTT-Test, der jedoch nicht mit anderen Viabilitätstests und Apoptosetests nachgewiesen werden konnte (Wörle-Knirsch et al., 2006).

Um eine mögliche Verfälschung der Messergebnisse durch die hier verwendeten NPs zu minimieren, wurde zusätzlich eine Hintergrundkontrolle mitgeführt. Diese Zellen wurden parallel mit NPs inkubiert und lysiert, erhielten jedoch kein MTT-Reagenz (je Konzentration 2 Wells). Die 2 Wells wurden für jede Konzentration und die Kontrolle gemittelt und vom Mittelwert der 6 weiteren Messwerte pro Konzentration subtrahiert. Anschließend wurde der so erhaltene Mittelwert der Kontrolle als 100 % Zellviabilität angenommen und die Mittelwerte aller NP-inkubierten Zellen auf diese bezogen. Der Viabilitätstest wurde 3 Mal wiederholt.

Die statistische Auswertung erfolgte mit GraphPad Prism 4 (GraphPad Software, La Jolla, USA) und einer 2-Wege-Varianzanalyse (ANOVA, analysis of variance) mit den Faktoren Zeit (24 h, 72 h) und Behandlung (Kontrolle, 1, 5, 10, 20 oder 50 µg/ml NPs), gefolgt von einem Bonferroni post-Hoc Test. Ein $p \leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen.

2.4.1.1.2 Preußisch-Blau-Färbung

Diese Färbung diente der Visualisierung der eisenhaltigen k-NPs in den Zellkulturen. Sie beruht auf der Reaktion von Kaliumhexacyanoferrat(II) mit Eisen(III)-Ionen bzw. Kaliumhexacyanoferrat(III) mit Eisen(II)-Ionen in wässriger Lösung. Es kommt zum Ausfallen eines blauen, unlöslichen Farbstoffs, dem Preußisch-Blau oder auch Berliner-Blau.

Zunächst wurden die Zellen für 30 min mit 4 % Paraformaldehyd (PFA) fixiert. Die Färbelösung wurde frisch aus gleichen Teilen Kaliumhexacyanoferrat(II) und 1 % Salzsäure hergestellt und die Zellen für 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach dem Auswaschen überschüssiger Färbelösung wurden die Zellen mit Kernechtrot für 5 min gegengefärbt. Anschließend wurden sie erneut gewaschen und mit Immu-Mount eingedeckelt.

2.4.1.1.3 Immunzytochemische Färbung

Cerebellare und Schwannzell-Kulturen wurden mit 50 µg/ml grün fluoreszierenden k-NPs für 24 h inkubiert. Kontrollen wurden parallel ohne NPs behandelt.

Die zelltypspezifische Aufnahmehäufigkeit der k-NPs erforderte die Verwendung cerebellarer Mischkulturen zu unterschiedlichen Kultivierungszeitpunkten (Abbildung 14).

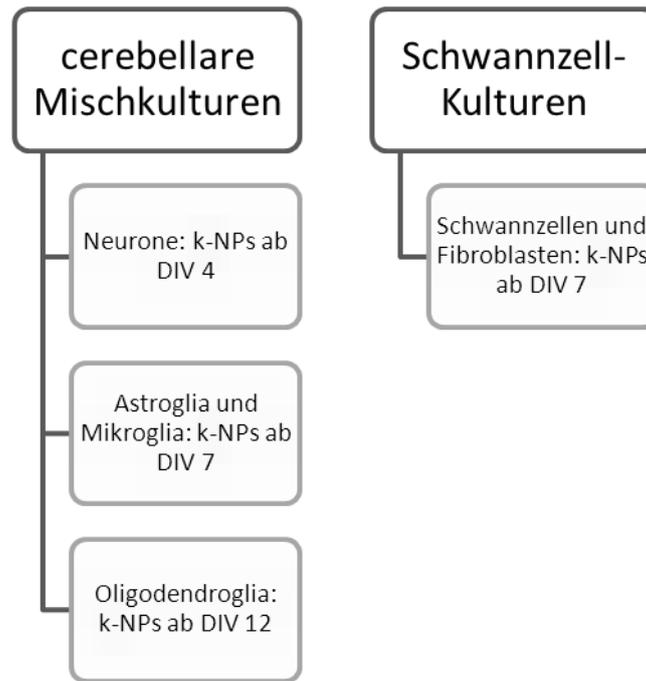


Abbildung 14: Zelltypabhängige Verwendungszeitpunkte cerebellarer Mischkulturen und Schwannzell-Kulturen für die immunzytochemische Färbung.

Nach der Inkubation mit NPs wurden überschüssige Partikel mit PBS entfernt. Anschließend wurden die Zellen mit 4 % PFA für 30 min fixiert und gewaschen. Ein Waschschrift bestand aus 3-maligem Waschen der Zellen mit PBS für je 10 min. Durch die Inkubation mit einem Blockpuffer (PBS, 10 % FKS, 0,3 % Triton-X) für 1 h wurden die Zellmembranen permeabilisiert und unspezifische Bindungsstellen geblockt. Dem Blockpuffer schloss sich direkt die Inkubation der Zellkulturen mit dem Primärantikörper (verdünnt in PBS + 1 % FKS + 0,3 % Triton-X) über Nacht bei 4 °C an. Am nächsten Tag wurden die Kulturen gewaschen und mit zu dem primären Antikörper passenden, fluoreszenzgebundenen Sekundärantikörpern für 3 h inkubiert. Die sekundären Antikörper Ziege-anti-Maus Alexa 546 oder Ziege-anti-Kaninchen Alexa 546 (beide rot fluoreszierend) wurden 1:200 in PBS verdünnt. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und die Zellkerne mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) gegengefärbt. Dafür wurden die Zellen 15 min bei 37 °C mit DAPI (1 µg/ml, gelöst in PBS) inkubiert, erneut gewaschen und mit Immu-Mount auf Objektträgern eingebettet. Die verwendeten zellspezifischen primären Antikörper sind in Tabelle 1 aufgelistet.

Tabelle 1: Verwendete primäre Antikörper für immunzytochemische Färbung von einzelnen Zelltypen cerebellaren Mischkulturen.

Zelltyp	Primärer Antikörper	Herkunft	Verdünnung
Neurone	Anti-microtubule associated protein 2 (MAP2)	Maus	1:1000
Astroglia	Anti-glial fibrillary acidic protein (GFAP)	Kaninchen	1:500
Mikroglia	Anti-CD11b/c	Maus	1:400
Oligodendroglia	Anti-Galaktocerebrosid (GalC)	Maus	1:250
Schwannzellen	Anti-S100	Kaninchen	1:100
Fibroblasten	Anti-Fibronectin	Maus	1:200

Pro Deckgläschen wurde eine zufällig ausgewählte Position je Quadrant und eine am Mittelpunkt mit einem AxioImager Mikroskop von Zeiss aufgenommen. Die Analyse erfolgte mit der Axio Vision Rel. 4.8 Software (Zeiss). Pro Bild wurde ermittelt: die Gesamtzellzahl, die Zellzahl der mit den jeweiligen Antikörpern gefärbten Zellen und von diesen die Zellzahl, die grün fluoreszierende k-NPs aufwies. Die prozentualen Anteile der einzelnen Zelltypen an der Gesamtzellzahl und der prozentuale Anteil von Zellen mit aufgenommenen NPs wurden für jeden Zelltyp ausgewertet.

$$c_{\text{Zelltyp}} \% = (a_{\text{Zellzahl Zelltyp}} * 100) / b_{\text{Gesamtzellzahl}}$$

$$c_{\text{Zelltyp + NPs}} \% = (a_{\text{Zellzahl Zelltyp + NPs}} * 100) / b_{\text{Zellzahl Zelltyp}}$$

Die statistische Auswertung erfolgte mit GraphPad Prism 4 und einem gepaartem Student's t-Test. Parallel behandelte Kontrollen und NP-inkubierte Zellkulturen wurden in n=20 Bildern pro Gruppe miteinander verglichen.

Ein Wert von $p \leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen.

2.4.1.1.4 Elektronenmikroskopie

Die Kulturen wurden für 24 h mit 4 % PFA fixiert. Nach 3-maligem Waschen für je 10 min mit 0,1 M Cacodylatpuffer wurden die Zellen abgedunkelt für 1 h mit 1 % Osmiumtetroxid inkubiert. Es folgte ein 10-minütiger Waschschrift mit 50 % Ethanol und 1 h Inkubation mit 2 % Uranylacetat. Die Dehydrierung der Zellen erfolgte über eine Ethanolreihe ansteigender Konzentration (je 10 min): 70 %, 80 %, 90 %, 96 % und 3-malig 100 %. Anschließend wurden die Petrischalen mit vorher erwärmten Durcupan dünn ausgegossen. Dieses wurde nun 24 h bei 37 °C und danach für weitere 48 h bei 68 °C ausgehärtet.

Mit einem EM UC6 Ultramikrotom von Leica wurden ultra-dünn (80 nm) Schnitte angelegt. Die elektronenmikroskopische Untersuchung wurde an einem EM 900 Transmissionselektronenmikroskop von Zeiss durchgeführt. Nach der Negativentwicklung wurden die Negative digitalisiert und mit Hilfe von Adobe Photoshop CS4 und Photoshop Elements 7 (Adobe, San Jose, USA) editiert.

2.4.1.2 Minozyklin

Alle nachfolgenden Methoden wurden an kortikalen glialen Mischkulturen durchgeführt und dienten der Untersuchung von glialen Minozyklineffekten.

2.4.1.2.1 Viabilitätstest

In kortikalen glialen Mischkulturen wurde ein MTT-Viabilitätstest wie unter 2.4.1.1.1 beschrieben durchgeführt. Die Zellen wurden mit $4 \cdot 10^4$ Zellen pro 100 μ l Medium/Well in PDL-beschichtete 96-Well Platten ausgesät. Nach 24 h wurden die Zellen in normalem Medium ohne Minozyklin (Kontrolle) oder mit 25, 50, 75, 100 und 125 μ M Minozyklin im Astroglia-DMEM-KM für 24 h, 72 h oder 7 Tage inkubiert. Pro Konzentration wurden 16 Wells beladen.

Die Auswertung und statistische Analyse erfolgte wie in 2.4.1.1.1 beschrieben.

2.4.1.2.2 Wundheilungstest

Um die Migrationsfähigkeit der kortikalen gliareichen Mischkulturen zu untersuchen, wurde ein Wundheilungstest durchgeführt. Dieser basiert darauf, dass Teile aus einem intakten Zellrasen entfernt werden und das erneute Zuwachsen des Zellrasens beobachtet wird.

$6 \cdot 10^5$ Zellen pro Well wurden in PDL-beschichtete 6-Well Platten ausgesät. Nach 24 h erhielten die Zellen Astroglia-DMEM-KM mit 1 % FKS für 24 h ({Saadoun 2005 #164}). Für das partielle Ablösen von Zellen aus dem intakten Zellrasen wurde das sterile Pistill einer Stepperpipettenspitze benutzt. Mit diesem wurden die Zellen entlang einer Markierung in einem ca. 1 mm breiten Streifen entfernt. Nach dem Waschen mit PBS erhielten die Zellen frisches Serum-reduziertes Astroglia-DMEM-KM ohne (Kontrolle) oder mit 100 μ M Minozyklin Zusatz. Die so gesetzte „Wunde“ im Zellrasen wurde nun mit Hilfe eines Leica DMI3000 Mikroskops fotografiert (Vergleichszeitpunkt, Zeitpunkt 0 h). Die Position der fotografierten Stelle wurde auf der Zellkulturplatte markiert. Nach 24, 48 und 72 h wurden erneut Fotos von den vorher markierten Positionen aufgenommen.

Die Auswertung erfolgte mit dem Leica LAS AF 2.2.0 (Leica, Wetzlar) Programm. Die Distanzen zwischen den Wundrändern wurden zum Vergleichszeitpunkt direkt nach Verletzen des Zellrasens (0 h), nach 24, 48 und 72 h ermittelt.

Die statistische Analyse erfolgte mit Graph Pad Prism 4 und einer 2-Wege-ANOVA (Faktoren Zeit und Behandlung). Diese wurde gefolgt von einem Bonferroni post-Hoc Test und einem gepaarten Student's t-Test. Ein p-Wert $\leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen.

2.4.1.2.3 Western Blot

Die Zellen wurden für 72 h mit 100 μ M Minozyklin inkubiert und anschließend pelletiert. Um die Zellen zu lysieren und ein Proteingemisch zu erhalten, wurde das Zellpellet mechanisch in einem Homogenisierungspuffer aus 20 mM Tris, 150 mM NaCl, 10 % Triton-X, 10 % Natriumdodecylsulphat (SDS) und CompleteMini Protease Inhibitor Cocktail homogenisiert.

Nach der Bestimmung der Proteinkonzentration der einzelnen Proben mit Hilfe der Bradford-Methode (BCA Kit Pierce) wurden die Proteine zur Auftrennung in einer SDS-PAGE mit einem 5 % Sammelgel und 10 % Trenngel aufgetragen. Dabei wurden entweder 10 oder 2 μ g Protein, gemischt mit Proteinladepuffer (roti-Load 1), aufgetragen. Die SDS-PAGE lief für ca. 2 h bei 10 mA. Anschließend wurden die Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran bei 100 V für 1 h geblottet.

Die Membranen wurden 2 Mal mit Tris-gepufferter Saline mit 0,1 % Tween-20 (TBST) gewaschen und unspezifische Bindungsstellen mit einem Blockpuffer aus TBST und 5 % Trockenmilch für 2 h inkubiert. Die primären Antikörper wurden in dem oben verwendeten Blockpuffer verdünnt und sind in Tabelle 2 aufgelistet. Nach dem 3-maligen Waschen mit TBST wurden die Membranen mit einem mit Meerrettichperoxidase-konjugierten sekundären Antikörper (anti-Maus-Antikörper 1:10 000 oder anti-Kaninchen-Antikörper 1:5000 verdünnt in TBST und 5 % Trockenmilch) für 30 min inkubiert. Die Visualisierung erfolgte mit einem Amersham ECL-Detektionssystem nach Herstellerangaben.

Tabelle 2: Für Western Blot verwendete primäre Antikörper.

	Primärer Antikörper	Herkunft	Verdünnung	Inkubationszeit
Zytoskelett	Anti-β-Aktin	Maus	1:15000	1 h
Astrogliale Hemikanalproteine	Anti-Connexin 43 (Cx43)	Kaninchen	1:50000	über Nacht
Housekeeping Protein	Anti-Glyceraldehyd-3-phosphat-dehydrogenase (GAPDH)	Maus	1:500	über Nacht

2.4.1.3 Organotypische Kulturen

2.4.1.3.1 Immunhistochemie

Organotypische Zellkulturen wurden für mindestens 24 h mit 4 % PFA fixiert. Die Gewebeschnitte verblieben für die Färbung auf den Millicell-Membraneinsätzen, um eine Zerstörung des Gewebes durch das Ablösen der Schnitte zu verhindern. Die Membranen wurden aus den Plastikträgern gelöst und freischwimmend gefärbt. Die immunhistochemische Färbung erfolgte nach dem schon in 2.4.1.1.3 für disperse Zellkulturen beschriebenen Protokoll. Da es sich bei den organotypischen Kulturen jedoch um 3-D Gewebe handelt, wurden die Waschschrte auf 15 min verlängert. Alle primären und sekundären Antikörper wurden in PBS + 10 % FKS + 0,03 % Triton-X verdünnt.

Für die Visualisierung von Neuronen wurde ein Antikörper gewählt, der verschiedene nicht phosphorylierte Neurofilamente bindet, die im Soma und Neuriten von Neuronen vorkommen. Dieser anti-Pan-Neurofilament (anti-Pan-NF)-Antikörper konnte mit einem 2. primären Antikörper kombiniert werden, um eine zusätzliche Visualisierung anderer Zelltypen des Gewebes zu ermöglichen (Tabelle 3). Bei der Verwendung von 2 primären Antikörpern, wurden die sekundären Antikörper ebenfalls in einem Ansatz als Kombination gefärbt. Dabei wurden anti-Maus Alexa 488 (1:250) und anti-Kaninchen Alexa 546 (1:250) kombiniert. Eine Ausnahme bilden die Färbungen für die konfokale mikroskopische Analyse. Hier kam ein anti-Maus Alexa 546 sekundärer Antikörper (1:250) zum Einsatz. Je nach Bedarf erfolgte eine zusätzliche Färbung mit DAPI.

Tabelle 3: Verwendete primäre Antikörper für die immunhistochemische Färbung von organotypischen Rückenmarkskulturen.

Zelltyp	Primärer Antikörper	Herkunft	Verdünnung
Neurone, im besonderen Motorneurone	Anti-Pan-NF	Maus	1:1000
	Anti- neuronal nuclei (NeuN)	Maus	1:100
Mikroglia	Anti-ionized calcium binding adaptor molecule-1 (IBA-1)	Kaninchen	1:1000
Astroglia	Anti- GFAP	Kaninchen	1:500

Fluoreszenzbilder der einzelnen Kulturen wurden mit Hilfe des AxioImager Mikroskops aufgenommen (Vergrößerung 2,5 x). Die Analyse erfolgte unter der Verwendung der Axio Vision Rel. 4.8 Software.

Konfokale Aufnahmen NP-inkubierter Kulturen wurden mit einem TCS SPE DMI4000 Konfokalmikroskop von Leica aufgenommen und mit Hilfe der Software LAS 2.2.0 von Leica editiert.

2.4.1.3.1.1 Auswertung

Anti-Pan-NF wurde zur Visualisierung von Neuronen in den Rückenmarksschnitten genutzt. Dazu zählten Motorneurone, sensorische Neurone und Interneurone. Quantifiziert wurde die Anzahl der überlebenden Motorneurone und die Gesamtzahl überlebender Neurone (Motorneurone, sensorische Neurone und Interneurone). Sensorische Neurone und Interneurone werden nachfolgend auch als „andere Neurone“ bezeichnet.

Eine Eigenschaft von organotypischen Kulturen ist die Erhaltung der gewebetypischen zellulären Organisation (Stavridis et al., 2005). Die Klassifikation der Neurone erfolgte nach zwei Kriterien: die Lokalisation, die mit einem anatomischen Atlas für das Rückenmark der Ratte (Watson et al., 2009) beurteilt wurde und die Größe des Somas (Rakowicz et al., 2002). Motorneurone besitzen ein sehr großes Soma im Vergleich zu anderen Neuronen und kommen im ventralen Teil des Rückenmarks vor. In Abbildung 15 A ist ein Vergleich zwischen anatomischer Darstellung des Rückenmarksatlas und einer organotypischen Rückenmarkskultur nach 7 Tagen Kultivierung dargestellt. Die zelluläre Organisation der Kultur stimmt mit der Atlasdarstellung gut überein.

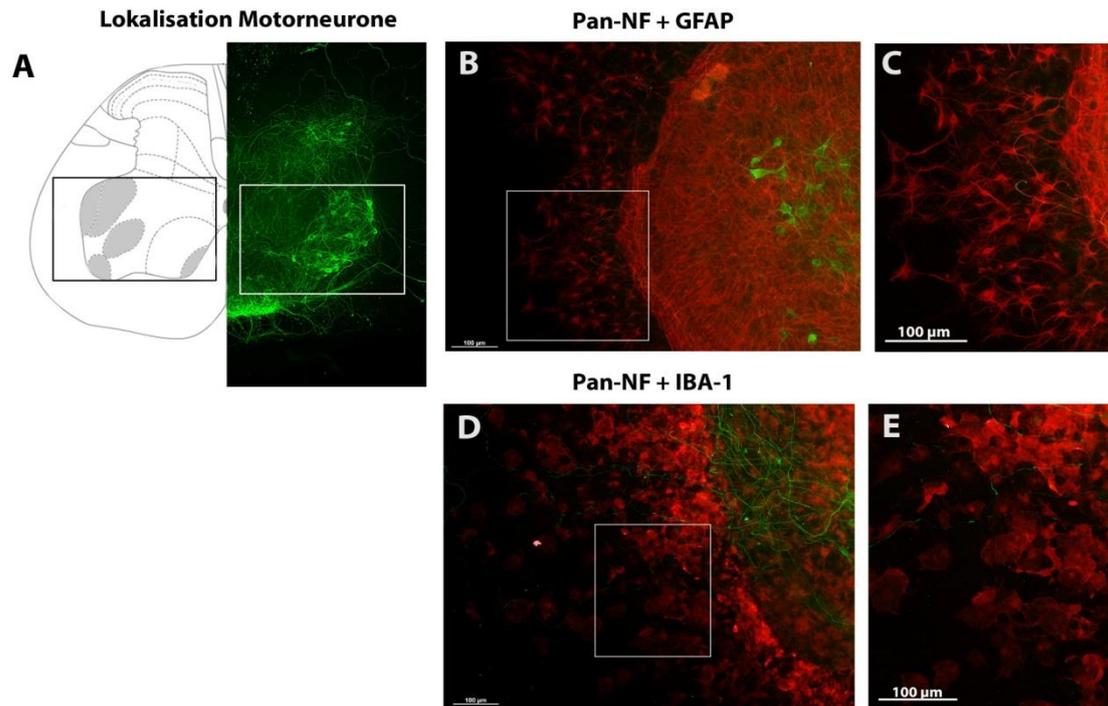
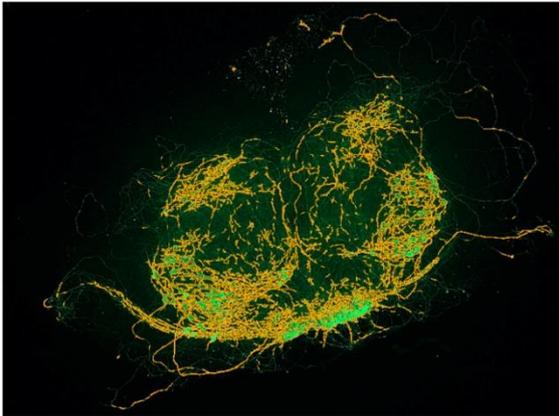


Abbildung 15: (A) Vergleich der anatomischen Darstellung eines Rückenmarksschnittes auf lumbalen Level 5 (li, modifiziert nach Watson et al. (2009)) mit einer anti-Pan-NF-gefärbten organotypischen Rückenmarkskultur nach 7 Tagen Kultivierung (re). Areale mit Motorneuronen sind grau in der schematischen Darstellung hinterlegt und in beiden Darstellungen mit einem Rahmen umfasst. (B) Astrogliale anti-GFAP-Färbung (rot) eines Rückenmarksschnittes nach 7 Tagen Kultivierung (doppelgefärbt mit anti-Pan-NF in grün). (C) Vergrößerung anti-GFAP-gefärbter Astroglia. (D) Mikroglia-Färbung mit anti-IBA-1 (rot) eines Rückenmarksschnittes nach 7 Tagen Kultivierung (anti-Pan-NF in grün). (E) Vergrößerung anti-IBA-1 gefärbter Mikroglia.

Aufgrund der 3-D Struktur der organotypischen Kulturen, der Vielzahl an Signalen und deren Überlagerung, gestaltete sich die Quantifizierung von Neuriten, anti-GFAP-gefärbten Astroglia, anti-IBA-1-gefärbten Mikroglia und DAPI-gefärbten-Zellkernen schwierig. Eine Quantifizierung durch Zählen erschien selbst in höheren Vergrößerungen nicht aussagekräftig. Beispielhafte astrogliale und mikrogliale Färbungen sind in Abbildung 15 B-E dargestellt. Eine weitere Möglichkeit zur Quantifizierung ist die Erfassung von Intensitäten (hier Fluoreszenz) oberhalb eines festgelegten Schwellenwertes als Flächen. Die Funktion „automatische Messung“ von Axio Vision Rel. 4.8 konnte hierfür genutzt werden. Ein Beispiel ist in Abbildung 16 dargestellt. Zunächst wurde für jeden Kanal des Fluoreszenzbildes ein Schwellenwert der Fluoreszenzintensität festgelegt. Alle Flächen, die diesen Schwellenwert überschritten, wurden von dem Programm bestimmt (Abbildung 16 orange Umrandung) und zu einer prozentualen Fläche bezogen auf die Gesamtbildfläche zusammengefasst. Der Schwellenwert wurde anhand

einer repräsentativen Kontrollkultur festgelegt und für alle Kulturen des gleichen Ansatzes beibehalten. Neben der Quantifizierung der Anzahl von überlebenden Neuronen wurde so zusätzlich die prozentuale Fläche der anti-Pan-NF-gefärbten Areale bestimmt. Dieses sollte der Validierung der Neuronenzählung (Soma wurde mit erfasst) als auch der Quantifizierung des Neuritenwachstums (erfasste Fasern) dienen. Die Auswertung von anti-GFAP-, anti-IBA-1- und DAPI-Färbungen erfolgte ebenfalls mit dieser Funktion.

anti-Pan-NF



anti-IBA-1

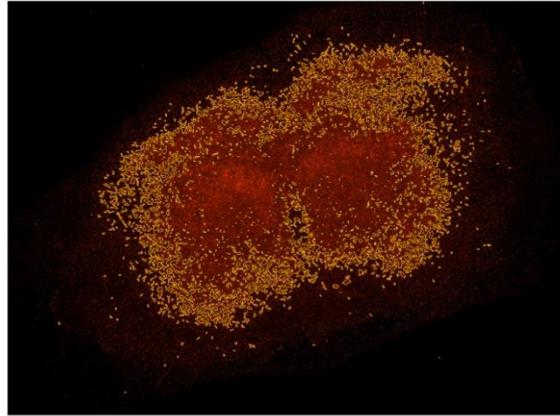


Abbildung 16: Beispiel für die Erfassung des prozentualen gefärbten Areals mit Hilfe des automatischen Messmoduls von Axio Vision Rel. 4.8. Links: prozentuales anti-Pan-NF-gefärbtes Areal nach 7 Tagen Kultivierung. Rechts: prozentual anti-IBA-1-gefärbte Fläche der gleichen Kultur. Vom Programm erfasste und gemessene Areale sind mit orange umrahmt. Die Summe dieser einzeln erfassten Areale ergibt die prozentual gefärbte Fläche für die jeweilige Färbung.

Pro Tier wurden 6-8 Rückenmarksschnitte verwendet. Diese wurden zu gleichen Teilen auf die Gruppen Kontrolle und Behandlung aufgeteilt. Die einzelnen Kulturen jedes Ansatzes wurden unter identischen Bedingungen kultiviert, gefärbt, fotografiert und ausgewertet. Die Auswertung der Rückenmarksschnitte erfolgte einzeln. Die Werte wurden anschließend zu einem Mittelwert pro Tier und Gruppe zusammengefasst. Durch das Mitteln mehrerer Werte pro Tier und die Verwendung von parallel kultivierten Kontrollen und behandelten Schnitten wurden Varianzen durch Präparation, Kultivierungs- und Färbungsbedingungen reduziert. Angegebene n-Zahlen beziehen sich auf die Anzahl der verwendeten Tiere. Das gepaarte Versuchsdesign ermöglichte zudem die Durchführung von gepaarten statt ungepaarten statistischen Verfahren. Für den Vergleich von Kontrollen und den korrespondierenden behandelten Kulturen wurde ein gepaarter Student's t-Test gewählt, ein p-Wert $\leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen.

2.4.1.3.1.2 Sonderfall Auswertung GDNF-PEI-NPs

Um die Anwendung der GDNF-PEI-NPs in der organotypischen Ko-Kultur zu bewerten, wurde, neben der Anzahl überlebender Motorneurone und Neurone, die Fläche der mit anti-pan-NF-anfärbbaren Neurofilamente im Bereich des Überganges von Rückenmarksschnitt zum Nervenstrang erfasst. Dieser Bereich wird nachfolgend Verwachsungszone genannt.

Zunächst wurde ein Fenster von 400 x 700 Pixel erstellt, über die Ansatzstelle Schnitt/Nerv gelegt und ausgeschnitten. Für die Erfassung der prozentualen Fläche der Neurofilamente wurden eventuell in dem Bereich liegende Zellkörper ausgenommen, so dass die erhaltene prozentuale Fläche ein indirektes Maß für die, in den Nerv gewachsenen Neuriten, darstellte (Abbildung 17).

Die Stabilität der Funktionalisierung der GDNF-PEI-NPs wurde mit Hilfe einer 1-Wege-ANOVA, gefolgt von einem Bonferroni post-Hoc Test, analysiert. Die statistische Auswertung der möglichen Anwendung in der Ko-Kultur erfolgte ebenfalls mit Hilfe einer 1-Wege-ANOVA, gefolgt von einem Bonferroni post-Hoc Test. Effekte des angelegten magnetischen Feldes wurden mittels eines gepaarten Student's t-Test analysiert. Ein p -Wert $\leq 0,05$ wurde bei allen statistischen Verfahren als statistisch signifikant betrachtet.

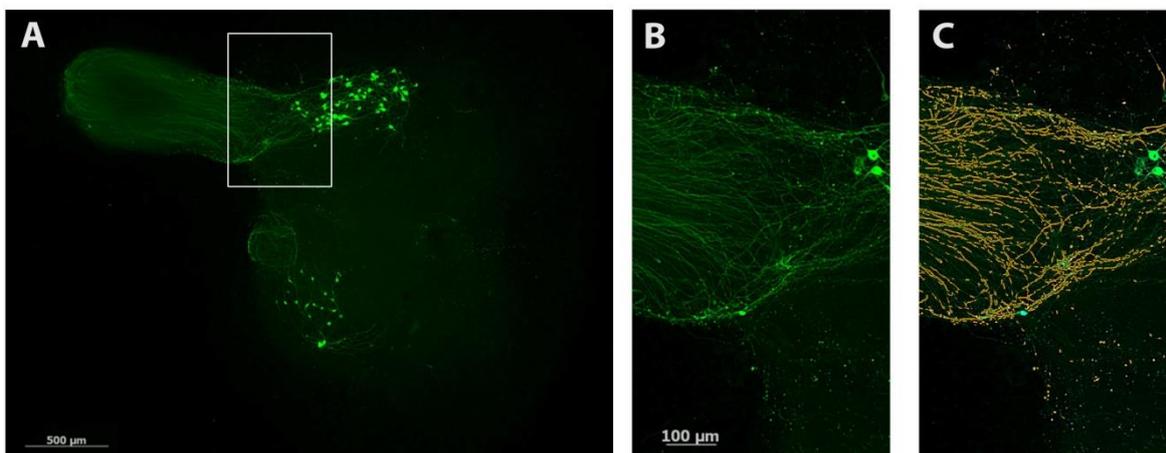


Abbildung 17: Verwachsungszone organotypischer Ko-Kulturen aus Rückenmark und peripherem Nerv. (A) zeigt eine mit anti-Pan-NF-gefärbte Ko-Kultur. Von dieser wurde die Verwachsungszone ausgewählt (B). Das Modul „automatische Messung“ des Programmes Axio Vision 4.8 erfasste die prozentuale Fläche der anti-Pan-NF-Färbung dieses Ausschnittes (C). Maßstab = 500 µm in (A), 100 µm in (B).

3 Ergebnisse

Detaillierte Wertetabellen und die dazugehörigen Statistikergebnisse finden sich in Anhang B am Ende der Arbeit.

3.1 Magnetische NPs

3.1.1 Zytotoxizität

Sollen NPs intrazellulär aufgenommen werden, ergibt sich das Problem der Toxizität der zellfremden Partikel. Um die Zytotoxizität der magnetischen NPs zu untersuchen, wurden MTT-Viabilitätstests in cerebellaren Misch- und Schwannzell-Kulturen mit steigenden k-NP- und PEI-NP-Konzentrationen durchgeführt.

3.1.1.1 k-NPs

In neuronenangereicherten Mischkulturen (siehe 2.2.1.1) zeigte sich nach 72-stündiger Inkubation mit 1, 5 und 10 µg/ml k-NPs eine signifikante Zunahme der Absorption im Vergleich zu den Kontrollzellen (Abbildung 18 A). Da die Absorption proportional zur Zellzahl ist, deutete dies auf eine Zellproliferation hin. Tatsächlich führte die Inkubation der Mischkulturen mit k-NPs zu einer Mikrogliaaktivierung, wie später im Kapitel 3.1.3.1 näher ausgeführt wird. Um diese zu verhindern und Überlagerungen anderer Effekte zu reduzieren, wurde das Experiment wiederholt und dem Zellkulturmedium neben den NPs noch Minozyklin zugesetzt. Da ich Minozyklin auch für andere Experimente dieser Arbeit einsetzte, war es schnell verfügbar, der Umgang damit bekannt und kostengünstig. An dieser Stelle nutzte ich seine wohlbekannte Eigenschaft, die Mikroglia proliferation und -aktivierung (Tikka et al., 2001; Bastos et al., 2007) zu inhibieren und so unerwünschte *in vitro*-Mikrogliaeffekte (Chechneva et al., 2006) zu unterdrücken. Die Inhibierung der Mikroglia konnte ich auch in meinen Experimenten an organotypischen Rückenmarkskulturen nachweisen, wie später im Kapitel 3.2.2.1 beschrieben wird. Die zusätzliche Behandlung der Zellen mit Minozyklin hatte in allen getesteten Zellkulturen keine Auswirkungen auf die Zellviabilität im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen (Anhang B). Daher beziehen sich die prozentualen Absorptionswerte in Abbildung 18 B und Abbildung 19 auf die Kontrolle+Minozyklin.

Nachdem die Mikroglia „eliminiert“ wurde, ergaben sich in den neuronengereicherten Mischkulturen signifikante Abnahmen der Zellviabilität, wenn die Kulturen für 72 h mit 10, 20 oder 50 µg/ml k-NPs inkubiert wurden. In den gliareichen Mischkulturen (siehe 2.2.1.1) nahm die Zellviabilität jedoch bereits nach einer k-NP-Inkubation von 24 h für alle verwendeten Konzentrationen ab (Abbildung 19). Auch in Schwanzzell-Kulturen konnte eine erhöhte Sensitivität gefunden werden. Wie bei den gliareichen Mischkulturen führten selbst geringe k-NP Konzentrationen schon nach 24 h zu einer signifikanten Reduktion der Zellviabilität im Vergleich zu den Kontrollzellen (Abbildung 20). Da in Schwanzzell-Kulturen jedoch keine Mikroglia vorkommen, wurde hier auf die Behandlung der Kulturen mit Minozyklin verzichtet.

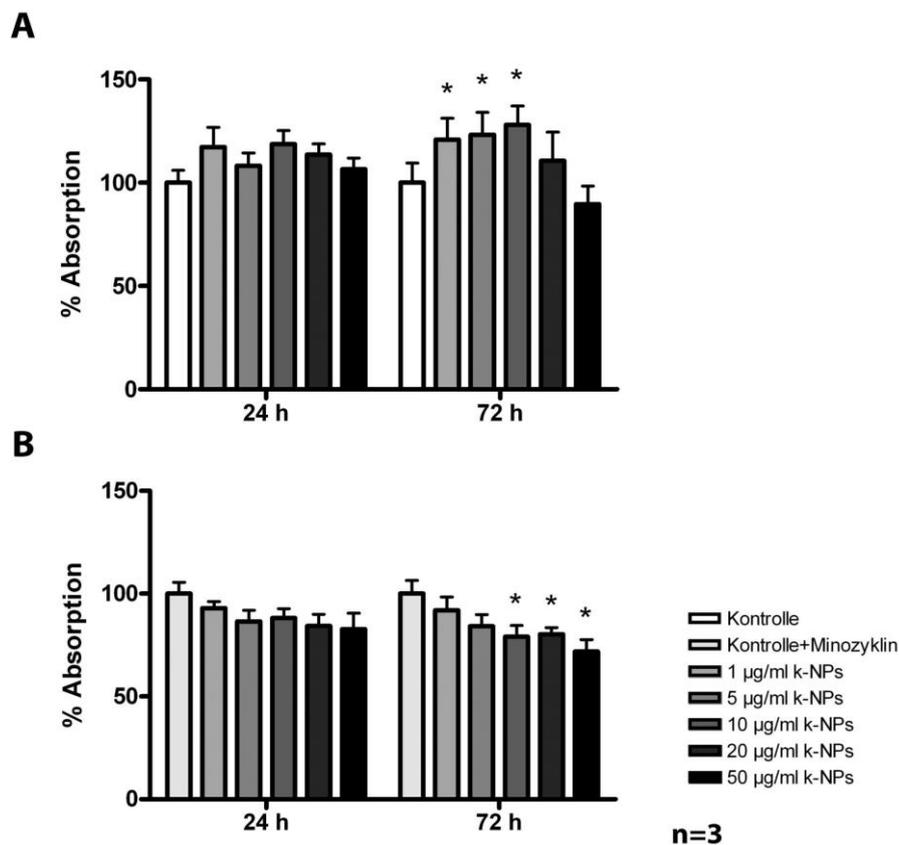


Abbildung 18: MTT-Viabilitätstest in neuronengereicherten cerebellaren Mischkulturen mit k-NP-Behandlung. Kontrollen erhielten entweder keinen Medienzusatz (A; Kontrolle) oder 75 µM Minozyklin (B; Kontrolle+Minozyklin). Behandelte Zellen erhielten k-NPs (A) oder k-NPs + 75 µM Minozyklin (B) zur Unterdrückung der Mikroglia. Mittelwerte + Standardabweichungen. *p < 0,05 bezogen auf die jeweilige Kontrolle.

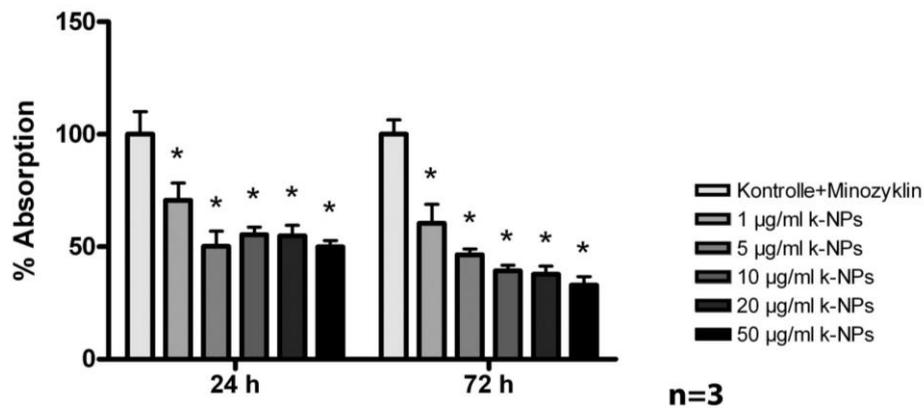


Abbildung 19: MTT-Viabilitätstest in gliareichen cerebellaren Mischkulturen mit k-NP-Behandlung. Alle Zellen erhielten 75 µM Minozyklin zur Mikroglia-inhibierung. Mittelwerte + Standardabweichungen. * p < 0,05.

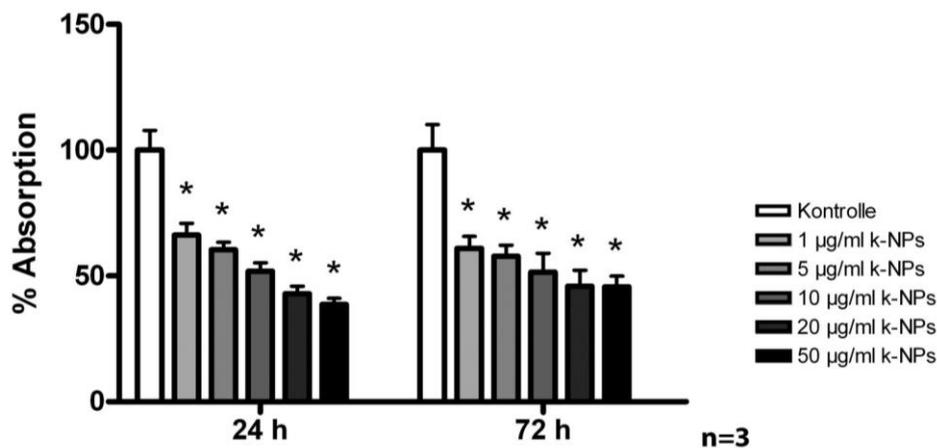


Abbildung 20: MTT-Viabilitätstest in Schwanzzell-Kulturen mit k-NP-Behandlung. Mittelwerte + Standardabweichungen.* p < 0,001.

3.1.1.2 PEI-NPs

Da bei der Behandlung der cerebellaren Mischkulturen mit PEI-NPs ebenfalls eine Mikrogliaaktivierung zu erwarten war, die andere Effekte überlagern könnte, wurden auch diese Kulturen zusätzlich mit Minozyklin behandelt. Schwanzzell-Kulturen erhielten wiederum kein zusätzliches Minozyklin.

Die Inkubation neuronengereicherter Mischkulturen mit geringen PEI-NP-Konzentrationen zeigte keine signifikanten Effekte. Eine hohe Konzentration von 50 µg/ml führte allerdings schon nach 24 h zu einer Abnahme der Zellviabilität im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 21). Dauerte die Inkubation 72 h, reduzierte sich die Zellviabilität schon ab einer Konzentration von 20 µg/ml PEI-NP signifikant.

Wie schon bei der k-NP-Behandlung reagierten gliareiche Mischkulturen sensibler auf eine Inkubation mit PEI-NPs. In diesen Kulturen reichte bereits die niedrige

Konzentration von 20 µg/ml PEI-NPs aus, um die Viabilität nach 24 h zu verringern. Blieben die PEI-NPs 72 h im Zellmedium, waren sie bereits ab einer Konzentration von 10 µg/ml toxisch (Abbildung 22).

Ein ganz anderes Bild ergab sich für die Schwanzzell-Kulturen. Sie zeigten keinerlei Veränderungen in der Zellviabilität durch die Inkubation mit PEI-NPs, auch nicht bei hoher Dosierung (Abbildung 23).

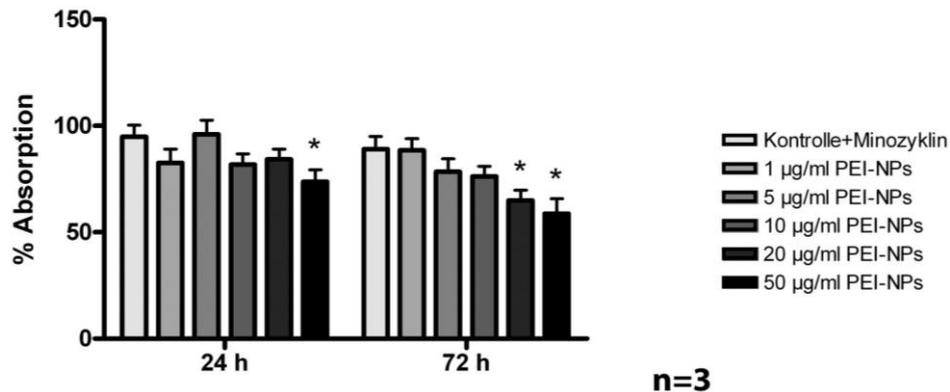


Abbildung 21: MTT-Viabilitätstest in neuronenangereicherten cerebellaren Mischkulturen mit PEI-NP-Behandlung. Zellen erhielten zusätzlich 75 µM Minozyklin zur Unterdrückung der Mikroglia. Mittelwerte + Standardabweichungen. * p < 0,05.

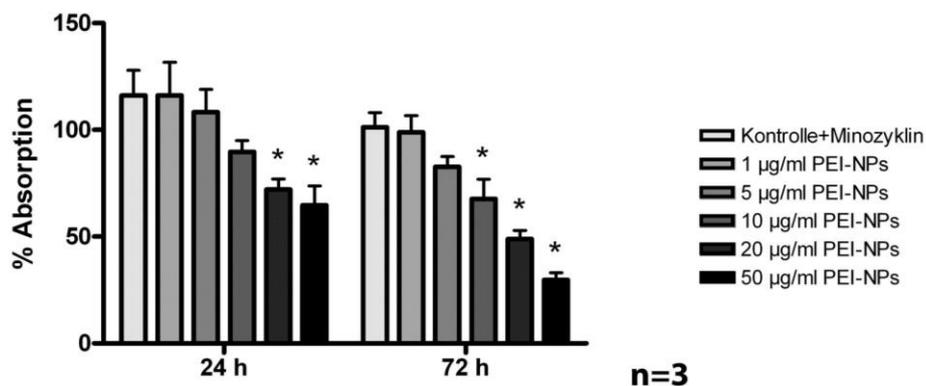


Abbildung 22: MTT-Viabilitätstest in gliareichen cerebellaren Mischkulturen mit PEI-NP-Behandlung. Zellen erhielten zusätzlich 75 µM Minozyklin zur Unterdrückung der Mikroglia. Mittelwerte + Standardabweichungen. * p < 0,05.

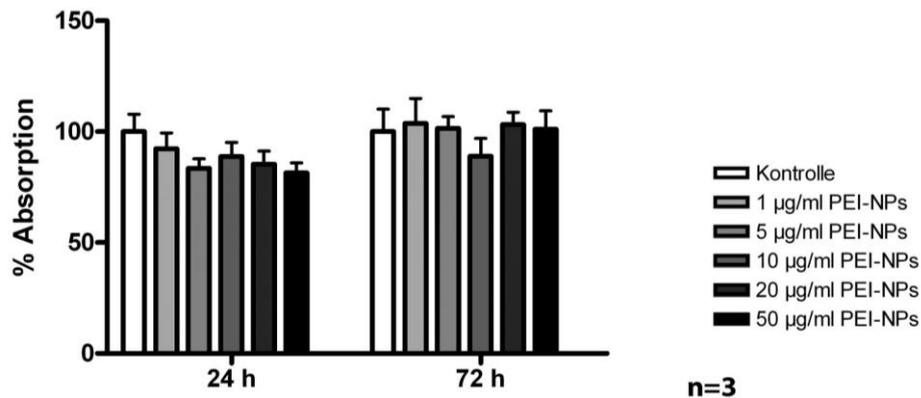


Abbildung 23: MTT-Viabilitätstest in Schwanzzell-Kulturen mit PEI-NP-Behandlung. Mittelwerte + Standardabweichungen.

Zusammenfassend lässt sich sagen:

- NPs verursachten eine Mikroglia proliferation in den verwendeten cerebellaren Mischkulturen und beeinflussten dadurch die Ergebnisse.
- Die Sensitivität der Zellen war abhängig von den verwendeten NPs und vom Zellkulturtyp:

k-NPs: Schwanzzell-Kulturen/gliareiche Mischkulturen > neuronenangereicherte Mischkulturen

PEI-NPs: gliareiche Mischkulturen > neuronenangereicherte Mischkulturen > Schwanzzell-Kulturen.

3.1.2 zelluläre Aufnahme

Nachdem die verwendeten NPs einige zytotoxische Effekte in Zellkulturen auslösten, stellte sich die Frage, was überhaupt passiert, wenn sie den Zellen im Medium angeboten werden. Werden sie intrazellulär aufgenommen, bleiben sie an der Zelloberfläche oder einfach im Medium? Um diese Fragen zu klären, wurden gliareiche cerebellare Mischkulturen und Schwanzzell-Kulturen für 24 h mit k-NPs inkubiert und licht-, fluoreszenz- und elektronenmikroskopisch untersucht. Für diese Experimente wurde kein Minozyklin-Zusatz verwendet, um auch Mikrogliaeffekte betrachten zu können.

Zunächst wurden mit Hilfe der Preußisch-Blau Färbung die eisenhaltigen k-NPs lichtmikroskopisch sichtbar gemacht. Der Vergleich gliareicher Mischkulturen ohne (Abbildung 24 A) und mit k-NP-Inkubation (Abbildung 24 B) zeigte deutlich sichtbare blau-violett gefärbte NP-Anhäufungen in den behandelten Kulturen. Auch die

Schwanzzell-Kulturen wiesen gefärbte NPs auf (Abbildung 24 C, D). Die k-NPs schienen dabei zellgebunden vorzuliegen und die Integrität des Zellrasens nicht zu beeinträchtigen.

Als nächstes wurden Kulturen mit grün fluoreszierenden k-NPs inkubiert, immunzytochemisch gefärbt und mit Hilfe der Konfokalmikroskopie untersucht. Zellen, die eine Kolokalisation mit den k-NPs zeigten, wurden über mehrere Ebenen (Z-Stapel) aufgenommen. Die Z-Stapel konnten anschließend zu einer 3-D-Rekonstruktion zusammengesetzt werden. Diese ermöglichte die Rotation der Zellen von einer frontalen zur Seitenansicht. Abbildung 25 A zeigt eine Mikrogliazelle, die eine Vielzahl von grün fluoreszierenden k-NPs aufgenommen hat. Abbildung 25 B stellt eine Schwanzzelle dar. Bei beiden Zellen rotierten kolokalisierte NPs gemeinsam mit Zellkörper und Zellkern bei der Seitwärtsdrehung mit. Dies lieferte den ersten Hinweis darauf, dass sie intrazellulär aufgenommen worden sein könnten. Die elektronenmikroskopische Untersuchung zeigte dann auch tatsächlich eine Anhäufung einzelner elektronendichter k-NPs in intrazellulären Vesikeln sowohl in der Mikroglia (Abbildung 26 A) als auch in den Schwanzzellen (Abbildung 26 B). Dabei war die Menge der aufgenommenen k-NPs in der Mikroglia deutlich höher als in den Schwanzzellen.

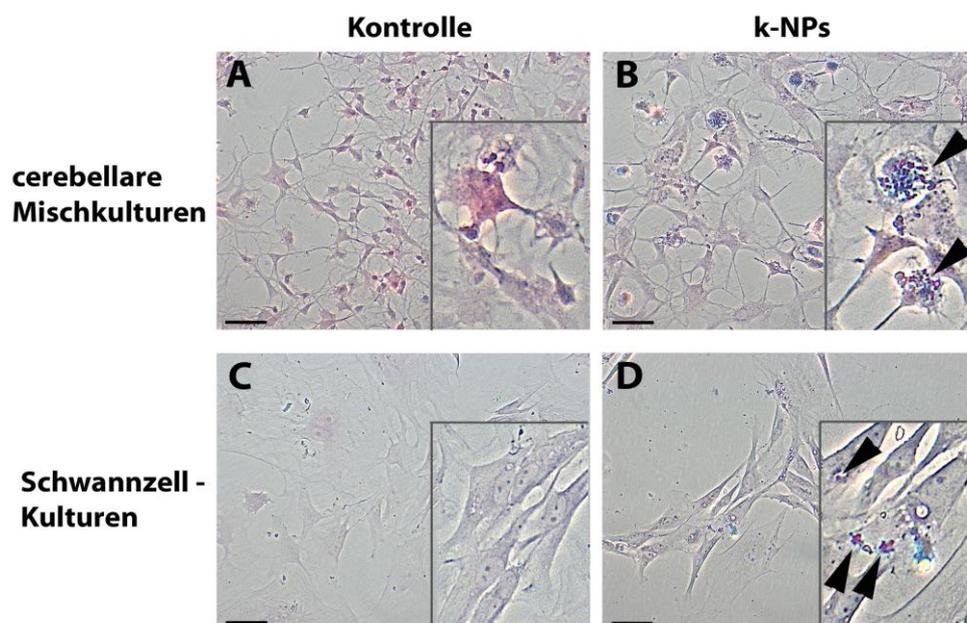


Abbildung 24: Färbung eisenoxidhaltiger k-NPs mit Preußisch-Blau (Gegenfärbung mit Kernechtrot) in gliareichen cerebellaren Mischkulturen (A, B) und Schwanzzell-Kulturen (C, D). (A, C) Kontrolle, (B, D) 24-stündige Inkubation mit 10 µg/ml k-NPs. NPs sind blau-violett gefärbt und mit Pfeilen gekennzeichnet. Maßstab = 50 µm.

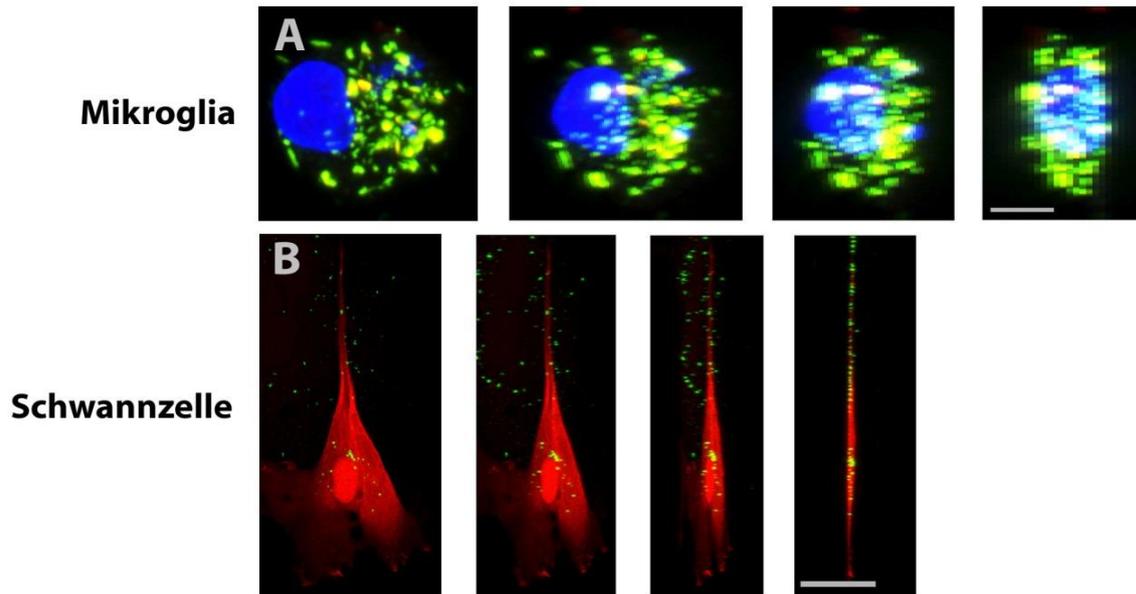


Abbildung 25: Konfokale 3-D-Projektionen. Dargestellt ist eine Mikrogliazelle in (A) und eine Schwannzelle in (B) nach 24 h Inkubation mit 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ grün fluoreszierenden k-NPs (DAPI-Kernfärbung in blau, anti-S100-Färbung in rot). Maßstab (A) = 5 μm , (B) = 25 μm .

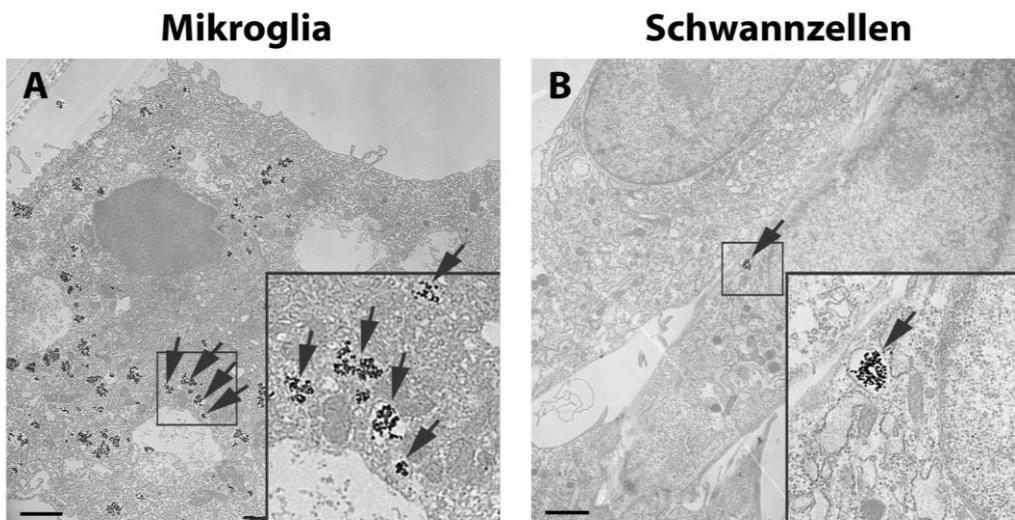


Abbildung 26: Elektronenmikroskopische Aufnahmen. In (A) eine Mikrogliazelle, in (B) Schwannzellen, die für 24 h mit 10 mg/ml k-NPs inkubiert wurden. Aufgenommene k-NPs sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Maßstab = 2,5 μm .

Zusammenfassend lässt sich sagen:

- K-NPs sind licht-, fluoreszenz- und elektronenmikroskopisch nachweisbar.
- K-NPs wurden intrazellulär in Vesikeln aufgenommen.

3.1.3 Zellspezifische Aufnahmehäufigkeit

Eine weitere Frage, die sich bei der Verwendung von NPs in Zellkulturen des ZNS und PNS stellt, ist die nach der Zelltyp-spezifischen Aufnahmekapazität. Dafür wurden erneut cerebellare Mischkulturen und Schwanzzell-Kulturen für 24 h mit 50 µg/ml grün fluoreszierenden k-NPs inkubiert und zellspezifisch analysiert. Wie in Kapitel 2.4.1.1.3 beschrieben, wurden für diese Experimente Mischkulturen an unterschiedlichen Kultivierungszeitpunkten eingesetzt, um die Hauptzellarten so gut wie möglich abzubilden.

3.1.3.1 Cerebellare Mischkulturen

Als erstes betrachtete ich die Anzahl der Zellen für jede Zellart. Eine 24-stündige Inkubation der Zellkulturen mit k-NPs erhöhte signifikant die Anzahl der Mikroglia in den Kulturen um $7,8 \pm 3,8$ % (Abbildung 27 C), beeinflusste aber nicht die Anzahl der Granularzellen und Neurone, der Astroglia oder der Oligodendroglia im Vergleich zu den Kontrollkulturen (Abbildung 27 A, B, D).

Anschließend wurde die jeweilige Anzahl der Zellen pro Zellart bestimmt, die mit grün fluoreszierenden k-NPs kolokalisiert waren. Die Ergebnisse sind in Abbildung 27 E dargestellt. Von den in den Kulturen vorkommenden Granularzellen und Neuronen nahmen $12,8 \pm 11,8$ % k-NPs auf. $41,0 \pm 14,9$ % der Astrogliazellen und $19,2 \pm 23,9$ % der Oligodendrogliazellen zeigten ebenfalls eine Aufnahme. Mikrogliazellen wiesen mit $78,7 \pm 12,2$ % den höchsten Anteil von aufnehmenden Zellen auf. Repräsentative Fluoreszenzaufnahmen aller Zelltypen sind in Abbildung 28 dargestellt (A, C, E, G Kontrollen, B, D, F, H k-NPs). Neben der hohen Anzahl von Mikrogliazellen, die NPs aufnahmen, konnten auch hier die vorher schon beschriebenen quantitativen Unterschiede zwischen den Zelltypen visualisiert werden.

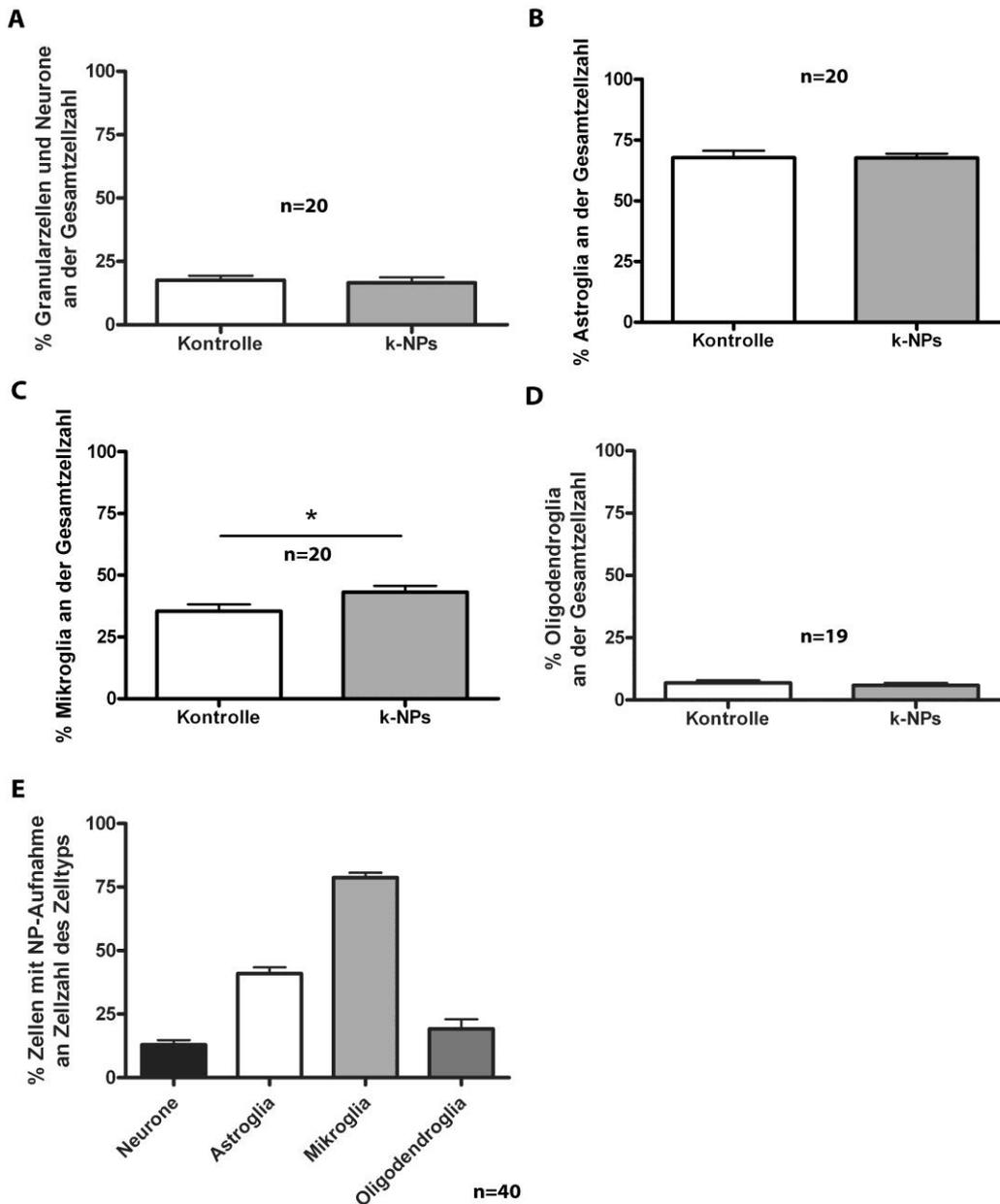


Abbildung 27: Quantifizierung der Zellzahl und der zellspezifischen Häufigkeit der Aufnahme von k-NPs in Granularzellen und Neuronen (A), Astroglia (B), Mikroglia (C) und Oligodendroglia (D) cerebellarer Mischkulturen. Mittelwerte + Standardabweichungen. * $p < 0,05$.

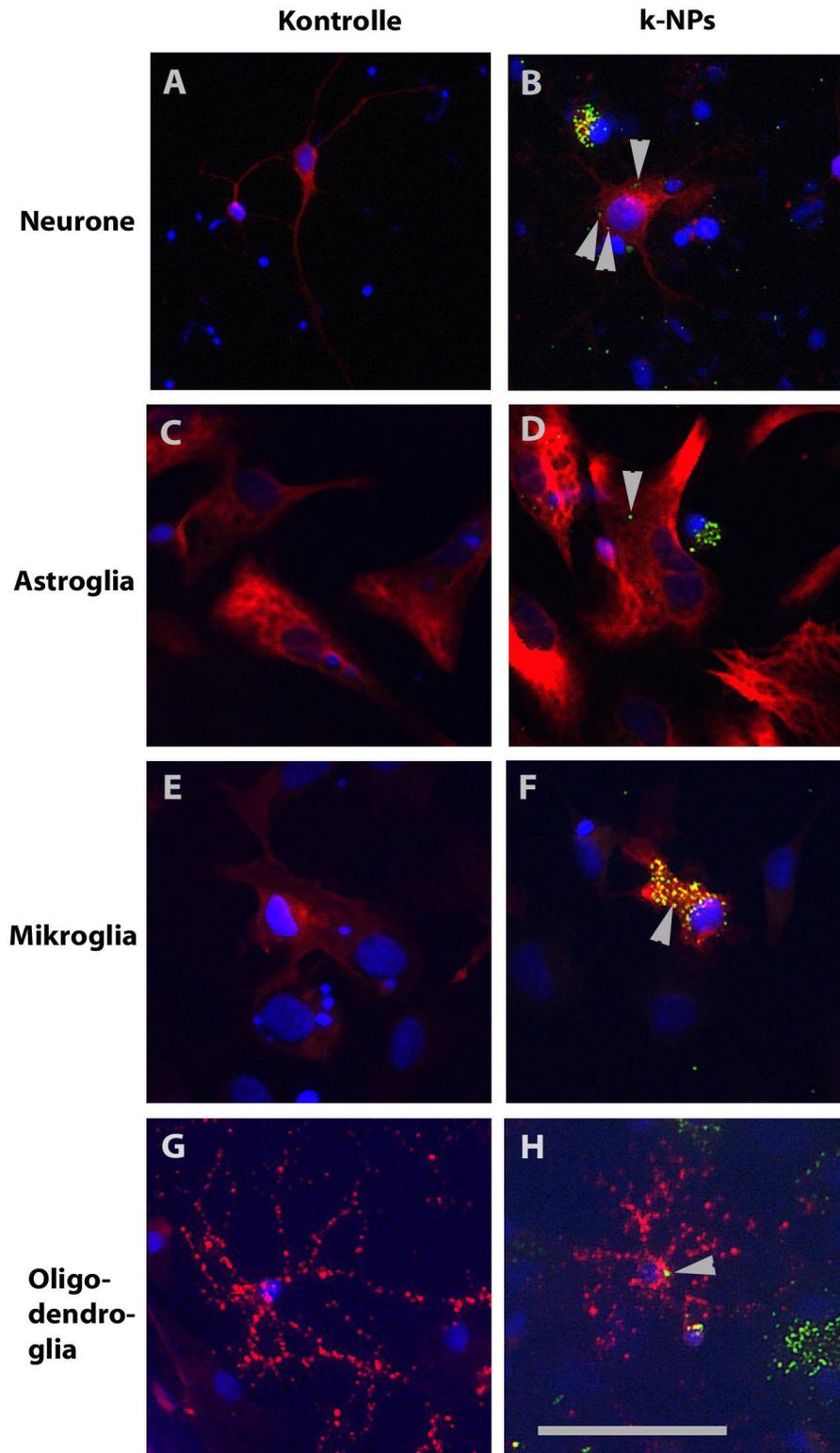


Abbildung 28: Fluoreszenzaufnahmen der unterschiedlichen Zelltypen in cerebellaren Mischkulturen mit grün fluoreszierenden k-NPs. (A) und (B) zeigen Granularzellen und Neurone (anti-MAP2 in rot), (C) und (D) Astroglia (anti-GFAP in rot), (E) und (F) Mikroglia (anti-CD11b/c in rot) und (G) und (H) Oligodendroglia (anti-GalC in rot). Die Zellkernfärbung erfolgte mit DAPI (blau). Kontrollen in (A), (C), (E) und (G); Kulturen in (B), (D), (F) und (H) 24 h Inkubation mit k-NPs (grün). Pfeile kennzeichnen mit den Zellen kolokalisierte NPs. Maßstab = 50 μ m.

3.1.3.2 Schwannzell-Kulturen

In den Schwannzell-Kulturen reduzierte sich die Anzahl der Schwannzellen durch eine Inkubation mit k-NPs signifikant (Abbildung 29 A). Gleichzeitig stieg die Zahl der Fibroblasten an (Abbildung 29 B). Diese Zunahme erwies sich jedoch statistisch nur als Trend und nicht als Signifikanz. Insgesamt nahmen $61,1 \pm 20,3$ % der Schwannzellen und $58,1 \pm 24,4$ % der Fibroblasten k-NPs auf (Abbildung 29 C). Repräsentative Fluoreszenzaufnahmen von Schwannzellen und Fibroblasten sind in Abbildung 30 dargestellt. Kontrollkulturen zeigten keine grün fluoreszierenden Partikel, während Schwannzellen in Abbildung 30 B und der Fibroblast in Abbildung 30 D einige mit dem Zellkörper kolokalisierte grün fluoreszierende NPs aufwiesen.

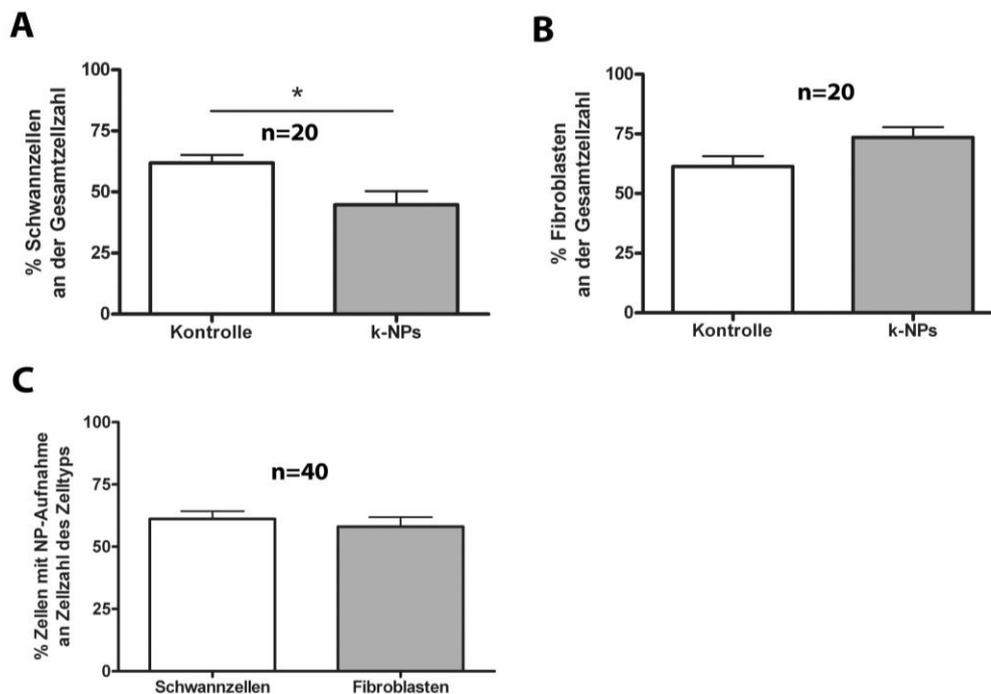


Abbildung 29: Quantifizierung der Zellzahl und der zellspezifischen Häufigkeit der Aufnahme von k-NPs in Schwannzellen (A) und Fibroblasten (B). Mittelwerte + Standardabweichungen. * p < 0,05.

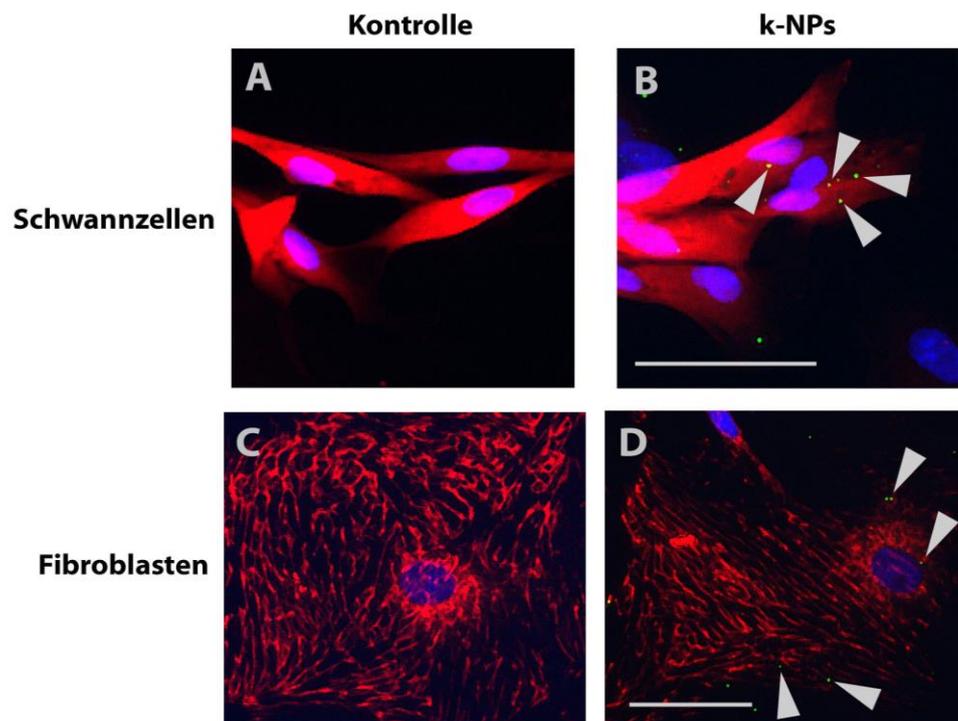


Abbildung 30: Fluoreszenzaufnahmen von Schwannzellen (A, B, anti-S100 in rot) und Fibroblasten (C, D, anti-Fibronectin in rot). Die Zellkernfärbung erfolgte mit DAPI (blau). Kontrollen in (A, C); Kulturen in (B, D) 24 h Inkubation mit grün fluoreszierenden k-NPs. Pfeile kennzeichnen mit den Zellen kolokalisierte NPs. Maßstab = 50 μ m.

Zusammenfassend lässt sich sagen:

- K-NPs induzierten eine Mikroglia proliferation.
- K-NPs reduzierten die Anzahl von Schwannzellen.
- Der Anteil von Zellen, die eine Aufnahme von k-NPs zeigten, war abhängig vom Zelltyp:
Mikroglia > Astroglia > Oligodendroglia und Granularzellen/Neurone
Schwannzellen = Fibroblasten.

3.1.4 NP-Inkubation in organotypischen Rückenmarkskulturen

Organotypische Kulturen erhielten vom Beginn der Kultivierung bis zur Fixierung NP-haltiges Medium. Experimente mit k-NPs (50 µg/ml) wurden an den einfachen Rückenmarkskulturen durchgeführt. Experimente mit GDNF-PEI-NPs (20 µg/ml) wurden sowohl an den einfachen Rückenmarkskulturen als auch an Ko-Kulturen durchgeführt und beschränkten sich auf ausgewählte Versuche, die Bestandteil des Projektes MARVENE waren.

3.1.4.1 k-NPs

Die Inkubation der organotypischen Rückenmarkskulturen mit k-NPs beeinflusste nicht die Anzahl überlebender Motorneurone und die Gesamtneuronenzahl (Abbildung 31 A, B). Auch die prozentuale Fläche der Neurofilamente (Abbildung 31 C), der Mikroglia (Abbildung 31 D) und der Zellkernfärbung (Abbildung 31 F) blieben unverändert. Lediglich die prozentual gefärbte Fläche der Astroglia zeigte einen abnehmenden Trend (Abbildung 31 E). Repräsentative Fluoreszenzaufnahmen sind in Abbildung 32 abgebildet. Neben der gut zu erkennenden Motorneuronenpopulation wiesen Kontrollkulturen (Abbildung 32 A) eine über den Schnitt verteilte Färbung von aktivierter Mikroglia auf. Zusätzlich zeigten die Kulturen eine intakte, den Schnitt überziehende Astrogliadecke (Abbildung 32 C). Rückenmarkskulturen, die mit k-NPs inkubiert wurden, zeigten keine offensichtlichen Differenzen zu den Kontrollschnitten (Abbildung 32 B, D).

Um die k-NPs in den organotypischen Kulturen näher zu lokalisieren, wurden ergänzende konfokalmikroskopische Aufnahmen von Motorneuronen, Mikroglia und Astroglia gemacht (Abbildung 33). Dabei zeigten sich in den Zellkörpern von Motorneuronen keine grün fluoreszierenden k-NPs (Abbildung 33 A, B), während Astrogliazellen vereinzelt k-NPs aufnahmen (Abbildung 33 C, D). Mikroglia wies, wie auch in den dispersen Kulturen, die höchste Aufnahmekapazität aller Zelltypen auf (Abbildung 33 E, F).

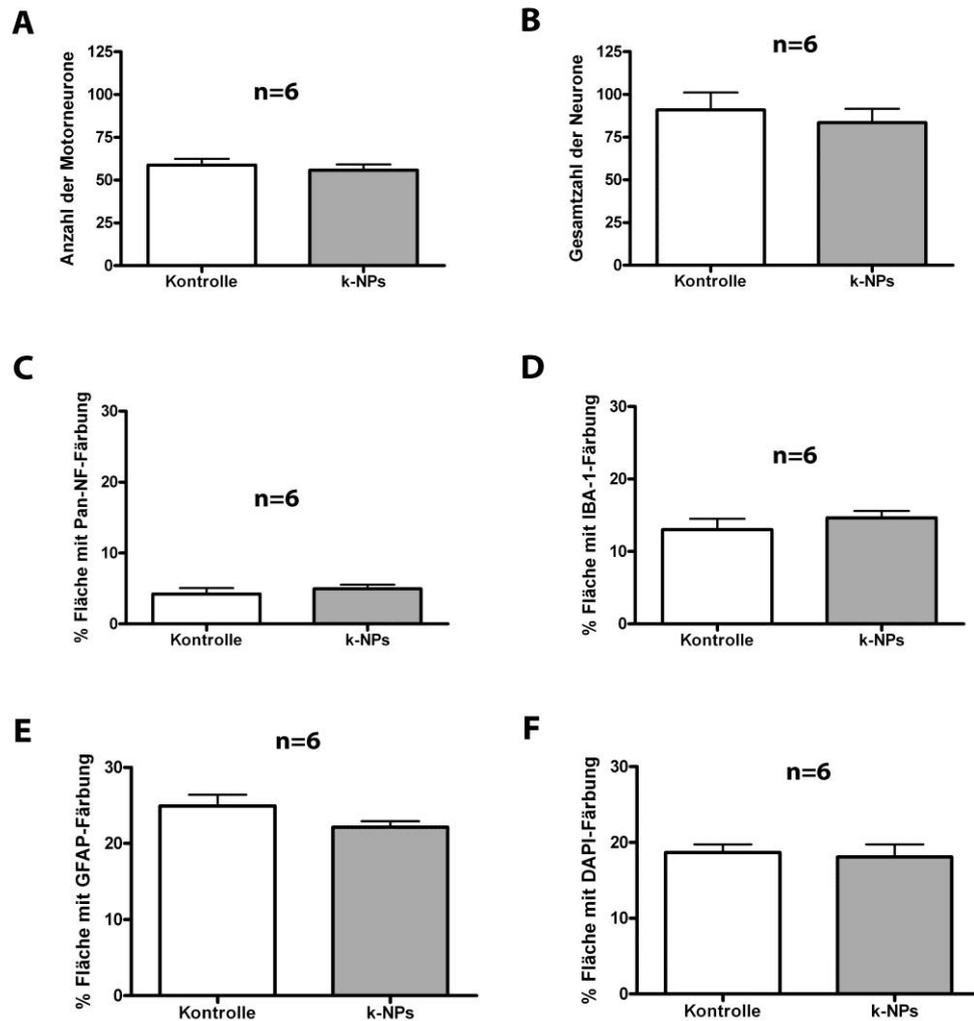


Abbildung 31: Quantifizierung der überlebenden Motorneurone (A), Gesamtzahl der Neurone (B), Neurofilamente (C), Mikroglia (D), Astroglia (E) und Zellkernfärbung (F) in organotypischen Rückenmarkskulturen nach 1-wöchiger Inkubation mit 50 µg/ml k-NPs. Mittelwerte + Standardabweichungen.

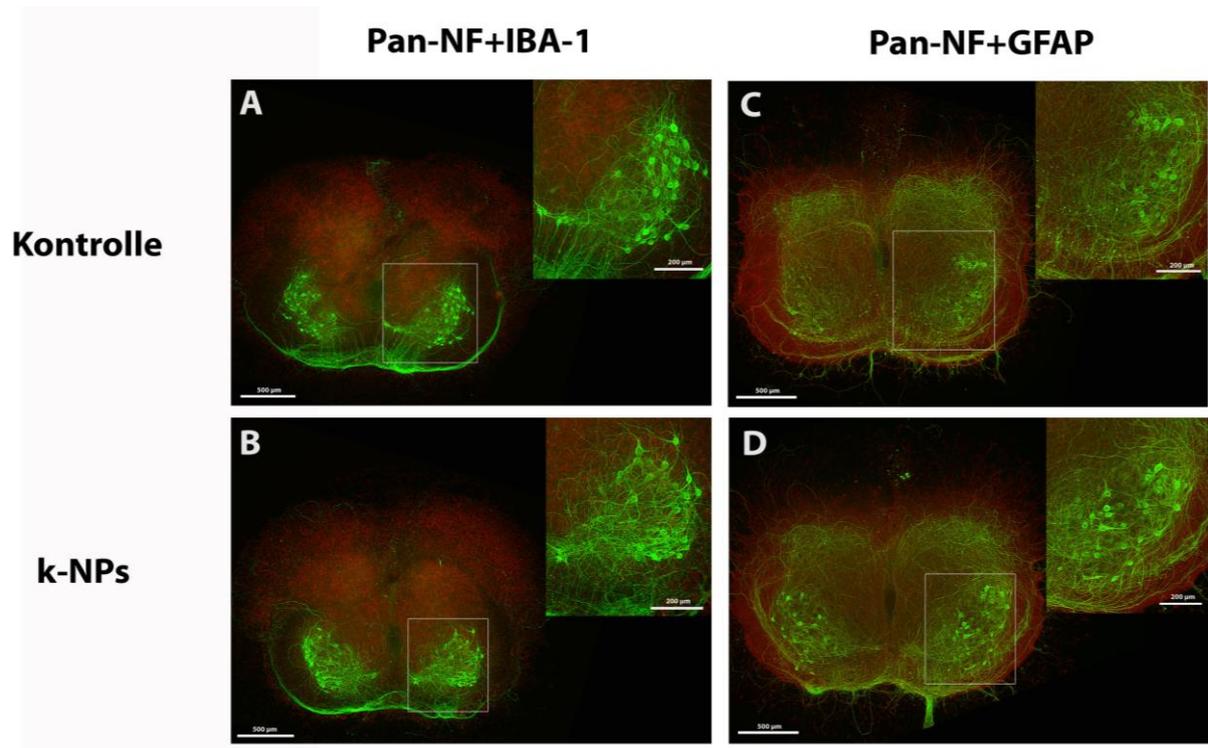


Abbildung 32: Fluoreszenzaufnahmen von organotypischen Rückenmarkskulturen mit k-NP Inkubation. (A, B) anti-Pan-NF- (grün) und anti-IBA-1 Färbung (rot); (C, D) anti-Pan-NF- (grün) und anti-GFAP Färbung (rot). Kontrollen (A, C), 1-wöchige Inkubation mit 50 µg/ml k-NPs (B, D). Motorneuronen-Populationen sind herausvergrößert. Maßstab = 500 µm, Maßstab Vergrößerung = 200 µm.

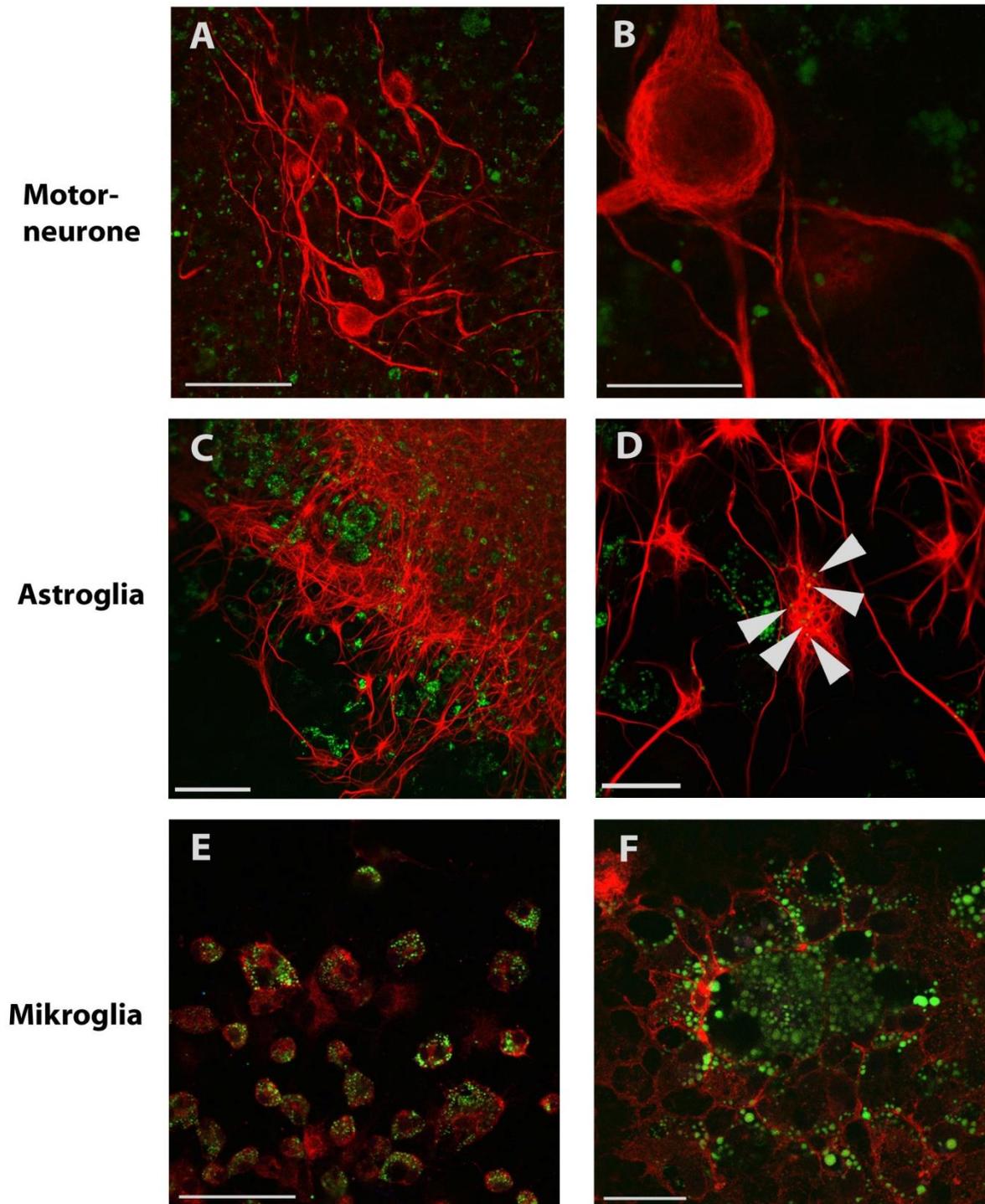


Abbildung 33: Konfokalmikroskopische Aufnahmen organotypischer Rückenmarkskulturen inkubiert mit k-NPs (grün). Motorneurone (A, B, anti-Pan-NF in rot), Astroglia (C, D, anti-GFAP in rot) und Mikroglia (E, F, anti-CD11b/c in rot). Pfeile in (D) kennzeichnen k-NPs. Maßstab = 75 μ m (A, E), = 50 μ m (C), = 25 μ m (B, D, F).

Zusammenfassend lässt sich sagen:

- K-NPs zeigten keine Auswirkungen auf die einzelnen Zelltypen der organotypischen Rückenmarkskultur.
- Die konfokalmikroskopische Analyse zeigte, dass auch im organotypischen Schnitt k-NPs vornehmlich in Mikroglia aufgenommen wurden.

3.1.4.2 GDNF-PEI-NPs

Alle nachfolgenden Versuche mit den funktionalisierten GDNF-PEI-NPs wurden im Rahmen des MARVENE-Projektes durchgeführt. Nach der Überprüfung der Funktionalisierung der NPs an einfachen organotypische Rückenmarkskulturen, wurden die GDNF-PEI-NPs in den Ko-Kulturen eingesetzt und neben den Effekten auf Motorneurone, Neurone und Neurofilamente auch die Auswirkungen eines starken, externen Magnetfeldes untersucht.

3.1.4.2.1 Stabilität der Funktionalisierung der GDNF-PEI-NPs

Ein wesentlicher Faktor zum Überleben der Motorneurone in der organotypischen Rückenmarkskultur ist die Zugabe von GDNF zum RM-M. Mit GDNF überleben ca. 60 % aller Motorneurone. Diese funktionelle Abhängigkeit machte ich mir bei der Überprüfung der Stabilität der Verknüpfung von GDNF und PEI-NPs zunutze. Dafür wurden zunächst GDNF-PEI-NPs in Null-RM-M inkubiert und dann mit Hilfe eines starken Magneten wieder aus der Lösung entfernt. War die Verknüpfung von GDNF an die NPs instabil, verblieb das GDNF im Medium (Überstand). Die per Magnet entfernten NPs wurden in frischem Medium resuspendiert. War die Kopplung des GDNFs an diese NPs stabil, fand sich die GDNF-Wirkung in dem frischen Medium wieder. Organotypische Kulturen erhielten nun entweder den Überstand oder das Medium mit den resuspendierten NPs. Die Ergebnisse sind in Abbildung 34 dargestellt. Kulturen, die den Überstand erhielten, zeigten keine signifikanten Unterschiede im Überleben der Motorneurone und Gesamtneurone. Kulturen, die mit resuspendierten NPs kultiviert wurden, zeigten jedoch eine signifikante Reduktion der Anzahl überlebender Motorneurone verglichen mit der Kontrolle⁵⁰ (Abbildung 34 A). Die GDNF-Wirkung schien somit im Überstand verblieben und die Funktionalisierung der GDNF-PEI-NPs instabil zu sein. Die Gesamtzahl der überlebenden

Neurone ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen (Abbildung 34 B).

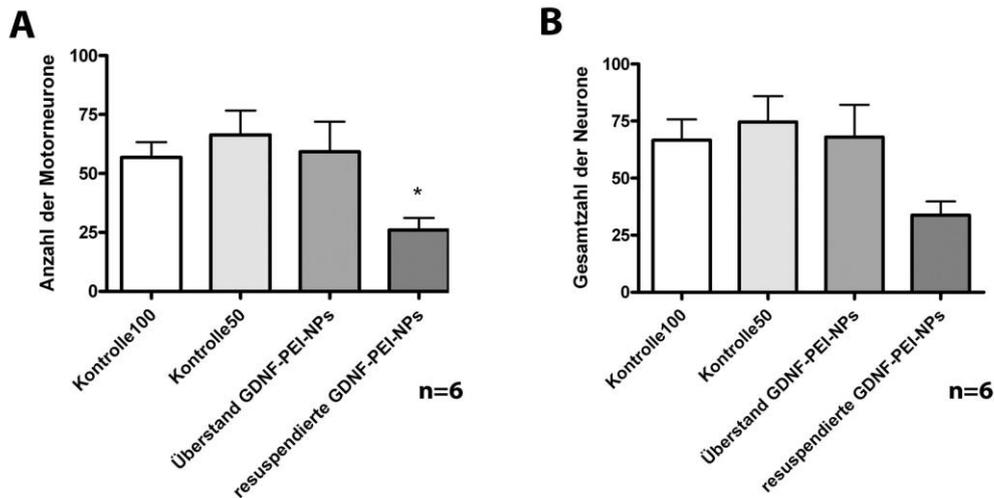


Abbildung 34: Stabilität der Funktionalisierung von GDNF-PEI-NPs. (A) Motorneurone, (B) Gesamtzahl überlebender Neurone. * $p < 0,05$ gegenüber Kontrolle50.

3.1.4.2.2 Anwendung der GDNF-PEI-NPs an Rückenmarks-Ko-Kulturen

Ziel der Anwendung der funktionalisierten GDNF-PEI-NP war letztendlich die Regeneration von Motorneuronen bzw. das Auswachsen von Neuriten zu fördern. Durch die Bindung von GDNF sollte eine zielgerichtete (rezeptorvermittelte) Aufnahme der NPs in Motorneurone vorangetrieben werden. Trotz der instabilen Funktionalisierung und der geringen Wahrscheinlichkeit, dass eine neuronale Aufnahme stattfand, wurden die Experimente mit dem Augenmerk der Etablierung zukünftiger Standardprozeduren durchgeführt. Dafür wurden Rückenmarks-Ko-Kulturen mit GDNF-PEI-NPs in Null-RM-M inkubiert. Mit den GDNF-PEI-NPs überlebten genauso viele Motorneurone wie in Kulturen, die GDNF mit dem Medium erhielten (Abbildung 35 A). Auch die Gesamtzahl der Neurone änderte sich nicht (Abbildung 35 B). In den Negativkontrollen ohne GDNF im Medium reduzierte sich die Anzahl überlebender Zellen im Vergleich zu der Kontrolle100 signifikant. Dies belegte die funktionelle Wirkung des GDNFs im RM-M als auch der GDNF-PEI-NPs. Zugleich war dieses Ergebnis erwartbar, da das GDNF seine Wirkung entfaltet, selbst wenn es sich von den NPs getrennt haben sollte. Die prozentual gefärbte anti-Pan-NF-Fläche der Verwachsungszone blieb unbeeinflusst von den verschiedenen Kulturbedingungen (Abbildung 35 C).

Zusätzlich wurde der Einfluss eines externen magnetischen Feldes auf die Ko-Kulturen mit GDNF-PEI-NPs untersucht. Dafür inkubierten die Ko-Kulturen in dem in Kapitel 2.3.1.2.2 beschriebenen magnetischen Applikator. Die Ergebnisse sind in Abbildung 36 abgebildet. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl überlebender Motorneurone (Abbildung 36 A), Neurone (Abbildung 36 B) und prozentualer Neurofilamentfläche der Verwachsungszone (Abbildung 36 C). Das externe magnetische Feld beeinflusste die Regeneration der Neurite nicht, selbst wenn die Ko-Kulturen GDNF-PEI-NPs erhielten.

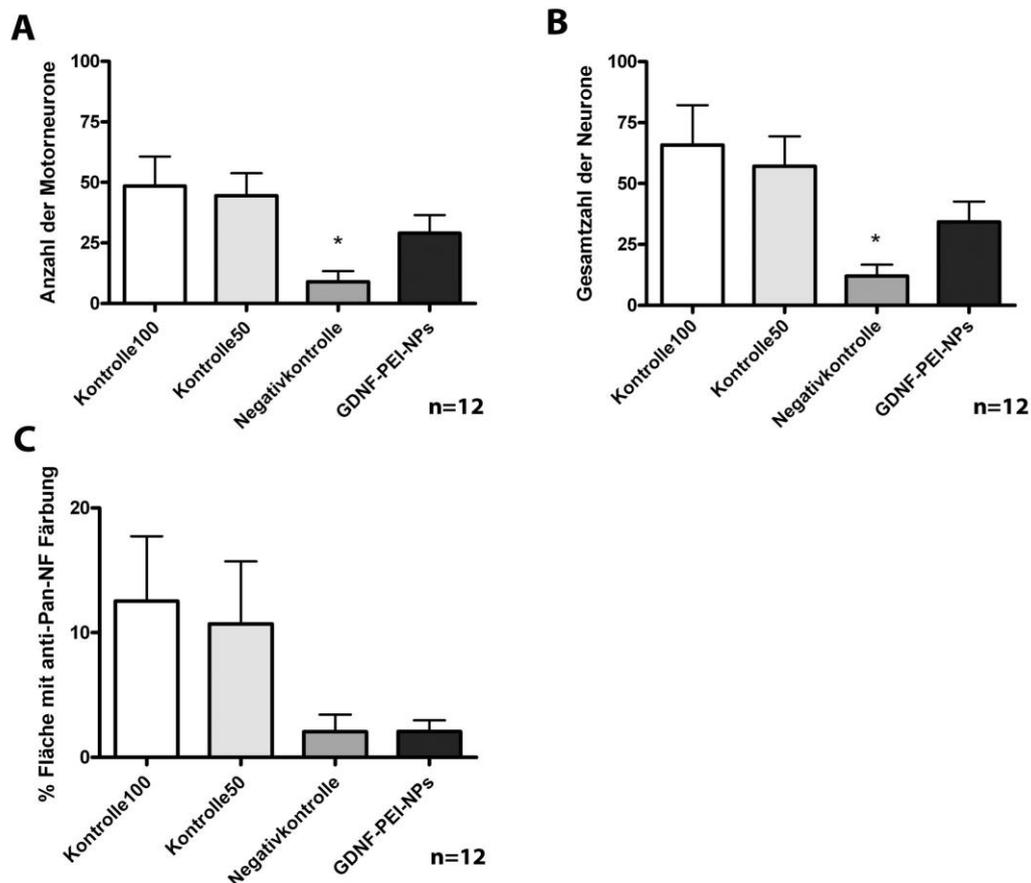


Abbildung 35: Kultivierung organotypischer Rückenmarks-Ko-Kulturen mit GDNF-PEI-NPs. (A) Motorneurone, (B) Gesamtzahl Neurone und (C) prozentuale Fläche gefärbter Neurofilamente der Verwachsungszone. * $p < 0,05$.

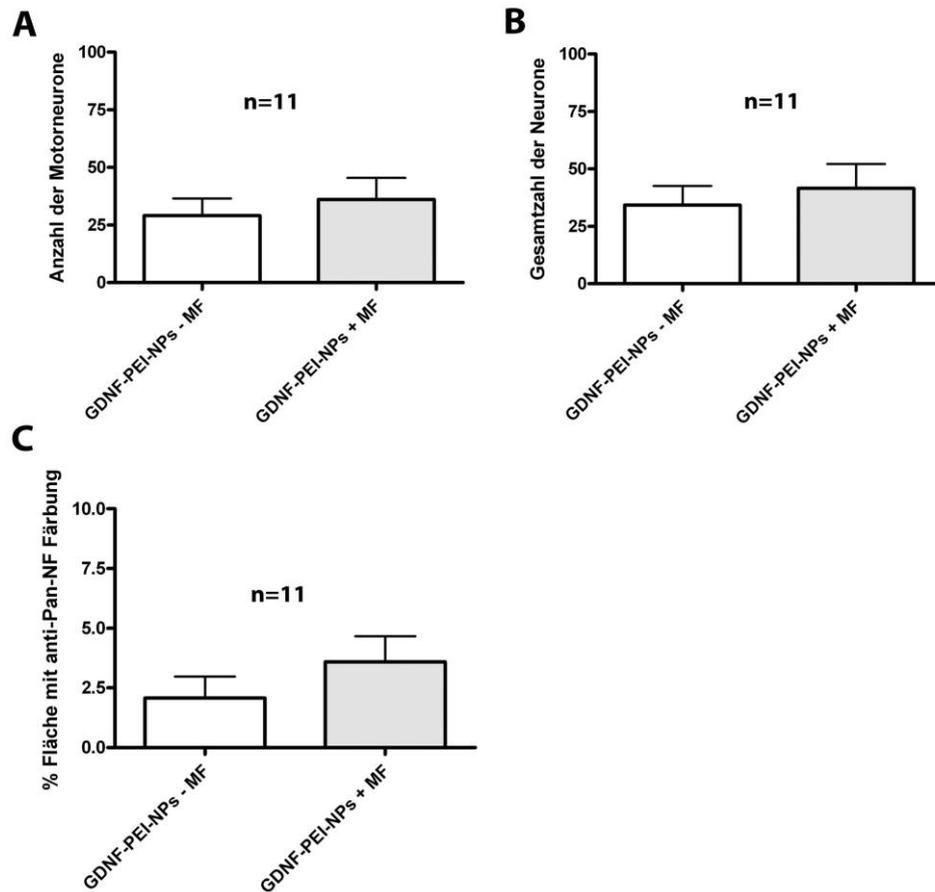


Abbildung 36: Einfluss eines starken magnetischen Feldes auf mit GDNF-PEI-NP-behandelte organotypische Ko-Kulturen. (A) Motoneurone, (B) Gesamtzahl Neurone und (C) prozentuale Fläche gefärbter Neurofilamente der Verwachsungszone.

Zusammenfassend lässt sich sagen:

- Die Funktionalisierung der GDNF-PEI-NPs erwies sich als instabil.
- Ko-Kulturen mit GDNF-PEI-NPs unterschieden sich nicht von Kontrollkulturen.
- Ein externes magnetisches Feld beeinflusste das Neuritenwachstum in GDNF-PEI-NP-behandelten Ko-Kulturen nicht.

3.2 Minozyklin

Als zweite Substanz zur Unterstützung des Überlebens und der Regeneration von Motorneuronen wurde das potentiell neuroprotektive Antibiotikum Minozyklin gewählt. Organotypische Rückenmarkskulturen und Ko-Kulturen erhielten eine niedrige (10 μM) oder eine hohe (100 μM) Konzentration über einen längeren (ab DIV 1) oder einen kürzeren (ab DIV 4) Kultivierungszeitraum. Die Analyse erfolgte jeweils an DIV 7.

3.2.1 10 μM Minozyklin

3.2.1.1 *Organotypische Rückenmarkskulturen*

Schon die Inkubation mit der niedrigen Minozyklinkonzentration von 10 μM war bei längerer Behandlung (ab DIV 1) neurotoxisch. Es kam zu einer signifikanten Abnahme der überlebenden Motorneurone und der gesamten Neurone (Abbildung 37 A, B). Eine kürzere Inkubationsdauer (ab DIV 4) wirkte sich nicht auf die Überlebensraten aus. Auch die prozentuale Fläche der Neurofilament-Färbung blieb unbeeinflusst von der Dauer der Behandlung mit Minozyklin (Abbildung 37 C). Repräsentative Fluoreszenzaufnahmen sind in Abbildung 38 dargestellt. Obwohl der neuronale Verlust in langzeitbehandelten Kulturen signifikant war, war er im Mikroskop kaum erkennbar. Kontrollkulturen (Abbildung 38 A, D), behandelte Kulturen ab DIV 1 (Abbildung 38 B, E) und ab DIV 4 (Abbildung 38 C, F) ähnelten sich sehr. Alle zeigten eine ausgeprägte Motorneuronenpopulation (Ausschnitts-Vergrößerungen) mit zahlreichen Neuriten.

Die Auswertung der prozentualen Fläche der Mikrogliafärbung (Abbildung 37 D) und der Astrogliafärbung (Abbildung 37 E) ergab weder für die kurze noch für die lange Behandlungsdauer signifikante Unterschiede zwischen Kontrollen und behandelten Kulturen. Repräsentative Fluoreszenzaufnahmen zeigten für alle Kulturen eine mäßige Mikrogliaaktivierung (Abbildung 38 A–C) und einen intakten, den Schnitt bedeckenden Astrogliaüberzug (Abbildung 38 B–F), unabhängig von der Einwirkzeit des Minozyklins.

Die Analyse der prozentualen Fläche DAPI-gefärbter Zellkerne ergab einen signifikanten Anstieg bei Minozyklingabe ab DIV 4 der Kultivierung (Abbildung 37 F), die wahrscheinlich eine Aufsummierung tendenzieller, aber nicht signifikanter Effekte bei der Gesamtneuronenzahl und der Astroglia darstellt (Abbildung 37 B, E).

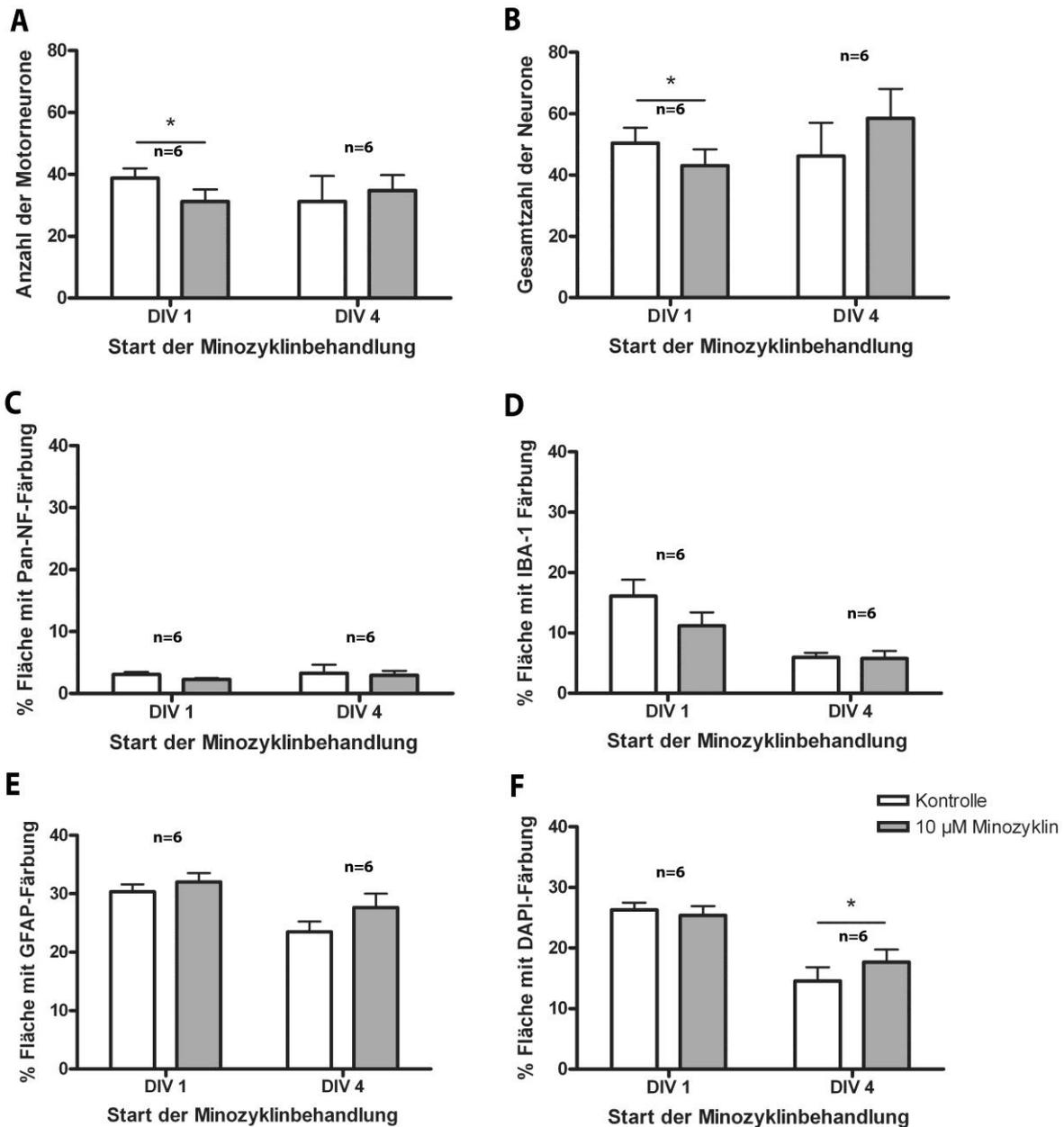


Abbildung 37: Inkubation organotypischer Rückenmarkskulturen mit 10 µM Minozyklin ab DIV 1 oder DIV 4. (A) Anzahl überlebender Motoneurone, (B) Gesamtzahl überlebender Neurone, (C) prozentuale Fläche von Neurofilamenten, (D) prozentuale Fläche aktivierter Mikroglia, (E) prozentuale Fläche Astroglia und (F) prozentuale Fläche DAPI-gefärbter Zellkerne. Mittelwerte + Standardabweichungen. * p < 0,05.

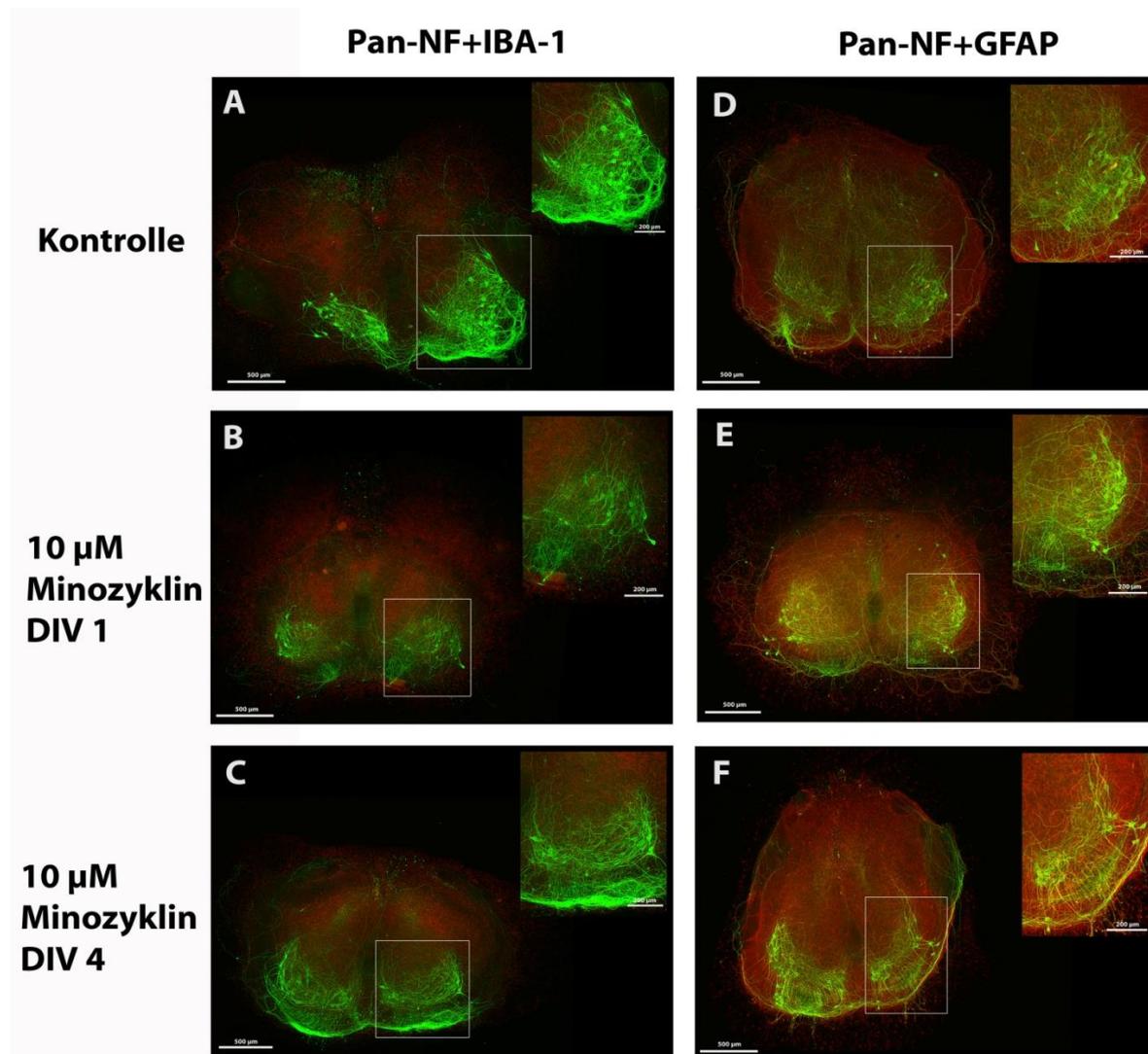


Abbildung 38: Repräsentative Fluoreszenzaufnahmen organotypischer Rückenmarkskulturen inkubiert mit 10 µM Minozyklin. In grün Motorneurone (Kasten und Vergrößerung), Neurone und Neuriten (anti-Pan-NF). (A, B, C) Mikroglia (anti-IBA-1 in rot), (D, E, F) Astroglia (anti-GFAP in rot). (A, D) Kontrollkulturen, (B, E) 10µM Minozyklin ab DIV 1, (C, F) 10 µM Minozyklin ab DIV 4. Maßstab = 500 µm, Maßstab Ausschnitt = 200 µm.

Zusammenfassend lässt sich sagen:

- Längere Inkubation mit 10 µM Minozyklin reduzierte die Anzahl überlebender Motorneurone und die Gesamtzahl der Neurone.
- 10 µM Minozyklin hatte keine Auswirkung auf Mikroglia und Astroglia.

3.2.2 100 μ M Minozyklin

3.2.2.1 Organotypische Rückenmarkskulturen

In einem zweiten Experiment wurde eine höhere Konzentration von 100 μ M Minozyklin untersucht. Diese hohe Konzentration reduzierte die Anzahl überlebender Motorneurone (Abbildung 39 A) und die Gesamtzahl überlebender Neurone (Abbildung 39 B) bereits bei kurzer Einwirkzeit. Die prozentuale Fläche der Neurofilamente zeigte einen interessanten Effekt: bei Kulturen, die schon ab DIV 1 Minozyklin erhielten, erhöhte sich die Neurofilamentfläche signifikant gegenüber der Kontrolle (Abbildung 39 D). Kein Unterschied fand sich dagegen in kurzzeitbehandelten Kulturen. Repräsentative Fluoreszenzaufnahmen dieser Kulturen sind in Abbildung 40 dargestellt. Kontrollkulturen zeigten eine ausgeprägte Population an Motorneuronen, anderen Neuronen und zahlreiche Neuriten (Abbildung 40 A, Vergrößerungsausschnitt). Eine solche Motorneuronenpopulation fand sich auch in Kulturen, die ab DIV 4 mit Minozyklin behandelt wurden (Abbildung 38 C), während in Kulturen, die länger inkubiert wurden (ab DIV 1), kaum noch Motorneurone vorkamen. Diese Kulturen zeigten zudem randständig eine erhöhte Neurofilamentfärbung (Abbildung 38 B), die Ursache für die erhöhte prozentuale Fläche sein könnte.

Um die neuronalen Effekte zu validieren, führte ich eine zusätzliche Färbung mit dem nuklearen Neuronenmarker anti-NeuN durch. Die Analyse dieser Färbungen bestätigte die mit anti-Pan-NF gesehenen neuronalen Auswirkungen des Minozyklins (Abbildung 39 C). Der mit der Inkubationsdauer zunehmende Verlust der Neuronen ließ sich auch mit dieser Färbung darstellen (Abbildung 40 G-I).

Die Untersuchung der Mikroglia zeigte deutlich den inhibitorischen Einfluss des Minozyklins: die prozentuale Fläche der Mikroglia reduzierte sich für beide Inkubationszeiträume signifikant im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 39 E). Besonders anschaulich wurde dies beim Betrachten der Fluoreszenzaufnahmen: Kontrollen zeigten eine mäßige Aktivierung der Mikroglia (Abbildung 40 A), die mit steigender Inkubationsdauer immer mehr abnahm (ab DIV 4, Abbildung 40 C, ab DIV 1, Abbildung 40 B).

Ein interessanter Effekt trat auch bei der Betrachtung der Astroglia auf: Obwohl sich die prozentuale Fläche der gefärbten Astroglia bei der Gabe von Minozyklin ab DIV 1 im Vergleich zur Kontrolle nicht änderte (Abbildung 39 F), fand sich eine veränderte

Verteilung der Zellen im Schnitt. Während Kontrollkulturen einen intakten, den gesamten Schnitt bedeckenden Astrogliaüberzug aufwiesen (Abbildung 40 D), zeigten langzeitbehandelte Minozyklinkulturen eine randständige Verteilung der Glia (Abbildung 40 E). Bei kürzerer Inkubation trat dieser Effekt nicht auf (Abbildung 40 F).

Die prozentuale Fläche DAPI-gefärbter Zellkerne reduzierte sich unabhängig von der Dauer der Behandlung (Abbildung 39 G).

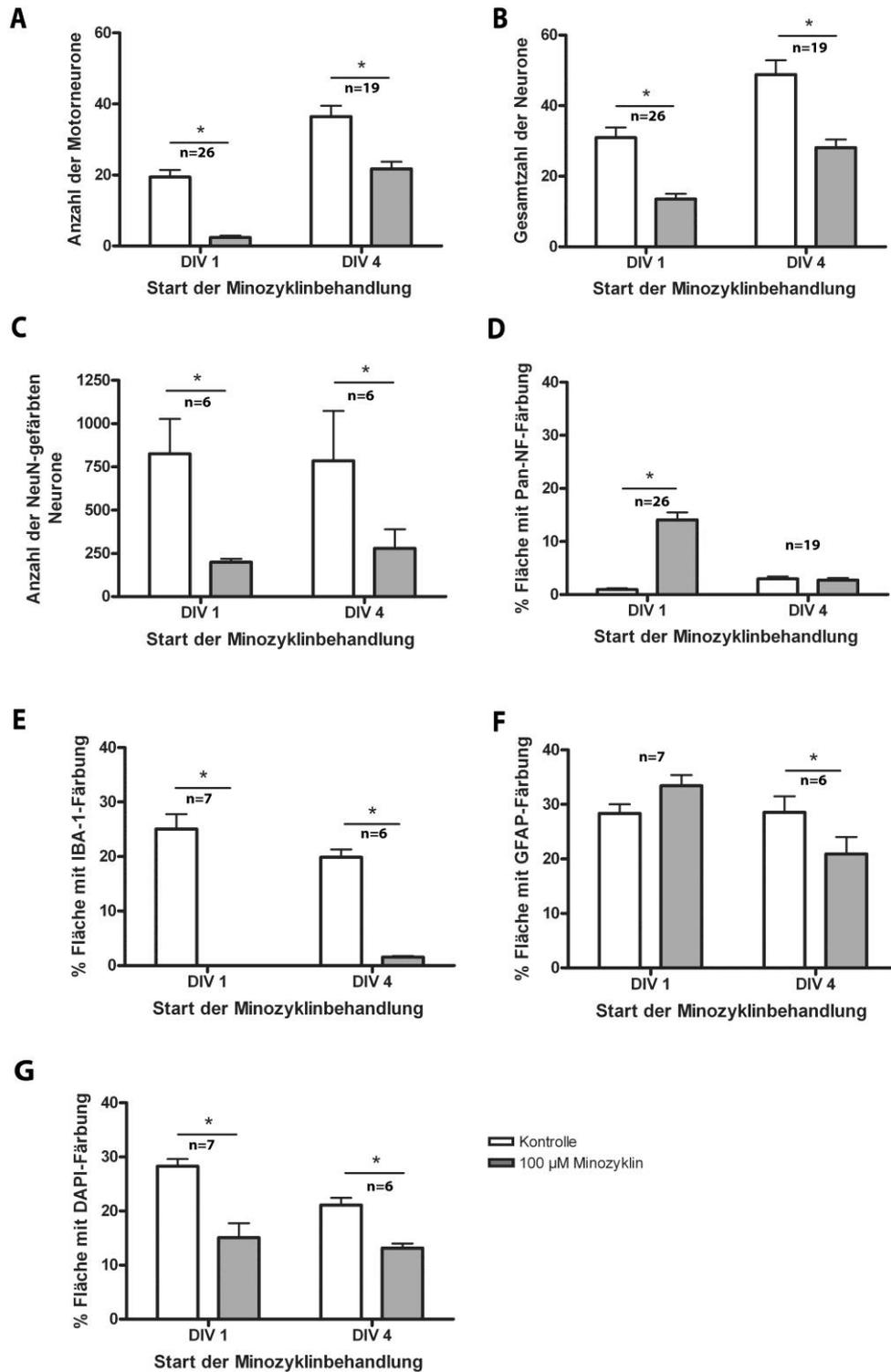


Abbildung 39: Inkubation organotypischer Rückenmarkskulturen mit 100 µM Minozyklin ab DIV 1 oder DIV 4. (A) Anzahl überlebender Motorneurone, (B) Gesamtzahl überlebender Neurone, (C) Anzahl anti-NeuN-gefärbter Neurone, (D) prozentuale Fläche von Neurofilamenten, (E) prozentuale Fläche aktivierter Mikroglia, (F) prozentuale Fläche Astroglia und (G) prozentuale Fläche DAPI-gefärbter Zellkerne. Mittelwerte + Standardabweichungen. * p < 0,05.

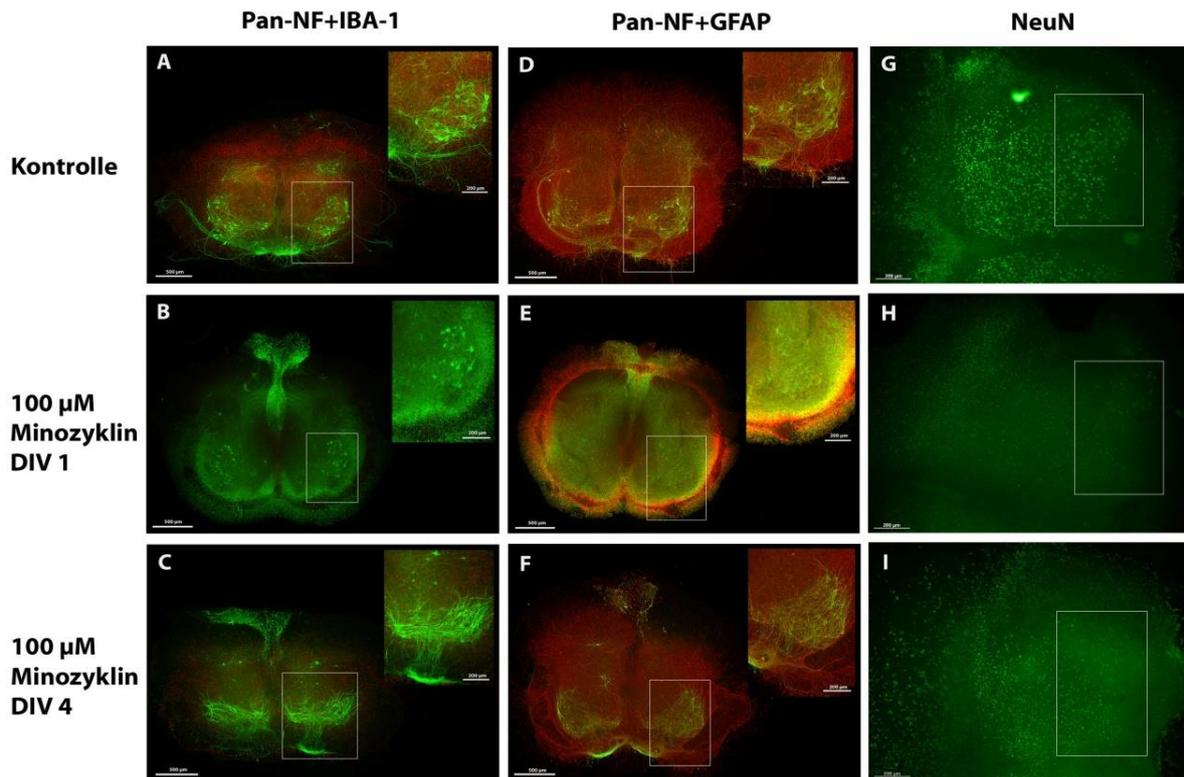


Abbildung 40: Repräsentative Fluoreszenzaufnahmen organotypischer Rückenmarkskulturen inkubiert mit 100 µM Minozyklin. (A-F) Motorneurone (Ausschnitte), Neurone und Neuriten (anti-Pan-NF, grün), (G-I) anti-NeuN-gefärbte Neurone in grün. (A-C) Mikroglia (anti-IBA-1, rot), (D-F) Astroglia (anti-GFAP, rot). (A, D) Kontrollkulturen, (B, E) Minozyklin ab DIV 1, (C, F) Minozyklin ab DIV 4. Maßstab = 500 µm, Maßstab Ausschnitt = 200 µm.

Um die Effekte von 100 µM Minozyklin auf die Motorneuronenpopulation genauer zu betrachten, fertigte ich eine Zeitreihe an. Dafür wurden organotypische Rückenmarkskulturen, jeweils beginnend ab DIV 1, 3, 4 und 6, für die gesamte restliche Kultivierung mit Minozyklin inkubiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 41 dargestellt.

Minozyklin reduzierte die Anzahl überlebender Motorneurone abhängig von der Dauer der Inkubation dramatisch. Je länger die Inkubation, desto mehr Motorneurone gingen verloren. Nur bei einer Inkubation von 24 h (ab DIV 6) überlebten genauso viele Motorneurone wie bei den korrespondierenden Kontrollen (Abbildung 41 A). Die Gesamtzahl überlebender Neurone zeigte ähnliche Ergebnisse. Auch sie reduzierte sich signifikant bei Minozyklingabe ab DIV 1, 3 und 4, jedoch nicht ab DIV 6 (Abbildung 41 B). Ab DIV 1 und DIV 3 behandelte Kulturen wiesen zudem eine signifikante Erhöhung der prozentualen anti-Pan-NF-Fläche auf. Für Kulturen, die ab DIV 4 oder DIV 6 Minozyklin

erhielten, konnten keine diesbezüglichen Unterschiede zur Kontrolle gefunden werden (Abbildung 41 C).

Die Ergebnisse lassen sich auch gut anhand der repräsentativen Fluoreszenzaufnahmen in Abbildung 42 nachvollziehen. Kontrollkulturen zeigten eine ausgeprägte Motorneuronenpopulation, andere Neurone (sensorische Neurone und Interneurone) und zahlreiche Neuriten (Abbildung 42 A). Dagegen führte die Inkubation mit Minozyklin ab DIV 1 und DIV 3 zu einem Verlust der Motorneurone (Abbildung 42 B, C). Kulturen mit Minozyklin ab DIV 3 zeigten eine interessante Varianz: entweder wiesen die Kulturen stark degenerierte Motorneurone auf (Abbildung 42 C1) oder der Verlust der Motorneurone war bereits eingetreten (Abbildung 42 C2). Kulturen, die ab DIV 4 oder DIV 6 mit Minozyklin inkubiert wurden, wiesen kaum neurodegenerative Zeichen auf; sie enthielten Motorneuronenpopulationen, andere Neurone und zahlreiche Neuriten (Abbildung 42 D, E).

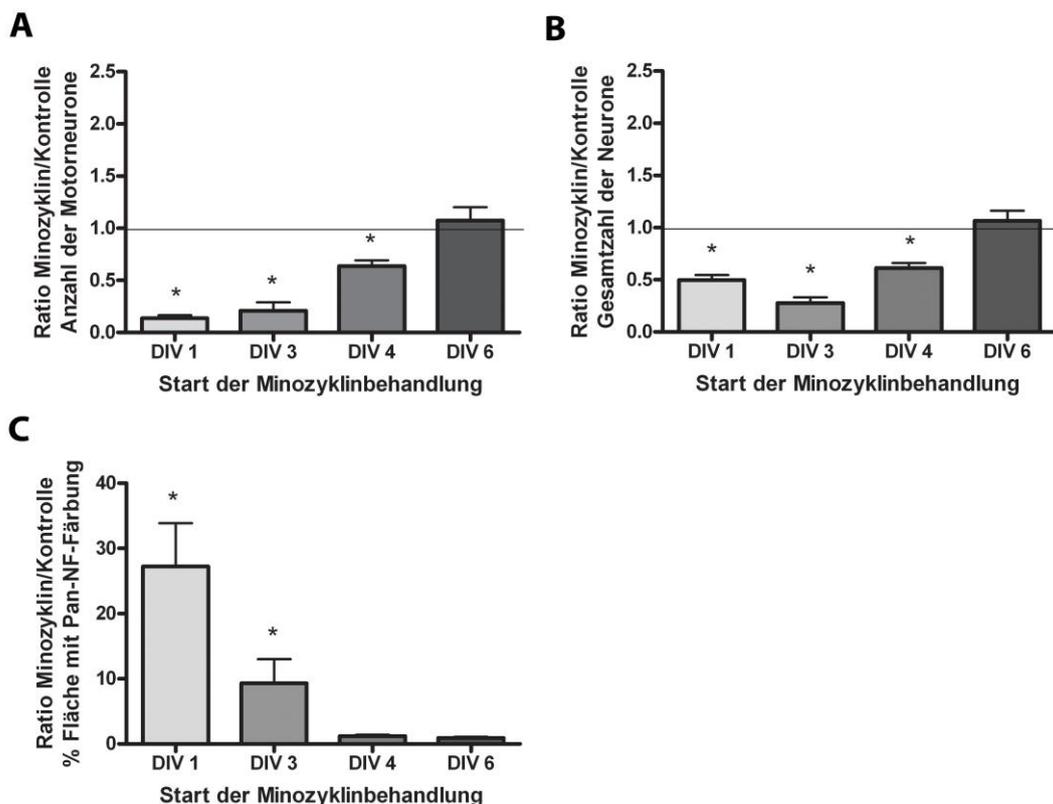


Abbildung 41: Zeitreihe mit 100 μ M Minozyklin behandelter organotypischer Rückenmarkskulturen. Start der Inkubation an DIV 1, 3, 4 oder 6. (A) Ratio Minozyklin/Kontrolle für die Anzahl überlebender Motorneurone, (B) Ratio für die Gesamtzahl überlebender Neurone und (C) Ratio für die prozentuale Fläche der anti-Pan-NF-gefärbten Neurofilamente. Mittelwerte + Standardabweichungen, Ratio = 1 entspricht Kontrolle = behandelte Kultur und ist in (A, B) mit Linie markiert. * $p < 0,05$.

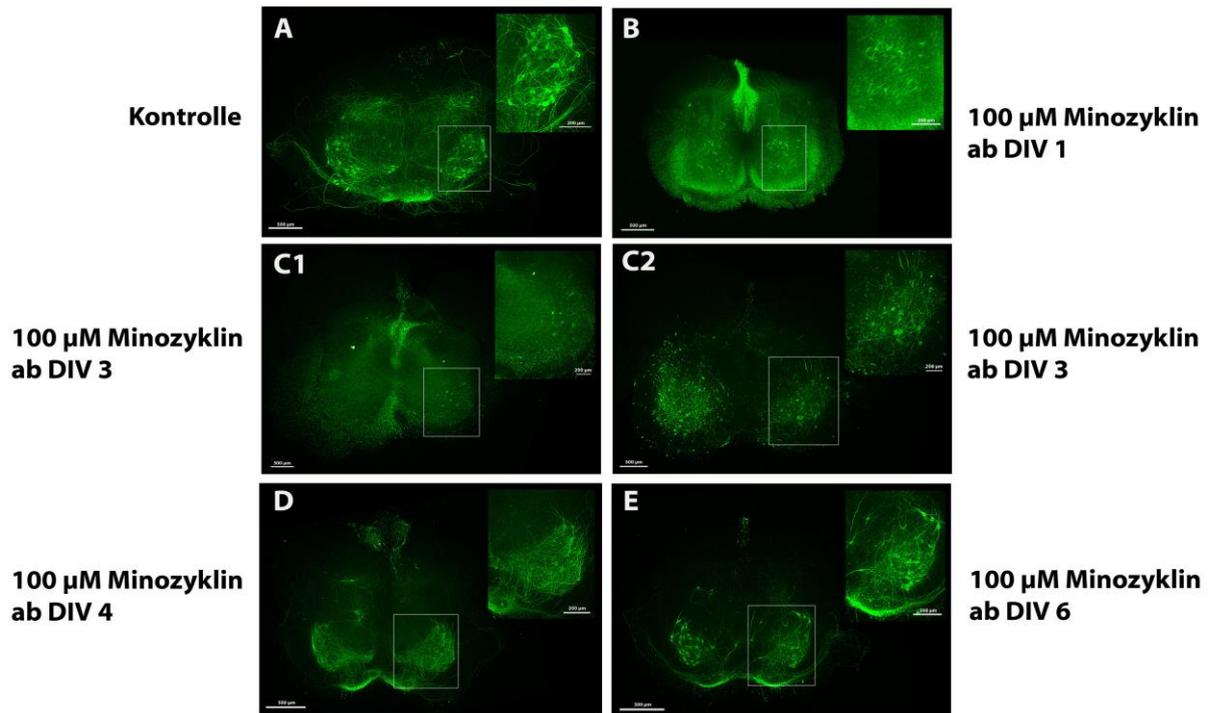


Abbildung 42: Repräsentative Fluoreszenzaufnahmen der Zeitreihe anti-Pan-NF-gefärbter organotypischer Rückenmarkskulturen inkubiert mit 100 µM Minozyklin. (A) Kontrollkultur, (B) Minozyklingabe ab DIV 1, (C) Minozyklin ab DIV 3. (C1) degenerierende Motorneurone, (C2) bereits fehlende Motorneurone, (D) Minozyklin ab DIV 4 und (E) Minozyklin ab DIV 6. Maßstab = 500 µm, Maßstab Ausschnitt = 200 µm.

Zusammenfassend lässt sich sagen:

- 100 µM Minozyklin wirkte neurotoxisch.
- 100 µM Minozyklin inhibierte die Mikrogliaaktivierung.
- 100 µM Minozyklin führte bei Kulturen, die ab DIV 1 behandelt wurden, zu einer randständigen Verteilung der Astroglia.
- Je kürzer die Minozyklinbehandlung, umso höher die Anzahl überlebender Motorneurone und Neurone in den organotypischen Rückenmarkskulturen.

3.2.2.2 Organotypische Ko-Kulturen

Um zu überprüfen, ob es durch eine Verbesserung der Kultivierungsbedingungen möglich wäre, die toxischen Effekte der hohen Minozyklinkonzentration zu verringern bzw. zu kompensieren, nutzte ich organotypische Ko-Kulturen aus Rückenmarksschnitten und peripheren Nerven. Die Ausschüttung von Wachstumsfaktoren und Phagozytose von Zelldebris durch die so in die Kulturen eingeführten Schwanzzellen sollte eine regenerationsfördernde Umgebung schaffen und damit die Überlebensrate der Motorneurone in den Kulturen verbessern.

Das war jedoch nicht der Fall; die zusätzliche Anwesenheit der Schwanzzellen führte nicht zu einer Kompensation der neurotoxischen Minozyklineffekte. Minozyklin induzierte auch in diesen Ko-Kulturen einen signifikanten Verlust der Motorneurone (Abbildung 43 A) und der Gesamtzahl an überlebenden Neuronen (Abbildung 43 B). Auch hier kam es zu einer Erhöhung der prozentualen anti-Pan-NF-Fläche, wenn die Kulturen ab DIV 1 mit Minozyklin inkubiert wurden (Abbildung 43 C). Die prozentuale Fläche der anti-GFAP-gefärbten Astroglia veränderte sich nicht (Abbildung 43 D). Betrachtet man die repräsentativen Fluoreszenzaufnahmen in Abbildung 44, so ergibt sich ein ähnliches Bild wie bei den organotypischen Rückenmarkskulturen ohne Nerv. Die Kontroll-Ko-Kulturen (Abbildung 44 A) zeigten eine ausgeprägte Motorneuronenpopulation, deren Neuriten in den peripheren Nerven einwachsen und damit zur Rekonstruktion der ventralen Nervenwurzel führten. Die Rückenmarksschnitte waren von einem Astrogliaüberzug bedeckt. Ko-Kulturen, die ab DIV 1 mit 100 μ M Minozyklin inkubiert wurden, wiesen einen Verlust der Motorneuronenpopulation auf. Dadurch fehlten auch die in den Nerven einwachsenden Neuriten. Die Astroglia war in den Randbereichen des Rückenmarkschnittes lokalisiert (Abbildung 44 B). Ko-Kulturen, die ab DIV 4 Minozyklin erhielten, wiesen keine deutlich sichtbaren Unterschiede zu den Kontroll-Ko-Kulturen auf (Abbildung 44 C).

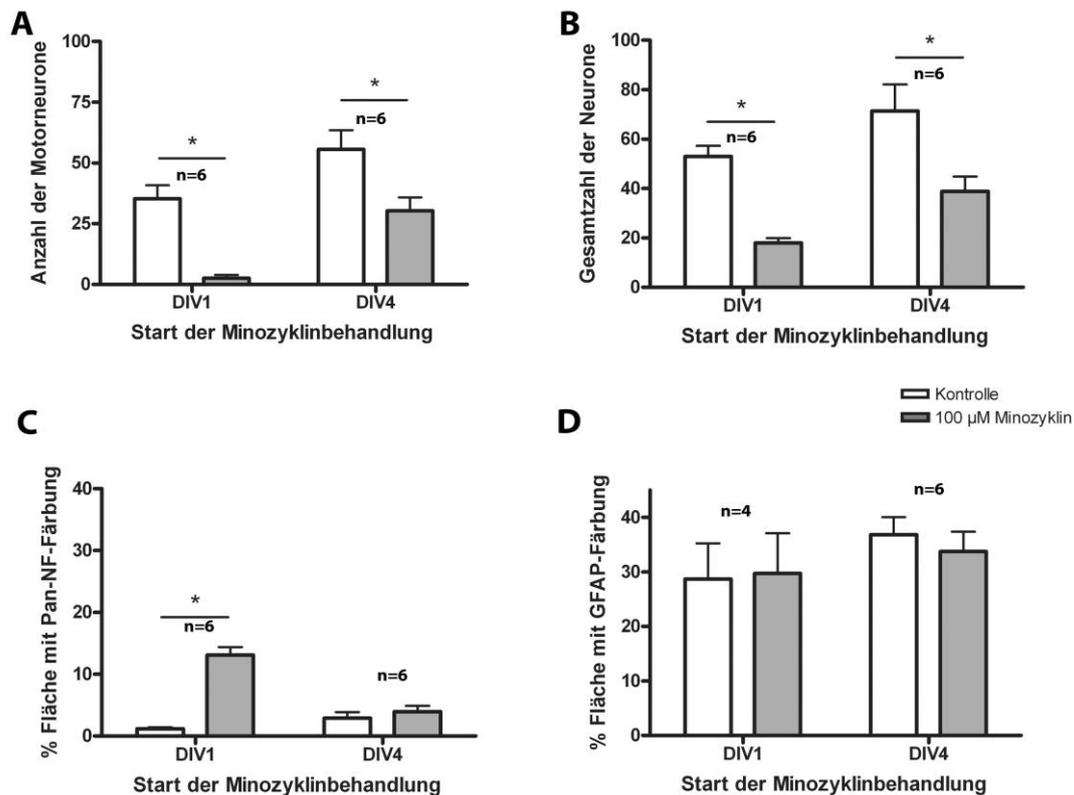


Abbildung 43: Inkubation organotypischer Ko-Kulturen mit 100 μ M Minoxidil ab DIV 1 oder DIV 4. (A) Anzahl überlebender Motoneurone, (B) Gesamtzahl überlebender Neurone, (C) prozentuale Fläche Neurofilamente (anti-Pan-NF) und (D) prozentuale Fläche Astroglia (anti-GFAP). Mittelwerte + Standardabweichungen. * $p < 0,05$.

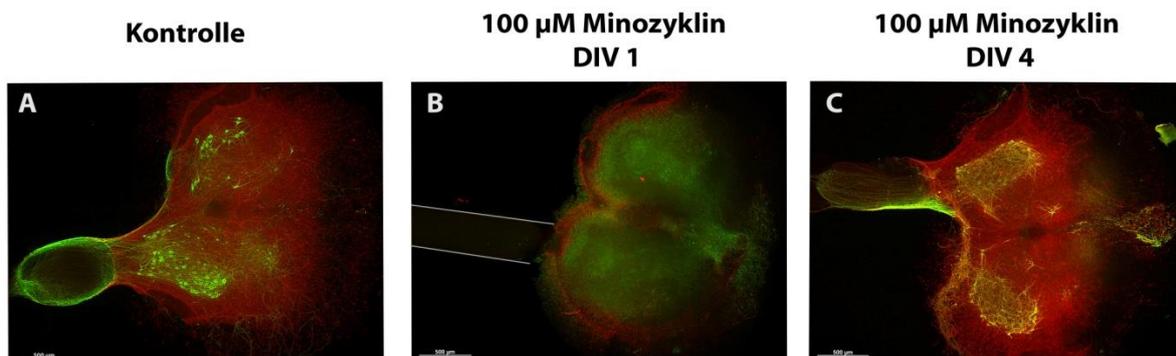


Abbildung 44: Repräsentative Fluoreszenzaufnahmen organotypischer Ko-Kulturen nach der Inkubation mit 100 μ M Minoxidil. In grün Motoneurone, Neurone und ihre Neuriten (anti-Pan-NF), rot Astroglia (anti-GFAP). (A) Kontrollkultur, (B) Minoxidil ab DIV 1 und (C) ab DIV 4. Maßstab = 500 μ m.

Zusammenfassend lässt sich sagen:

- Eine Verbesserung der Kultivierungsbedingungen durch Schwanzzellen verringerte die neurotoxische Wirkung von Minozyklin nicht.
- Auch in organotypischen Ko-Kulturen führten 100 µM Minozyklin ab DIV 1 zu einer randständigen Verteilung der Astroglia.

3.2.2.3 Kortikale gliareiche Mischkulturen**3.2.2.3.1 Zytotoxizität**

In den organotypischen Rückenmarkskulturen und Ko-Kulturen verursachte die Inkubation mit 100 µM Minozyklin über einen längeren Zeitraum eine veränderte Verteilung der Astroglia im bzw. auf den Gewebeschnitten. Bei einer kürzeren Inkubation ergab sich eine Reduktion der prozentualen Fläche der Astroglia. Um diese Effekte näher zu betrachten, führte ich zusätzlich eine Reihe von Experimenten an kortikalen gliareichen Mischkulturen durch. Diese Kulturen enthalten einen hohen Anteil an Astroglia (2.2.1.2) und könnten daher Hinweise auf die Effekte von Minozyklin auf diese Zellen geben.

Zunächst testete ich die Zellviabilität mit steigenden Minozyklinkonzentrationen, um einen zytotoxischen Effekt auszuschließen bzw. zu bestätigen. Abbildung 45 zeigt die Ergebnisse. 24 h Minozyklin führte für Konzentrationen ab 50 µM zu einer generellen Zellproliferation in den kortikalen Mischkulturen. Eine Behandlung für 72 h oder länger reduzierte die Zellviabilität jedoch, und das unabhängig von der Minozyklinkonzentration.

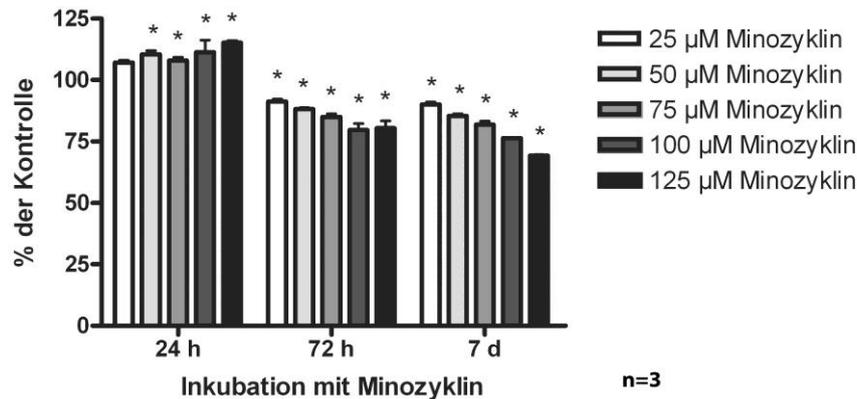


Abbildung 45: MTT-Viabilitätstest kortikaler gliareicher Mischkulturen mit Minoxycyclinbehandlung. Viabilität der Kontrollzellen = 100 %. Mittelwerte + Standardabweichungen. * $p < 0,05$.

3.2.2.3.2 Wundheilungstest

Die gefundene veränderte Astrogliaverteilung könnte auch auf eine Beeinflussung der Zellmigration durch Minoxycyclin hindeuten. Um dieses zu untersuchen, führte ich einen Wundheilungstest durch. Dabei wird die Migration der Zellen nach Verletzung des Zellrasens gemessen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 46 dargestellt. Schon nach 24 h verlangsamte sich die Wundheilung bei Zellen, die Minoxycyclin erhielten, signifikant. 48 h nach der Wundsetzung blieb dieser Trend erhalten. 72 h nach der Verletzung trat wieder eine signifikant verlangsamte Migration der behandelten Zellen auf (Abbildung 46 A). Repräsentative Phasenkontrastaufnahmen sind in Abbildung 46 B dargestellt.

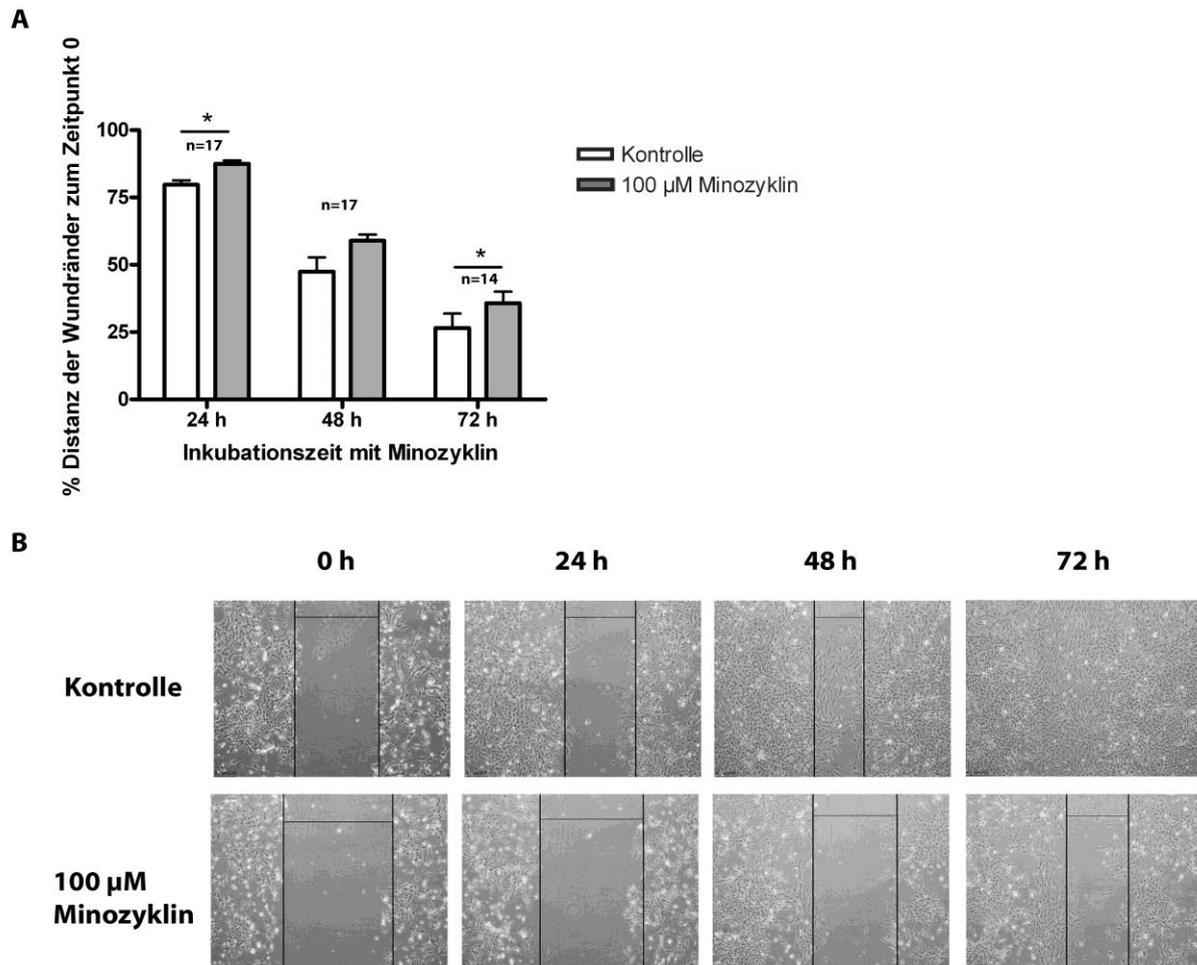


Abbildung 46: Wundheilungstest an kortikalen gliareichen Mischkulturen nach Minozyklininkubation (100 µM) für insgesamt 72 h. (A) % Distanz der Wundränder bezogen auf den Zeitpunkt 0 h. Mittelwerte + Standardabweichungen. (B) repräsentative Phasenkontrastaufnahmen des Zellrasens nach 0, 24, 48 und 72 h (Kontrolle oben, Minozyklin behandelte Kulturen unten). Wundränder sind markiert mit schwarzen Linien. * $p < 0,05$.

3.2.2.3.3 Western Blot Analyse

β -Aktin und Cx 43 sind Proteine, die auf unterschiedliche Weise an der Migration von Astroglia beteiligt sind. β -Aktin ist ein Protein des Zytoskeletts während Cx 43 ein Protein des Hemikanals von gap junctions, den Verbindungen zwischen Zellen, ist. Sollte Minozyklin tatsächlich die Astroglia migration beeinflussen, könnte die Expression dieser beiden Proteine Angriffspunkt für das Minozyklin gewesen sein. Deshalb untersuchte ich ihre Proteinexpression nach den gleichen Bedingungen wie im Wundheilungstest. Zellen erhielten 100 µM Minozyklin für 72 h. Zwar beeinflusste Minozyklin die Proteinexpression von β -Aktin nicht (Abbildung 47 A, B), erhöhte jedoch

die Proteinexpression von Cx 43 signifikant gegenüber den Kontrollzellen (Abbildung 47 C, D).

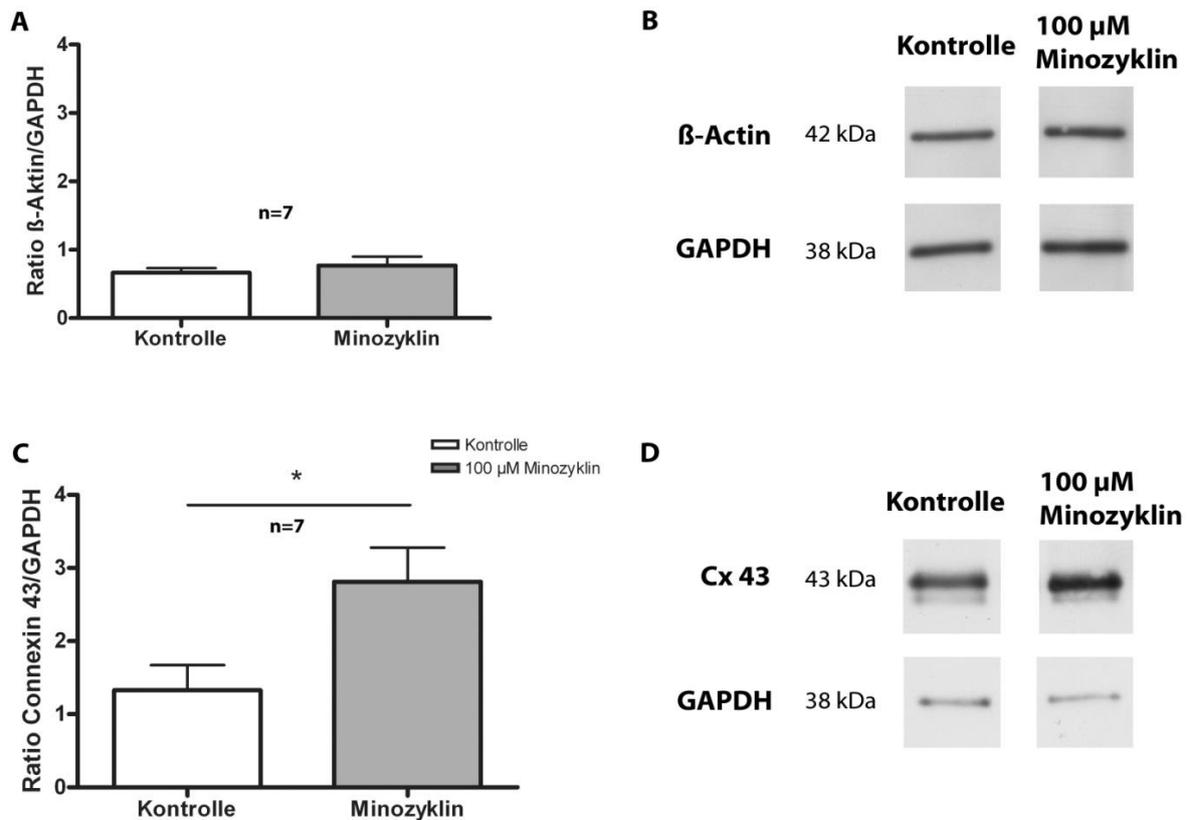


Abbildung 47: Western Blot kortikaler gliareicher Mischkulturen nach Inkubation mit 100 μ M Minozyklin für 72 h. (A) Ratio der densitometrischen Grauwerte von β -Aktin/GAPDH. (B) repräsentative Banden für β -Aktin und korrespondierende GAPDH-Kontrollen. (C) Ratio der densitometrischen Grauwerte von Cx 43/GAPDH. (D) repräsentative Banden für Cx 43 und korrespondierende GAPDH-Kontrollen. Mittelwerte + Standardabweichungen. * $p < 0,05$.

Zusammenfassend lässt sich sagen:

- Minozyklin wirkte nach längerer Behandlung zytotoxisch auf kortikale gliareiche Mischkulturen.
- 100 μ M Minozyklin verzögerte die Wundheilung.
- 100 μ M Minozyklin erhöhte die Proteinexpression von Cx43.

4 Diskussion

4.1 Magnetische NPs

4.1.1 Zytotoxizität

NPs weisen ein hohes Verhältnis von Oberfläche zu Volumen auf und können daher chemisch sehr reaktiv sein. Selbst bei einer Beschichtung mit nicht-zytotoxischen Molekülen ist die Anzahl an möglichen Bindungspartnern für andere Moleküle hoch. Vor einer *in vitro*-Anwendung sollte deshalb ein möglicher zytotoxischer Effekt der NPs untersucht werden. Zunächst führte ich Viabilitätstests an cerebellaren Misch- und Schwanzzell-Kulturen mit steigenden NP-Konzentrationen durch. Die Sensitivität der Zellen erwies sich als abhängig von den verwendeten NPs (k-NPs oder PEI-NPs) und von der Art der Zellkulturen. Dabei zeigten sich gliareiche Mischkulturen und Schwanzzell-Kulturen sensibler gegenüber k-NPs als die neuronengereicherten Mischkulturen. Bei der Inkubation mit PEI-NPs zeigten sich zytotoxische Auswirkungen auf gliareiche und neuronengereicherte Mischkulturen, jedoch keine bei den Schwanzzell-Kulturen. Die Zytotoxizität von NPs scheint primär durch oxidativen Stress ausgelöst zu werden. Fe₂O₃-NPs führten z. B. in humanen Brustkrebszellen zur Generierung von ROS, zur Lipidperoxidation und zur Reduktion der Superoxid-Dismutase, des Glutathions und der Katalasenaktivität. Höhere Konzentrationen dieser NPs leiteten auch die Apoptose der Zellen ein (Alarifi et al., 2014). Carlson et al. (2008) zeigten, dass auch Silber-NPs in Abhängigkeit von ihrer Größe zu einer ROS-Bildung und der Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine und Chemokine in Makrophagen führten. Yang et al. (2009) verglichen Rußpartikel, Kohlenstoffnanoröhren, Silikondioxid- und Zinkoxid-NPs in embryonalen Mäusefibroblasten miteinander und fanden für die Zinkoxid-NPs eine deutlich höhere Zytotoxizität als für die nicht-metallischen NPs. Dies korrelierte mit den intrazellulären Leveln von oxidativem Stress. Dagegen führten Kohlenstoffnanoröhren eher zu DNA-Schäden als zu hohen oxidativen Stressleveln. Generell scheint die Sensitivität von Zellen gegenüber NPs abhängig von der Art der Zellen, von der Art der eingesetzten NPs, ihrer Konzentration und auch der Inkubationszeit. Daher sollte vor jedem Experiment mit NPs die Zytotoxizität in den jeweiligen Zellen überprüft und bewertet werden.

4.1.2 Zelluläre Aufnahme

Die zytotoxischen Effekte in einem Teil der von mir benutzten Zellkulturen, aber auch die Preußisch-Blau-Färbungen und die konfokalen 3-D-Projektionen, legten eine intrazelluläre Aufnahme der NPs nahe. Elektronenmikroskopische Untersuchungen bestätigten eine intrazelluläre Lokalisation von NPs in Vesikeln. In der Literatur sind zahlreiche Studien zu finden, die für verschiedene NPs eine endozytotische, vesikuläre Aufnahme beschreiben (Mailänder und Landfester, 2009; Iversen et al., 2011). Die Möglichkeit, NPs direkt, ohne Lagerung in Vesikeln, in das Zytoplasma von Zellen zu befördern, erscheint dagegen schwierig (Iversen et al., 2011). Selbst die Funktionalisierung mit positiv geladenen zellpenetrierenden Peptiden resultiert scheinbar in der Aufnahme in Endosomen und nicht direkt ins Zytoplasma (Ruan et al., 2007).

Endozytose ist ein Prozess, mit dessen Hilfe Zellen Moleküle und Partikel aufnehmen können. Dabei werden Membranabschnitte aus der Zellmembran eingestülpt und Partikel und extrazelluläre Flüssigkeiten internalisiert. In den letzten Jahren sind eine Vielzahl von endozytotischen Mechanismen in der Literatur beschrieben worden (Abbildung 48). Die bekanntesten sind die Phagozytose (Aufnahme von großen Partikeln wie Bakterien), die Pinozytose (Aufnahme von flüssigen, die Zelle umgebenden Material inklusive aller darin enthaltenen Substanzen) und die Clathrin-vermittelte Endozytose (häufig Aufnahme von Rezeptoren und ihrer Liganden). Aufgenommene Substanzen werden im frühen Endosom nach „wieder verwertbar“ oder „zum Abbau bestimmt“ sortiert. Über späte Endosomen gelangen die Substanzen in die Lysosomen. Diese Organellen besitzen einen sehr niedrigen pH-Wert und enthalten eine Reihe von degradierenden Enzymen, die den Abbau von Molekülen bewerkstelligen (Mukherjee et al., 1997; Lodish und Lange, 2001; Doherty und McMahon, 2009).

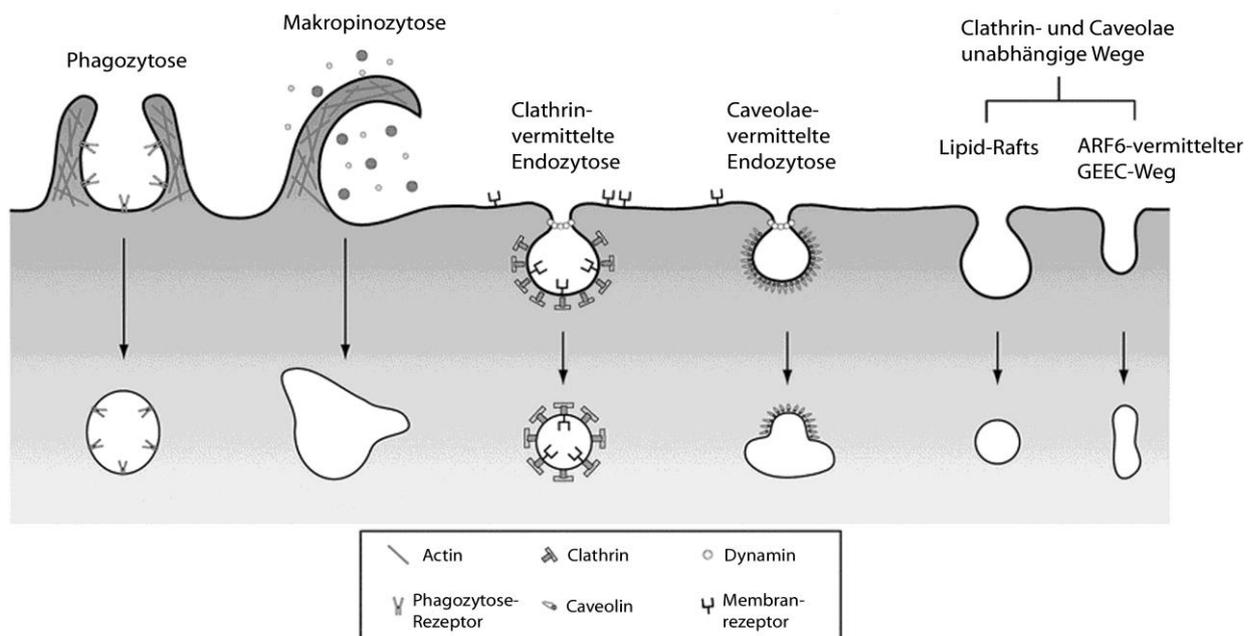


Abbildung 48: Wege der zellulären Aufnahme. Modifiziert nach Chou et al. (2010).

Die Aufnahme von zahlreichen NPs scheint in erster Linie über Clathrin-vermittelte oder Caveolae-abhängige Endozytose zu geschehen und führt im Allgemeinen zu der auch in dieser Arbeit beschriebenen Lokalisation in zytoplasmatischen Vesikeln.

Diese stellen vermutlich Endosomen oder Lysosomen dar. Zukünftige Experimente müssen klären, ob die Aufnahme z. B. rezeptorvermittelt ist und ob die NPs in den Vesikeln verbleiben, wieder ausgeschleust oder abgebaut werden. Es ist anzunehmen, dass die Antworten auf diese Fragen stark abhängig sind von den aufnehmenden Zellen und den aufzunehmenden NPs.

Z. B. wurden die meisten NPs in den von mir verwendeten cerebellaren Mischkulturen von Mikroglia aufgenommen. Dies entspricht ihrer Funktion als Immunzellen des ZNS. Mikrogliazellen durchsuchen im Ruhezustand mit ihren Fortsätzen ihre Umgebung auf der Suche nach Pathogenen oder Veränderungen der Homöostase. Aktiviert werden können sie entweder durch die Bindung an Rezeptoren wie z. B. dem Komplementfaktor Toll-like Rezeptor (bindet u. a. bakterielle und virale Strukturen), über den Wegfall von Zell-Zell-Kontakten mit Neuronen (vermittelt über Liganden-Rezeptor Komplexe wie CX₃CL1-CX₃CR), über Veränderungen im Neurotransmittersignal umgebender Zellen (Hanisch und Kettenmann, 2007; Saijo und Glass, 2011; Czirr und Wyss-Coray, 2012), aber auch über Serumproteine, die an CD11b/CD18-Rezeptoren binden (Ransohoff und Perry, 2009). Aktivierte Mikrogliazellen verändern ihre Morphologie, regulieren die Expression von immunologisch relevanten Molekülen wie Chemokin-Rezeptoren, dem

Haupthistokompatibilitätskomplex und phagozytische Rezeptoren hoch und proliferieren (Suzumura A, 1991; Aloisi et al., 1999; Neumann et al., 2008). Lundqvist et al. (2008) zeigten in einer Studie, dass NPs, die in Blutplasma verdünnt wurden, von einer Proteinkorona umgeben werden. Verschiedene Partikelgrößen und Ladungen führten dabei zur Bildung von unterschiedlichen Koronen, die sich aus Immunglobulinen, Lipoproteinen und Komplementfaktoren zusammensetzten. Dadurch können NPs opsoniert werden, Komplementrezeptoren aktivieren und von Mikroglia und Makrophagen phagozytiert werden. Die in meinen Experimenten verwendeten NPs wurden alle in serumhaltigem Medium verdünnt. Somit ist die Bildung einer Proteinkorona und damit die Opsonierung der NPs und letztendlich ihre Phagozytose durch Mikrogliazellen wahrscheinlich. Die Inkubation der cerebellaren Mischkulturen mit NPs führte nicht nur zu einer hohen Aufnahme der NPs durch Mikrogliazellen, sondern induzierte auch eine Mikroglia proliferation. Darauf deuteten schon die Ergebnisse der Viabilitätstests hin, die den Einsatz von Minozyklin zur Inhibierung der Mikrogliaaktivierung erforderten, um interpretierbare Ergebnisse zu erhalten. Die Quantifizierung der Zellzahl ergab einen Anstieg der Mikroglia um 7,8 % in den Kulturen nach nur 24 h NP-Inkubation. Ob diese Aktivierung der Mikroglia durch die NPs auch zu einer Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine/Chemokine führt, muss in weiteren Experimenten geklärt werden. Generell scheint es für die Phagozytose von NPs dabei unerheblich zu sein, ob die Mikroglia aktiviert ist oder nicht. Pickard und Chari (2010) stimulierten mit NP-inkubierte Mikroglia zusätzlich mit Lipopolysaccharid, einem Baustein bakterieller Zellwände, konnten aber keine zusätzliche Aufnahme der NPs oder Änderungen der Zellmorphologie finden. Womöglich phagozytieren Mikrogliazellen auch ohne Aktivierung mit inflammatorischer Antwort bis zur Sättigungsgrenze.

Ähnliches lässt sich auch in Tiermodellen beobachten. Wang et al. (2011) behandelten Mäuse über 40 Tage intranasal mit Fe_2O_3 -NPs. Die NPs verteilten sich im Hirngewebe, vor allem im olfaktorischen Bulbus, und führten zur Aktivierung der Mikroglia und zu zellulären Veränderungen im olfaktorischen Bulbus, dem Hippocampus und dem Striatum. In einer mikroglialen Zelllinie wiesen auch diese Autoren eine Zellproliferation, die Phagozytose der NPs, eine ROS- und NO-Bildung, aber keine Induktion proinflammatorischer Stoffe nach.

Neben Mikrogliazellen nahmen auch Astroglia und Oligodendroglia in den cerebellaren Mischkulturen NPs auf. Diese Aufnahme beeinflusste jedoch nicht die Zellzahl an sich,

und die Anzahl der Zellen mit einer NP-Aufnahme war auch deutlich geringer als bei den Mikrogliazellen. Ungefähr 80 % der Mikrogliazellen, 41 % der Astrogliazellen und 19 % der Oligodendrogliazellen nahmen NPs auf. Die Gleiche „Hierarchie“ der NP-Aufnahme wurde kurz nach der Veröffentlichung meiner Ergebnisse (Pinkernelle et al., 2012) auch von Jenkins et al. (2013) beschrieben. Sowohl für Astroglia als auch für Oligodendroglia ist Phagozytose unter bestimmten Bedingungen beschrieben (Noske et al., 1982; Triarhou et al., 1985; Tansey und Cammer, 1998; Kalmár et al., 2001). Phagozytose scheint in diesen Zellen jedoch von der Umgebung und dem Vorkommen anderer phagozytischer Zellen abhängig zu sein, sowie in der Geschwindigkeit zwischen den Zellen zu variieren. Z. B. inkubierten Tansey und Cammer (1998) primäre gliale Zellkulturen mit fluoreszierenden Dextrankügelchen und verglichen deren intrazelluläre Aufnahme in Mikroglia, Astroglia und Oligodendroglia nach 1 h. Mikroglia und Astroglia wiesen nach dieser kurzen Zeit schon eine Internalisierung auf, während Oligodendroglia diese noch nicht zeigten. In Kulturen mit Mikrogliamangel konnte gezeigt werden, dass Astrogliazellen den phagozytischen Part übernehmen und Pathogene aufnehmen (Noske et al., 1982). Generell können Astrogliazellen auch eine Funktion als Immunzellen übernehmen. Sie können Moleküle für die Antigenpräsentation und T-Zellaktivierung exprimieren und Chemokine und Zytokine produzieren (Dong und Benveniste, 2001). Vermutlich nahmen in meinen Kulturen auch Astrogliazellen einen Teil der opsonierten NPs über Phagozytose auf. In Oligodendroglia scheint es dagegen schwieriger zu sein, eine zufriedenstellende Aufnahme von NPs zu erreichen. Jenkins et al. (2011) erreichten dies in Kulturen aus Oligodendroglia-Vorläuferzellen nur durch die Methode der Magnetofektion, bei der die NPs durch ein Magnetfeld in die Zelle gezwungen wurden. Die Aufnahme von NPs in Oligodendroglia, Schwannzellen und Fibroblasten ist vermutlich nicht über Phagozytose vermittelt, da die Menge an internalisierten NPs visuell deutlich geringer ist als bei den Mikroglia und die Kultivierungsbedingungen Phagozytose nicht fördern. Z. B. induzieren Schwannzellen Phagozytose erst nach einer Aktivierung durch die Verletzung eines Nervs (Stoll et al., 1989; Reichert et al., 1994). Fibroblasten zeigen Phagozytose vor allem bei Wundverletzungen (Arlein et al., 1998). Neben Phagozytose ist die Aufnahme über weitere endozytotische Wege durchaus möglich (Unfried et al., 2007; Busch et al., 2011).

4.1.3 Anwendung in organotypischen Rückenmarkskulturen

Obwohl die Untersuchung von NP-Aufnahme und NP-Effekten in Einzelzell-Kulturen zunächst einfacher und sinnvoller erscheinen, verwendete ich Mischkulturen. Mit Mischkulturen ist es möglich, eine genauere Prognose zu der Aufnahme von NPs auch im Gewebe zu treffen, da Mischkulturen die Interaktionen von unterschiedlichen Zelltypen miteinander ermöglichen. Diese gegenseitige Beeinflussung kann in ganz anderen Ergebnissen resultieren. Z. B. plädierten auch Pickard und Chari (2010) für die Verwendung von Mischkulturen mit verschiedenen Gliazellen und Neuronen. Sie vermuteten, dass es in Mischkulturen zum Wegfangen der NPs durch die Mikroglia kommt, was die Aufnahme in den anderen Zelltypen reduziert. Tatsächlich fand ich, dass Mikroglia deutlich mehr NPs aufnahmen als andere Zellen und damit vermutlich die Menge der zur Verfügung stehenden NPs reduzierten. Ob es ohne Mikroglia tatsächlich zu einer erhöhten Aufnahme durch andere Zelltypen kommt, konnte in dieser Arbeit nicht geklärt werden.

Nachdem die Vorversuche mit den primären dispersen Kulturen einen ersten Eindruck von den Effekten einer Inkubation mit NPs gegeben hatten, inkubierte ich organotypische Rückenmarkskulturen zunächst mit k-NPs. Es zeigte sich kein Einfluss auf die Überlebensrate von Neuronen (inklusive Motorneurone) oder auf die prozentuale Fläche gefärbter Neurofilamente. Auch die prozentuale Fläche gefärbter aktivierter Mikroglia, Astroglia und DAPI-gefärbter Zellkerne veränderte sich nicht. Anhand der Ergebnisse der cerebellaren Mischkulturen wäre jedoch ein Anstieg der prozentualen Fläche aktivierter Mikroglia zu erwarten gewesen. Interessanterweise zeigten auch konfokale mikroskopische Aufnahmen organotypischer Kulturen eine Anreicherung der NPs in Mikroglia. Dies wiederum bestätigte die in den dispersen Zellkulturen erhaltenen Ergebnisse. Warum konnte nun in den organotypischen Kulturen keine Mikroglia proliferation gefunden werden? Womöglich ist die Quantifizierung der Mikrogliaaktivierung im organotypischen Rückenmarksschnitt nicht sensitiv genug, um den in den cerebellaren Mischkulturen detektierten Anstieg der Mikroglia zu messen. Oder die Mikroglia proliferation tritt nur im Anfangszeitraum der Inkubation mit NPs auf und wird durch Absterben/Inaktivierung von Zellen im Laufe der Kultivierungsdauer wieder ausgeglichen. Zufriedenstellend kann dies nur eine Zeitreihe NP-inkubierter Rückenmarkskulturen klären.

Zusammengefasst stellte die Inkubation der Rückenmarkskulturen mit NPs für Motorneurone und andere Neurone, aber auch für die Glia kein Problem dar. Inkubierte Kulturen glichen Kontrollkulturen. Daher begann ich mit den Experimenten für das MARVENE-Projekt und den Einsatz von GDNF-PEI-NPs in organotypischen Kulturen.

4.1.3.1 Funktionalisierte GDNF-PEI-NPs

Bevor die mit GDNF funktionalisierten PEI-NPs eingesetzt wurden, überprüfte ich die Stabilität der Funktionalisierung. Diese erwies sich als instabil. Kulturen, welche mit dem Medienüberstand zuvor suspendierter und wieder abgetrennter GDNF-PEI-NPs kultiviert wurden, zeigten die gleiche Überlebensrate von Motorneuronen wie Kontrollkulturen, die GDNF im Medium zugesetzt bekamen. Kulturen, die Medium mit resuspendierten GDNF-PEI-NPs erhielten, wiesen eine geringere Überlebensrate von Motorneuronen auf. Dies deutete darauf hin, dass es bei der Verdünnung der GDNF-PEI-NPs in RM-M zu einer Abspaltung des GDNF von den PEI-NPs kam. Damit wäre das Ziel des MARVENE-Projektes, die NPs über eine GDNF-Funktionalisierung rezeptorvermittelt in Motorneurone aufnehmen zu lassen, nicht verwirklicht. Nichtsdestotrotz testete ich die GDNF-PEI-NPs auch an organotypischen Ko-Kulturen, um ein mögliches Protokoll für zukünftige Experimente zu etablieren. Ko-Kulturen erhielten über die gesamte Kultivierungsdauer GDNF-PEI-NPs, aber kein zusätzliches GDNF im Medium. Sie zeigten keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Anzahl überlebender Motorneurone, der Gesamtzahl überlebender Neurone und der prozentualen Fläche der Neurofilamente zu den Kontrollen. Dies ist vermutlich vor allem der hohen Varianz der Ergebnisse geschuldet, da in der grafischen Darstellung die Fläche der gefärbten Neurofilamente bei GDNF-PEI-NP-inkubierten Ko-Kulturen deutlich abnahm.

Aufgrund der geringen Menge an GDNF-PEI-NPs, die mir von unserem italienischen Projektpartner zur Verfügung gestellt wurden, entschied ich mich für ein verändertes Versuchsdesign. Statt die Ergebnisse mehrerer Replikatkulturen pro Tier und Gruppe zu mitteln, setzte ich jeweils einen Rückenmarksschnitt pro Tier und Gruppe ein. Dafür erhöhte ich die Anzahl der verwendeten Tiere auf n=12. Bedingt durch die hohe Anzahl parallel angelegter Gruppen, dem zusätzlichen Inkubationsschritt mit den GDNF-PEI-NPs während der Präparation und der aufwendigen Positionierung der Schnitte auf der Membran, verlängerte sich die Präparationsdauer für die Ko-Kulturen erheblich. Gerade

dieser zeitliche Aspekt könnte ein wichtiger Grund für die hohe Varianz der Ergebnisse sein, da die Präparationsdauer maßgeblich die Überlebensrate der Neurone beeinflusst. Die GDNF-PEI-NPs-Ko-Kulturen wurden zusätzlich in 2 Gruppen aufgeteilt. Eine diente als Kontrollgruppe ohne Anlegen eines starken magnetischen Feldes, während die andere Gruppe mittels des von INA bereitgestellten magnetischen Applikators einem externen magnetischen Feld ausgesetzt wurde. Ziel war es, nach der Aufnahme der NPs in die Motorneurone, das Neuritenwachstum in den peripheren Nerven mit Hilfe des externen Magnetfelds zu verstärken. Dieses Ziel wurde verfehlt. Es ließen sich keine signifikanten Unterschiede in der prozentualen Fläche der Neurofilamente in der Verwachsungszone zwischen Ko-Kulturen ohne magnetisches Feld und mit magnetischem Feld feststellen. Dies lag vermutlich vor allem an der Abspaltung des GDNFs von den PEI-NPs. Da es trotzdem im Medium vorhanden war, blieb die Überlebensrate der Motorneurone gleich. Betrachtet man jedoch die Vorversuche mit k-NPs, so ist die Wahrscheinlichkeit, dass PEI-NPs ohne zusätzliche Funktionalisierung in Motorneurone aufgenommen wurden, gering. Die von SSSA bereitgestellten GDNF-PEI-NPs waren durch die instabile Funktionalisierung daher nicht geeignet, um das Projektziel zu erreichen. Die Funktionalisierung von PEI-NPs mit NGF durch die SSSA war allerdings erfolgreicher (Riggio et al., 2014). Es gelang, die von INA produzierten PEI-NPs stabil mit NGF zu funktionalisieren und so PC12-Zellen erfolgreich zu differenzieren. Zusätzlich gelang es, mit NGF-PEI-beladene PC12-Zellen mit Hilfe eines Magnetfeldes zu orientieren. Auch Zellen einer humanen Neuroblastoma-Zelllinie, immortalisierte olfaktorische Hüllzellen (olfactory ensheathing cells, OEC) und primäre Schwanzzellen konnten in vorherigen Studien nach Beladung mit NPs mittels eines Magnetfeldes orientiert werden (Raffa et al., 2012; Riggio et al., 2013). Die Idee des Projektes scheint somit realisierbar, jedoch muss eine geeignete Funktionalisierung der NPs noch gefunden werden, die eine möglichst spezifische, rezeptorvermittelte Aufnahme der NPs in die Motorneurone erlaubt.

4.1.4 Zusammenfassung – Magnetische NPs

Magnetische NPs bieten durch ihre Eigenschaften und die Möglichkeit, sie mittels Funktionalisierungen zu modifizieren, eine Vielzahl von Einsatzmöglichkeiten, vor allem auch in der Medizin. Neben der Anwendung als Kontrastmittel, in der Krebsbehandlung und in der gezielten Pharmakotherapie (drug delivery), ist ihr möglicher Einsatz zur Verbesserung der Regeneration von Nerven nach Verletzungen

Untersuchungsgegenstand zahlreicher Forschungsgruppen. Dabei reicht die Spanne von der gezielten Applikation von Wachstumsfaktoren, der Injektion von Zellen wie OECs oder Schwannzellen bis zum Einsatz magnetischer Felder. Meine Experimente an NPs waren Bestandteil des ERA-Net-Projektes MARVENE, dessen Ziel es war, magnetische NPs in Motorneurone nach Axotomie einzubringen und das Auswachsen der Axone zu fördern und diese zu orientieren. Ein externes Magnetfeld sollte dabei helfen, die NPs in eine vorgegebene Richtung zu ziehen.

Meine Versuche an primären neuronalen und glialen Zellkulturen zeigten, dass NP-Effekte und -Aufnahme zellspezifisch sind. Vor allem Mikroglia phagozytierte die NPs, vermutlich begünstigt durch die Bildung einer Proteinkorona aus Serumproteinen. Vieles spricht dafür, dass NPs auch bei einem *in vivo*-Einsatz im ZNS Mikroglia stimulieren würden. Neben der möglichen Inflamationsreaktion reduzierten Mikrogliazellen durch die Phagozytose die für andere Zellen zur Verfügung stehenden NPs. Um Neurone mit NPs zu beladen, schien demnach eine Funktionalisierung mit einem Zelltypspezifischen Liganden notwendig. Die Bindung des GDNF an die PEI-NPs erwies sich jedoch als instabil, so dass auch die Applikation eines starken magnetischen Feldes keine Auswirkungen auf das Neuritenwachstum zeigte.

4.2 Minozyklin

4.2.1 Neuroprotektive/neurotoxische Potenz

Minozyklin besitzt eine Vielzahl von pharmakologischen Eigenschaften. Neben der seit langem bekannten antibiotischen Wirkung, werden seine antiapoptotischen, antiinflammatorischen und neuroprotektiven Funktionen intensiv erforscht. Doch gerade die neuroprotektive Wirkung ist umstritten. Auch meine Ergebnisse sprechen gegen eine allgemein gültige Neuroprotektion durch Minozyklin. Schon der Einsatz geringer Minozyklinkonzentrationen von 10 μM in organotypischen Rückenmarkskulturen ab DIV 1 verringerte die Anzahl überlebender Neurone. Bei der Verwendung der höheren Minozyklinkonzentration von 100 μM trat die neurotoxische Wirkung schon bei kürzerer Inkubationszeit ab DIV 4 auf. Die Neurotoxizität gerade der geringeren Minozyklinkonzentration steht im Widerspruch zu einigen anderen Studien, in denen selbst für höhere Konzentrationen neuroprotektive Wirkungen beschrieben wurden. Z. B. behandelten Guo und Bhat (2007) Zellen einer Motoneuronen-Zelllinie mit 25 μM Minozyklin und beobachteten einen neuroprotektiven Effekt gegen hypoxischen Zelltod. Auch differenzierte PC12-Zellen profitierten unter hypoxischen Bedingungen von der Inkubation mit bis zu 10 μM Minozyklin (Song et al., 2004). Pi et al. (2004) fanden bei der Behandlung von cerebellaren granulären Neuronen mit Konzentrationen von 10-100 μM Minozyklin einen dosisabhängigen neuroprotektiven Effekt gegen Glutamatexzitotoxizität. Garcia-Martinez et al. (2010) bestätigten diese Ergebnisse im selben Modellsystem für Minozyklinkonzentrationen von 70, 100 und 150 μM . Berichte über neurotoxische bzw. nicht neuroprotektive Wirkungen des Minozyklins finden sich vor allem in Tiermodellen wieder. So führte Minozyklin in Mausmodellen für Chorea Huntington und Amyotrophe Lateral Sklerose zu einem erhöhten Untergang dopaminerger Neurone nach induzierter MPTP-Toxizität (Yang et al., 2003). Auch Diguët et al. (2004) beschrieben einen nachteiligen Minozyklineffekt auf dopaminerge Neurone. Offensichtlich ist das verwendete Modell für die Neuroprotektivität/Neurotoxizität des Minozyklins maßgeblich.

Organotypische Kulturen, die mit 100 μM Minozyklin über einen längeren Zeitraum inkubiert wurden, zeigten einen weiteren interessanten Aspekt: eine verstärkte anti-Pan-NF-Färbung, die vor allem Neuriten umfasste, aber keine bzw. kaum korrespondierende neuronale Zellkörper. Nun ist Minozyklin für seine Inhibierung der Mikrogliaaktivierung

bekannt (Tikka et al., 2001; Chechneva et al., 2006; Bastos et al., 2007), die auch ich in meinen organotypischen Rückenmarkskulturen fand. Folgendes könnte man nun spekulieren: Sowohl durch die Präparation als auch durch die Minozyklingabe starben Neurone. Da die Mikroglia durch Minozyklin inhibiert wurde, könnte das Beseitigen des Zelldebris verzögert und noch anfärbare Neuritenfragmente in den Kulturen vorhanden sein. In der Tat konnten Tanaka et al. (2009) zeigen, dass die Phagozytose von axonalem Debris durch Mikroglia von der Aktivität der p38 MAP-Kinase abhängt, welche wiederum durch Minozyklin unterdrückt wird (Tikka et al., 2001; Pi et al., 2004; Guo und Bhat, 2007). Denkbar wäre auch, dass Minozyklin den Transport und/oder die Regulation der Neurofilamente beeinflusste und somit zu einer fragmentierten, verstärkten anti-Pan-NF-Färbung führte.

4.2.2 Gliarelevanz

Minozyklin hatte in geringer Konzentration keine Folgen für die Mikroglia- und Astrogliaaktivierung. Höher konzentriertes (100 μ M) Minozyklin inhibierte die Mikrogliaaktivierung. Der Effekt war zeitabhängig. Kürzere Inkubationsperioden ließen noch eine geringe Mikrogliaaktivierung zu, während eine lange Inkubation die Aktivierung komplett unterdrückte. Neben der Vermittlung proinflammatorischer Prozesse beschreiben zahlreiche Studien auch einen regenerationsfördernden Einfluss aktivierter Mikroglia (Abbildung 49). Rabchevsky und Streit (1997) und Prewitt et al. (1997) z. B. zeigten, dass in Ratten die Implantation von Mikroglia in verletztes Rückenmark das Auswachsen von Neuriten begünstigt. Mikroglia als Immunzellen des ZNS phagozytieren Zelldebris und reduzieren dadurch den Anteil regenerationsinhibierender Moleküle wie z. B. der Myelinkomponenten Nogo A und Myelinassoziierte Glykoprotein (Chen et al., 2007; Vargas und Barres, 2007; Kigerl et al., 2009). Sie können Neurone vor NO-Toxizität (Toku et al., 1998) und Ischämie-induziertem Zelltod (Neumann et al., 2006) schützen. Auch die Freisetzung neurotropher Substanzen (z. B. GDNF), von Wachstumsfaktoren, Neurotrophinen und Thrombospondin, einem extrazellulären Matrixmolekül, das Neuritenwachstum stimuliert, werden für aktivierte Mikroglia beschrieben (Chamak et al., 1994; Nakajima et al., 2001; Streit, 2002; Nakajima und Kohsaka, 2004). Die Inhibierung der Mikrogliaaktivierung in den organotypischen Rückenmarkskulturen durch Minozyklin führte also vermutlich zum Verlust zahlreicher unterstützender Funktionen der Mikroglia und so zu einer Verstärkung der Neurotoxizität.

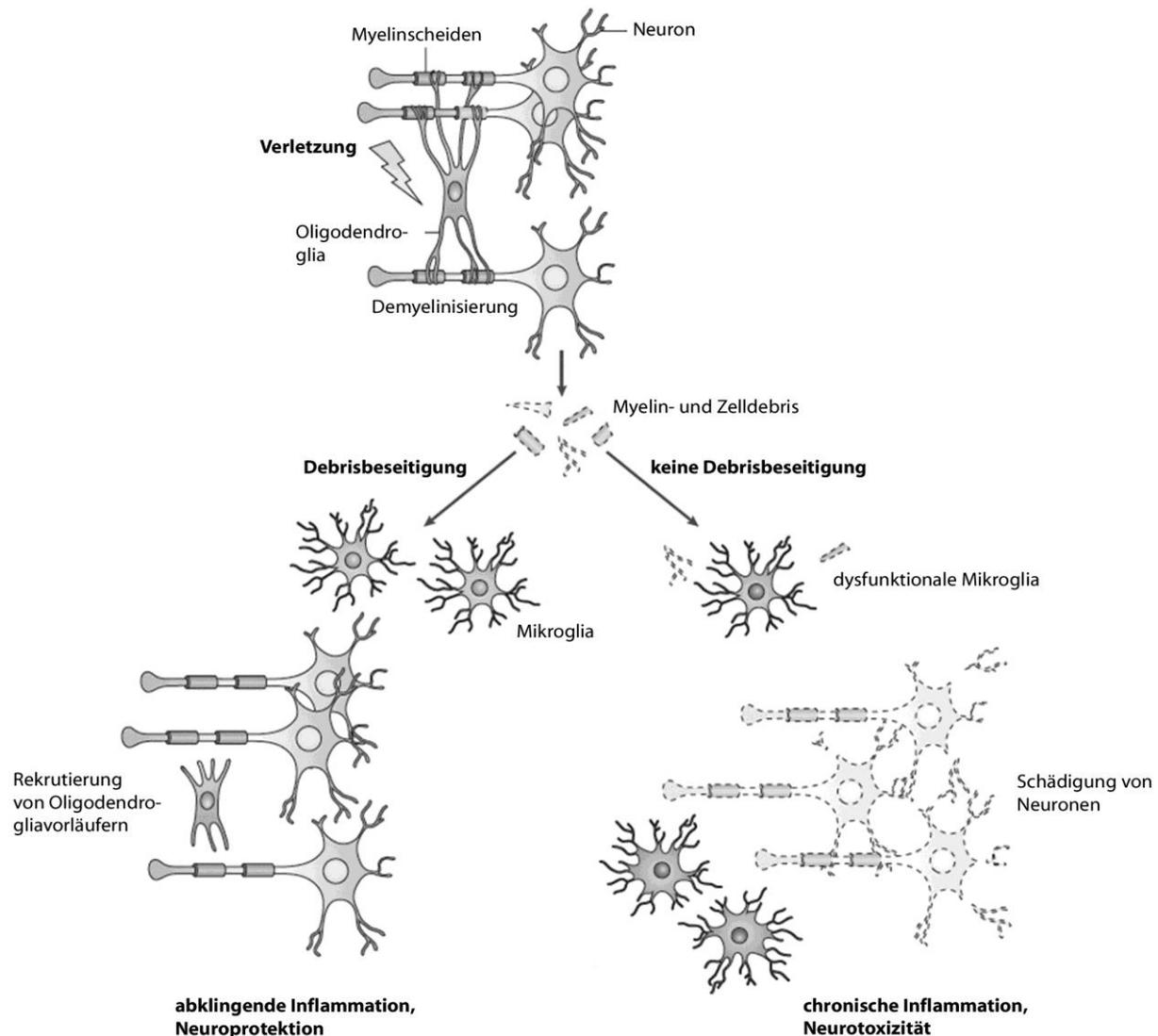


Abbildung 49: Mikrogliaktivierung nach Verletzungen des ZNS. Mikrogliazellen können z. B. durch Debrisphagozytose und Ausschüttung von Wachstumsfaktoren neuroprotektiv wirken, aber auch eine chronische Inflammation und Neurotoxizität begünstigen. Modifiziert nach Rivest (2009).

Ein weiterer Aspekt, der zu der erhöhten Neurotoxizität hoher Minozyklinkonzentrationen beigetragen haben könnte, ist die Beeinträchtigung der Astroglia. In Kontrollschnitten kam es, von der Peripherie ausgehend, zur Ausbildung eines geschlossenen Astrogliaüberzugs auf der Oberfläche der organotypischen Kulturen. Bei Minozyklinintervention blieben die Astrogliazellen jedoch randständig, der schützende Astrogliaüberzug wurde nicht gebildet, was eine zusätzliche Stresskomponente für Neurone sein sollte. Astrogliazellen haben eine Reihe von Funktionen im ZNS: Erhaltung der extrazellulären Homöostase, Recyclen von Neurotransmittern, Bildung und Regulation der Blut-Hirn-Schranke, Bereitstellung von Nährstoffen, Immunregulation, Fazilitierung der synaptischen Plastizität und Integration von Informationen (Anderson und Swanson, 2000; Volterra

und Meldolesi, 2005; Farina et al., 2007). Kein Wunder also, dass auch die Astroglia während Verletzungen im ZNS aktiviert wird. In organotypischen Zellkulturen scheint ein Großteil der Astrogliazellen im reaktiven Status vorzuliegen (Benediktsson et al., 2005). Reaktive Astrogliazellen können eine Bandbreite an Veränderungen der Zellen ausbilden. Diese hängt von der Art und Schwere der ZNS-Verletzung ab. Dabei reicht das Spektrum von zellulärer Hypertrophie, über exzessive Proliferation bis hin zur Ausbildung einer Glianarbe (Pekny und Nilsson, 2005; Sofroniew, 2009). Diese kann im späteren Heilungsprozess eine erfolgreiche Axonregeneration verhindern, da sie eine für das Axon unüberwindbare mechanische Barriere bildet. Zusätzlich sekretiert die reaktive Astroglia in der Glianarbe Chondroitinsulfatproteoglykane, die inhibitorisch auf auswachsende Axone wirken (Yiu und He, 2006). In erster Linie nehmen reaktive Astrogliazellen aber während einer ZNS-Verletzung eine Reihe Funktionen wahr, die das Überleben von Neuronen und ihre Regeneration unterstützen. Z. B. zeigten Cui et al. (2001), dass die Entfernung von Astroglia von der Verletzungsstelle zu einer Abnahme der Glutamattransporter-Expression führt. Glutamattransporter sind jedoch essentiell für die Entfernung von Glutamat aus dem synaptischen Spalt und beugen so einer Glutamatexzitotoxizität vor. Chen et al. (2001) berichteten, dass Astrogliazellen mit Hilfe eines glutathionabhängigen Mechanismus Neurone vor NO-Toxizität schützen können. Zusätzlich bieten Astrogliazellen, gerade auch während Verletzungen, Nährstoffe an. Wichtig ist auch die Regulation der Immunantwort durch Interaktionen mit Mikroglia, aber auch durch die Beeinflussung invasiver T-Zellen aus der Peripherie (Farina et al., 2007; Liu et al., 2011; Gimsa et al., 2013) und die Wiederherstellung der Blut-Hirn-Schranke (Bush et al., 1999). Wird nun die Ausbildung des Astrogliaüberzugs auf den organotypischen Rückenmarkskulturen durch Minozyklin gehemmt, entbehren die Neurone im Schnitt diese unterstützenden Funktionen der reaktiven Astroglia. Neurone und speziell die empfindlichen Motorneurone benötigen ein Zusammenspiel verschiedener Gliazellen, um zu überleben und ihre Funktionen wahrzunehmen. Die Störung dieser fein abgestimmten Prozesse könnte den Minozyklin-induzierten neuronalen Zelltod in meinen organotypischen Rückenmarkskulturen noch verstärkt haben.

Die durch hohe Minozyklinkonzentrationen ausgelöste randständige Lokalisation der Astroglia in den Rückenmarkskulturen ähnelte stark derjenigen, die in direkt nach der Präparation fixierten und gefärbten Rückenmarksschnitten auftrat (Pinkernelle et al., 2013). Um den Schnitt zu überziehen, müssen Astroglia migrieren und proliferieren.

Daher ging ich der Idee nach, dass Minozyklin die Migration der Astroglia beeinträchtigt. Dazu führte ich Wundheilungsassays in primären, kortikalen gliareichen Kulturen durch. Zellen, die Minozyklin erhielten, schlossen Wunden im Zellrasen langsamer als unbehandelte Zellen. Es gibt eine Reihe von Proteinen, die mit astroglialer Zellmigration in Verbindung gebracht werden. Eines davon ist Cx43, das am häufigsten von Astroglia exprimierte Connexin, welches auch an der Ausbildung von Astroglia-Synzytien im ZNS beteiligt ist (Nagy und Rash, 2000). Es beteiligt sich an der Bildung von gap junctions, die wichtig sind für die Aufrechterhaltung der Homöostase, für die Informationsübertragung (elektrische Synapse) und die Zellmigration (Kielian, 2008; Gimona et al., 2009). Aufgrund seiner bedeutenden Rolle bei der Zellmigration analysierte ich die Cx43-Proteinexpression und fand eine Zunahme des Cx43 nach Minozyklinintervention. Dies könnte ein direkter Effekt des Minozyklins auf die Astroglia sein, dafür sprechen einige Studien. Z. B. fanden Keller et al. (2011), dass Minozyklin in einem Mausmodell für Amyotrophe Lateral Sklerose die astrogliale Reaktivität veränderte und die Cx43-Expression erhöhte. Zhang et al. (2012) zeigten an einem Neuropathie-Modell, dass Minozyklin die Aktivierung von Astroglia reduzierte und die damit verbundene verringerte Expression von Glutamattransportern verhinderte. Auch in einem Hydrocephalus-Modell konnte ein inhibierender Minozyklinaffekt auf die Astrogliaaktivierung nachgewiesen werden (McAllister und Miller, 2010). Genauso gut könnte aber auch ein indirekter Einfluss des Minozyklins vorgelegen haben und die Proteinexpression der Astroglia durch Mikroglia beeinflusst worden sein. Die kortikalen gliareichen Mischkulturen enthielten einen, wenn auch geringen, Anteil Mikroglia. Diese war vermutlich aktiviert, da in einer primären Kultur ständig Zellen sterben und Zelldebris entsteht. Mikroglia und Astroglia modulieren sich gegenseitig (Gao et al., 2013). Mehrere Studien beschreiben einen inhibitorischen Effekt aktivierter Mikroglia auf Cx43-Level und die Kopplung von Astrogliazellen untereinander (Rouach et al., 2002; Faustmann et al., 2003; Kielian, 2008). Wie schon vorher erwähnt, inhibiert Minozyklin die Aktivierung von Mikroglia (Tikka et al., 2001; Nikodemova et al., 2007; Cui et al., 2008). Fällt nun die Mikrogliaaktivierung in den Mischkulturen weg, könnte es zu der von mir gefundenen Zunahme der Cx43-Expression im Vergleich zu unbehandelten Kontrollkulturen kommen. Es gibt allerdings sehr unterschiedliche Meinungen in der Literatur darüber, was eine hohe bzw. niedrige Cx43-Expression in Bezug auf Migration bedeutet. Homkajorn et al. (2010) beschrieben, dass das Herunterregulieren von Cx43 in

Astroglia zu einer verzögerten Wundheilung aufgrund verringerter Migration und Proliferation führte. Das würde für hohe Cx43-Level eine erhöhte Migration bedeuten. Dagegen fanden Olk et al. (2010) in Astroglia mit gesenkten Cx43-Leveln eine Erhöhung der Expression von Zytoskelettproteinen wie Aktin, eine verstärkte Ausbildung von zellulären Fortsätzen und eine reduzierte Zell-Zell-Adhäsion, die sie als erhöhte Migrationsfähigkeit interpretierten. Eine erhöhte Cx43-Expression hätte damit eine stärkere Zell-Zell-Adhäsion und eine verringerte Zellmigration zur Folge, was meine Ergebnisse bestätigen würde. Die Rolle von Cx43 während ZNS-Verletzungen wird ebenfalls kontrovers diskutiert. Einigkeit herrscht darüber, dass Verletzungen zunächst eine Erhöhung der Cx43-Level zur Folge haben (Lee et al., 2005; Chew et al., 2010; Huang et al., 2012). Die Interpretation ist jedoch umstritten. Farahani et al. (2005) etablierten die Idee, dass verstärkte Astrogliakopplung zu einem Abpuffern erhöhter Ionen- und Metabolit-Konzentrationen, die sich nach Zellverletzungen extrazellulär anhäufen, führt und die Produktion und Verteilung von Nährstoffen und neurotrophen Faktoren verbessert. Die erhöhte Cx43-Expression hätte demnach neuroprotektive Wirkung. Andere Gruppen sehen in der verstärkten Kopplung der Astroglia eine Möglichkeit, toxische Substanzen wie z. B. hohe Glutamatlevel über einen großen Raum zu verteilen und dadurch die Penumbra noch zu vergrößern (Nedergaard et al., 1995; Lin et al., 1998). Hier bleibt viel Raum für fortführende Experimente.

4.2.3 Organotypische Ko-Kulturen

Nun stellte sich die Frage, ob es möglich ist, die Überlebensbedingungen der Motorneurone in den Kulturen generell zu verbessern und dadurch die toxischen Effekte, wie sie z.B. nach hohen Minozyklinkonzentrationen gefunden wurden, zu kompensieren. Eine Möglichkeit, das Überleben von Motorneuronen und die Regeneration ihrer Axone zu unterstützen, ist die sofortige Transplantation eines peripheren Nerven (Gu et al., 2004). Patienten profitieren von einer Rekonstruktion der spinalen Wurzeln und zeigen bessere sensorische und motorische Funktionen als ohne Rekonstruktion (Carlstedt et al., 2000). Aufgrund dieser Erkenntnisse erweiterte ich mein organotypisches Rückenmarksmodell um ein Nerventransplantat zu einer Ko-Kultur. Dabei rekonstruierte der periphere Nerv die Ventralwurzel des Rückenmarks und ergänzte die Kultur um Schwannzellen, die nach einer Verletzung Zelldebris phagozytieren, neurotrophe Wachstumsfaktoren sekretieren

und ein Gerüst für die neu auswachsenden Neurone bilden (Takami et al., 2002; Haninec et al., 2004; Chen et al., 2007; Fortun et al., 2009). Zusätzlich fördert die Kombination aus GDNF (Mediumsupplement) und Schwanzzellen die axonale Regeneration und Remyelinisierung stärker als einer der beiden Faktoren alleine (Iannotti et al., 2003). Trotz dieser verbesserten Bedingungen zeigte die Behandlung mit Minozyklin die gleichen negativen Effekte wie in den einfachen Rückenmarkskulturen. Es wirkte nach wie vor neurotoxisch und verhinderte die Ausbildung eines geschlossenen Astrogliaüberzugs auf der Oberfläche der Ko-Kulturen.

4.2.4 Zusammenfassung - Minozyklin

Die neuroprotektive Potenz von Minozyklin ist nach wie vor umstritten. Auch die Ergebnisse meiner Arbeit sprechen eher dagegen. Schon bei der niedrigeren Konzentration des Minozyklins traten neurotoxische Effekte auf. Höhere Konzentrationen führten zusätzlich zu Störungen der Aktivierung von Mikroglia und Astroglia. Während die Inhibierung der Mikroglia gut bekannt und vermutlich die Basis für die antiinflammatorische Wirkung des Minozyklins darstellt, war die Wirkung auf die Astroglia überraschend. Bei organotypischen Rückenmarkskulturen verhinderte Minozyklin die Ausbildung eines geschlossenen Astrogliaüberzugs auf dem Schnitt, was auf eine Behinderung der Migration und Proliferation der Astroglia hinweist. In kortikalen gliareichen Mischkulturen wirkte Minozyklin leicht toxisch, führte zu einem verlangsamten Wundschluss im Zellrasen und erhöhte die Expression von Cx43.

Die Reduktion der astroglialen Migration durch Minozyklin lässt Spekulationen zu, dass Minozyklin genutzt werden könnte, um die Glianarbenbildung nach Rückenmarksverletzungen zu verringern und so die Wiederherstellung motorischer und sensorischer Funktionen bei Patienten zu erreichen. Allerdings hat die Glianarbe gerade in der ersten Zeit nach einer ZNS Verletzung durchaus positive Funktionen; ein optimales Timing muss also realisiert werden.

Trotz der sich häufenden Studien zu negativen Minozyklineffekten befindet sich Minozyklin zur Unterstützung der Regeneration bei Rückenmarksverletzungen in der klinischen Phase II. Erste Ergebnisse hieraus konnten allerdings die Wirksamkeit des Minozyklins ebenfalls nicht untermauern. Die Autoren dieser Studie sehen Minozyklin trotzdem als Kandidaten für weiterführende klinische Studien. Bevor Minozyklin jedoch

vermehrt in Patienten mit Rückenmarksverletzungen eingesetzt werden kann, sind Studien zur möglichen Neurotoxizität dringend notwendig.

4.3 Schlussfolgerung

Im Rahmen dieser Arbeit gelang es mir, ein reproduzierbares *in vitro*-Modell zu entwickeln, das es erlaubte, das Überleben und die Regeneration von Motoneuronen nach Axotomie zu untersuchen und auch zu beeinflussen. Die organotypische Rückenmarkskultur ermöglichte es, sowohl physikalische (magnetische NPs) als auch pharmakologische Ansätze (Minozyklin) zur Regenerationsförderung zu testen. Mit den etablierten Auswertemethoden lassen sich valide Aussagen zu Überlebensraten von Neuronen/Motoneuronen, zur Beeinflussung von Neurofilamenten und zur Beteiligung von Mikroglia und Astroglia machen. Das etablierte organotypische Kultursystem erlaubt zusätzlich die Erweiterung zur Ko-Kultur mit peripherem Nerv. Dadurch lassen sich Bedingungen des PNS in das Modell integrieren und die Aussagekraft des Modells erhöhen.

Zukünftig sollen die von mir etablierten organotypischen Rückenmarkskulturen in weiteren Forschungsprojekten Verwendung finden. Neben dem einfachen Durchtesten von potenziell neuroprotektiven Substanzen sind Erweiterungen um einen 2. peripheren Nerv und um die Muskelendplatte angedacht. Auch Studien zum Tissue engineering (Testung bioartifizieller Nervenimplantate) sind geplant.

5 Zusammenfassung

Verletzungen des Rückenmarks aber auch der peripheren Nerven bedeuten oft lebenslange Einschränkungen für die Patienten. Behandlungsmöglichkeiten und die Aussichten auf die Wiederherstellung aller Funktionen sind beschränkt. Probleme stellen vor allem sekundäre Gewebeschäden, aber auch Fehlverschaltungen regenerierter Axone dar. In meiner Arbeit etablierte ich neonatale organotypische Rückenmarkskulturen und Ko-Kulturen aus Rückenmarksschnitten und peripheren Nerven als Modelle, um Verletzungsprozesse im ZNS und PNS nach einer Axotomie (ausgelöst durch die Präparation) zu simulieren und potentiell regenerationsunterstützende Therapien zu sichten. Organotypische Kulturen bieten dabei den Vorteil, dass die 3-D-Gewebeorganisation und die vielfältigen Zell-Zell-Kontakte während der Kultivierung erhalten bleiben und sie so eine *in vivo*-Situation besser abbilden als disperse Einzelzell- oder Mischzellkulturen. Gleichzeitig sind sie weniger komplex als Tiermodelle und verringern den Tierverbrauch erheblich. Die Verwendung neonataler statt embryonaler Rückenmarksschnitte ermöglichte die Untersuchung relativ reifer Motorneurone und einen aussagekräftigeren Bezug zur klinischen Situation. Im Rahmen meiner Arbeit untersuchte ich an diesem Modell 2 unterschiedliche Strategien zur Verbesserung der Regeneration von Motorneuronen und ihrer Axone. Zuerst untersuchte ich die Möglichkeit, magnetische NPs in Neurone einzuschleusen und mittels eines externen Magnetfeldes eine zielgerichtete Regeneration von Axonen zu unterstützen. Dafür testete ich die NPs zunächst an dispersen, primären neuronalen Zellkulturen. Die NPs wurden zwar vesikulär von Zellen aufgenommen, jedoch erwiesen sich die Aufnahme und die Zytotoxizität stark abhängig von der Zellart. In diesen Kulturen, aber auch in den anschließend untersuchten organotypischen Rückenmarkskulturen, phagozytierte Mikroglia den Hauptteil der NPs. Neurone zeigten kaum eine NP-Aufnahme. Um die Aufnahme in Motorneurone zu erhöhen, nutzte ich mit GDNF funktionalisierte NPs. Bei der Überprüfung der Funktionalisierung zeigte sich allerdings, dass die Verknüpfung des GDNFs an die NPs nicht stabil war. Dadurch konnte keine erhöhte NP-Aufnahme in die Motorneurone erreicht werden. Die *in vivo*-Verwendung dieser NPs scheint damit schwierig. Zukünftige Experimente müssen die Phagozytose der NPs durch Mikroglia eingrenzen und gleichzeitig die Aufnahmewahrscheinlichkeit in Neurone erhöhen. Die versuchte Funktionalisierung mit GDNF stellte einen ersten Schritt in diese Richtung dar.

Als Zweites versuchte ich die Regeneration der Motorneurone in meinem organotypischen Rückenmarksmodell mit Hilfe von Minozyklin zu verbessern. Neben dem Einsatz als Antibiotikum wurden für Minozyklin auch antiinflammatorische, antiapoptotische und neuroprotektive Wirkungen beschrieben. Gerade der neuroprotektive Effekt wird allerdings immer mehr in Frage gestellt. Auch in meinem organotypischen Rückenmarksmodell erwies sich das Minozyklin nicht als neuroprotektiv, sondern als neurotoxisch. Schon eine niedrige Konzentration führte zu einer Abnahme der überlebenden Motorneurone. Neben der Inhibierung der Mikrogliaaktivierung, fand ich auch eine Beeinflussung der Astrogliaaktivierung. Minozyklinbehandelte Rückenmarkskulturen wiesen auch am Ende der Kultivierung eine randständige Astrogliaverteilung auf. Unbehandelte Kulturen wurden innerhalb weniger Tage von einem Astrogliaüberzug überwachsen. Daher untersuchte ich die Hypothese, dass Minozyklin die Migration der Astroglia behinderte. Tatsächlich verlangsamte Minozyklin die Migration von Glia im Wundheilungstest und erhöhte die Proteinexpression von Cx43, einem Connexin, das an der Migration von Astroglia beteiligt ist. In weiterführenden Studien muss nun geklärt werden, ob ein solcher Einfluss des Minozyklins in der Behandlung von Gliearben nach Schädigungen des ZNS genutzt werden kann. Generell muss die neuroprotektive Wirkung des Minozyklins, zumindest für Rückenmarksverletzungen, einmal mehr in Frage gestellt werden. Besonders bereits laufende klinische Studien zu Rückenmarksverletzungen und Minozyklin sollten kritisch betrachtet werden und auch mögliche negative Folgen der Minozyklinbehandlung durch Neurotoxizität verstärkt untersuchen.

Die Untersuchung dieser 2, vom Ansatz her, sehr unterschiedlichen Strategien zur Unterstützung der Regeneration von Motorneuronen bestätigte die besondere Eignung und Reproduzierbarkeit meines *in vitro*-Modells zur Untersuchung und Sichtung potenziell regenerationsfördernder Therapien. Die Quantifizierung der Überlebensrate der Motorneurone, der Gesamtheit an Neuronen und der prozentualen Fläche von Neurofilamenten erwiesen sich als geeignet, um neuronale Effekte zu erfassen und Aussagen über neuroprotektive/neurotoxische Wirkungen zu treffen. Durch die Quantifizierung der prozentualen Fläche von Mikroglia und Astroglia lassen sich auch gliale Effekte bewerten. Dadurch ergibt sich ein relativ umfassendes Bild zur allgemeinen Bewertung regenerationsfördernder Strategien, welches in nachfolgenden Studien einfach genutzt werden kann.

6 Englische Zusammenfassung - Abstract

Traumatic spinal cord injury and injury of the peripheral nerve often results in a lifetime confinement for patients. The possibilities of therapies and the functional outcomes are often limited. Problems result from secondary tissue damage but also from misguided target finding of regenerating axons.

In my thesis, I established an organotypic spinal cord culture and a co-culture of spinal cord slices and peripheral nerve graft to model the injury of CNS and PNS and the resulting axotomy in a proper way and to screen for regeneration supporting strategies or substances. Organotypic cultures keep the 3-D tissue organisation and the contacts between cells during cultivation and simulate an *in vivo*-situation to a higher degree than disperse single-cell or mixed-cell cultures. At the same time, organotypic cultures are less complex than animal models and reduce the consumption of animals seriously. I used neonatal spinal cord tissue instead of embryonic which allowed the analysis of more matured motorneurons and refers the clinical situation more seriously. In my thesis, I used this model and checked 2 different strategies to support the regeneration of motorneurons and their axons. First, I investigated magnetic nanoparticles to enhance regeneration. For it, particles should enter motorneurons and their axons and be guided to their target tissue with the help of a strong magnetic field. To begin, I tested nanoparticles in dispersed, neuronal cell cultures. Nanoparticles were up taken by cells in vesicles, but the uptake and the cytotoxicity turned out to be dependent of the cell type. In disperse, but also in later studied organotypic spinal cord cultures, microglia phagocytosed most of the particles. Neurons showed nearly no uptake. To enhance this, nanoparticles, functionalised with GDNF, were used. However, the bounding of GDNF to the particles was instable. Thus, an improvement of nanoparticles-uptake in motorneurons of spinal cord cultures was not possible. Because of this, a satisfying *in vivo*-application seems difficult. Future experiments need to overcome the high rate of phagocytosis by microglia and increase the uptake by neurons at the same time. With the functionalisation of particles with GDNF we did the first steps into solving these problems.

In the second part of my thesis, I used the tetracycline minocycline for an enhancement of neuron regeneration in spinal cord cultures. Besides his antibiotic function, minocycline is known for its antiinflammatory, antiapoptotic and neuroprotective qualities.

Nevertheless, the neuroprotective property is questioned more and more. Also in my organotypic spinal cord model, minocycline revealed to be neurotoxic instead of neuroprotective. Even low concentrations reduced the survival of motor neurons. Besides the inhibition of microglia activation, minocycline also influenced the astroglia activation. Minocycline treated cultures showed a peripheral distribution of astroglia instead of a covered surface. This distribution resembled the distribution in uncultured spinal cord slices. Therefore, I checked if minocycline impaired the migration of glia. Indeed, minocycline slowed down the migration of glia in a woundhealing assay and increased the protein expression of Cx43, a protein which is known for its role in astroglial migration. Further studies have to find out if there is a possibility to use this effect in the treatment of glia scars in CNS injuries. Taken together, the neuroprotective effect of minocycline has to be questioned once more. Especially running clinical studies with minocycline treatment after spinal cord injuries have to be investigated critically for possible neurotoxicity of the minocycline.

The outcome of both studies (nanoparticles and minocycline) supports the suitability and the reproducibility of my organotypic spinal cord model for the analysis and screening of potential regeneration enhancing substances and strategies. The quantification of the survival of motoneurons, neurons in general and the percental area of neurofilaments proved to give a conclusion for neuroprotective/neurotoxic actions of agents. Also glial effects can be analysed by measuring the percental area of microglia and astroglia. Thereby, my model allows a widespread view to evaluate regeneration enhancing substances and strategies and can be easily used in future studies.

7 Literaturverzeichnis

- Abrams, M.**, Widenfalk, J., 2005. Emerging strategies to promote improved functional outcome after peripheral nerve injury. *Restor. Neurol. Neurosci.* 23, 367–382.
- Alarifi, S.**, Ali, D., Alkahtani, S., Alhader, M.S., 2014. Iron Oxide Nanoparticles Induce Oxidative Stress, DNA Damage, and Caspase Activation in the Human Breast Cancer Cell Line. *Biol Trace Elem Res*, 1-9.
- Aloisi, F.**, Agresti, C., D'Urso, D., Levi, G., 1988. Differentiation of bipotential glial precursors into oligodendrocytes is promoted by interaction with type-1 astrocytes in cerebellar cultures. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 85, 6167–6171.
- Aloisi, F.**, Simone, R. de, Columba-Cabezas, S., Levi, G., 1999. Opposite Effects of Interferon- γ and Prostaglandin E2 on Tumor Necrosis Factor and Interleukin-10 Production in Microglia: A 2 Regulatory Loop Controlling Microglia Pro- and Anti-Inflammatory Activities.
- Anderson, C.M.**, Swanson, R.A., 2000. Astrocyte glutamate transport: Review of properties, regulation, and physiological functions. *Glia.* 32, 1–14.
- Andrés Vergés, M.**, Costo, R., Roca, A.G., Marco, J.F., Goya, G.F., Serna, C.J., Morales, M.P., 2008. Uniform and water stable magnetite nanoparticles with diameters around the monodomain–multidomain limit. *J. Phys. D: Appl. Phys.* 41, 134003.
- Arlein, W.J.**, Shearer, J.D., Caldwell, M.D., 1998. Continuity between wound macrophage and fibroblast phenotype: analysis of wound fibroblast phagocytosis. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology.* 275, R1041.
- Baptiste, D.C.**, Fehlings, M.G., 2006. Pharmacological Approaches To Repair the Injured Spinal Cord. *Journal of Neurotrauma.* 23, 318–334.
- Bastos, L.F.S.**, Merlo, L.A., Rocha, L.T.S., Coelho, M.M., 2007. Characterization of the antinociceptive and anti-inflammatory activities of doxycycline and minocycline in different experimental models. *Eur. J. Pharmacol.* 576, 171–179.
- Benediktsson, A.M.**, Schachtele, S.J., Green, S.H., Dailey, M.E., 2005. Ballistic labeling and dynamic imaging of astrocytes in organotypic hippocampal slice cultures. *Journal of Neuroscience Methods.* 141, 41–53.
- Brannon-Peppas, L.**, Blanchette, J.O., 2012. Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. MOST CITED PAPERS IN THE HISTORY OF ADVANCED DRUG DELIVERY REVIEWS: A TRIBUTE TO THE 25TH ANNIVERSARY OF THE JOURNAL. 64, 206–212.
- Busch, W.**, Bastian, S., Trahorsch, U., Iwe, M., Kühnel, D., Meißner, T., Springer, A., Gelinsky, M., Richter, V., Ikonomidou, C., Potthoff, A., Lehmann, I., Schirmer, K., 2011. Internalisation of engineered nanoparticles into mammalian cells in vitro: influence of cell type and particle properties. *J Nanopart Res.* 13, 293–310.

- Bush, T.G.**, Puvanachandra, N., Horner, C.H., Polito, A., Ostenfeld, T., Svendsen, C.N., Mucke, L., Johnson, M.H., Sofroniew, M.V., 1999. Leukocyte Infiltration, Neuronal Degeneration, and Neurite Outgrowth after Ablation of Scar-Forming, Reactive Astrocytes in Adult Transgenic Mice. *Neuron*. 23, 297–308.
- Buss, A.**, 2004. Gradual loss of myelin and formation of an astrocytic scar during Wallerian degeneration in the human spinal cord. *Brain*. 127, 34–44.
- Buss, A.**, 2004a. Gradual loss of myelin and formation of an astrocytic scar during Wallerian degeneration in the human spinal cord. *Brain*. 127, 34–44.
- Buss, A.**, 2004b. Sequential loss of myelin proteins during Wallerian degeneration in the human spinal cord. *Brain*. 128, 356–364.
- Calatayud, M.P.**, Riggio, C., Raffa, V., Sanz, B., Torres, T.E., Ibarra, M.R., Hoskins, C., Cuschieri, A., Wang, L., Pinkernelle, J., Keilhoff, G., Goya, G.F., 2013. Neuronal cells loaded with PEI-coated Fe₃O₄ nanoparticles for magnetically guided nerve regeneration. *J. Mater. Chem. B*. 1, 3607.
- Carlson, C.**, Hussain, S.M., Schrand, A.M., K. Braydich-Stolle, L., Hess, K.L., Jones, R.L., Schlager, J.J., 2008. Unique Cellular Interaction of Silver Nanoparticles: Size-Dependent Generation of Reactive Oxygen Species. *J. Phys. Chem. B*. 112, 13608–13619.
- Carlstedt, T.**, Anand, P., Hallin, R., Misra, P.V., Norén, G., Seferlis, T., 2000. Spinal nerve root repair and reimplantation of avulsed ventral roots into the spinal cord after brachial plexus injury. *J. Neurosurg*. 93, 237–247.
- Casha, S.**, Zygun, D., McGowan, M.D., Bains, I., Yong, V.W., John Hurlbert, R., 2012. Results of a phase II placebo-controlled randomized trial of minocycline in acute spinal cord injury. *Brain*. 135, 1224–1236.
- Chamak, B.**, Morandi, V., Mallat, M., 1994. Brain macrophages stimulate neurite growth and regeneration by secreting thrombospondin. *J. Neurosci. Res*. 38, 221–233.
- Chechneva, O.**, Dinkel, K., Cavaliere, F., Martinez-Sanchez, M., Reymann, K.G., 2006. Anti-inflammatory treatment in oxygen–glucose-deprived hippocampal slice cultures is neuroprotective and associated with reduced cell proliferation and intact neurogenesis. *Neurobiol. Dis*. 23, 247–259.
- Chen, H.**, Tung, Y.-C., Li, B., Iqbal, K., Grundke-Iqbal, I., 2007. Trophic factors counteract elevated FGF-2-induced inhibition of adult neurogenesis. *Neurobiology of Aging*. 28, 1148–1162.
- Chen, Y.**, Vartiainen, N.E., Ying, W., Chan, P.H., Koistinaho, J., Swanson, R.A., 2001. Astrocytes protect neurons from nitric oxide toxicity by a glutathione-dependent mechanism. *J. Neurochem*. 77, 1601–1610.
- Chen, Z.-L.**, Yu, W.-M., Strickland, S., 2007. Peripheral regeneration. *Annu. Rev. Neurosci*. 30, 209–233.
- Chen-Roetling, J.**, Chen, L., Regan, R.F., 2009. Minocycline attenuates iron neurotoxicity in cortical cell cultures. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 386, 322–326.

- Chertok, B.**, Moffat, B.A., David, A.E., Yu, F., Bergemann, C., Ross, B.D., Yang, V.C., 2008. Iron oxide nanoparticles as a drug delivery vehicle for MRI monitored magnetic targeting of brain tumors. *Biomaterials*. 29, 487–496.
- Chew, S.S.L.**, Johnson, C.S., Green, C.R., Danesh-Meyer, H.V., 2010. Role of connexin43 in central nervous system injury. *Exp. Neurol*. 225, 250–261.
- Cho, D.C.**, Cheong, J.H., Yang, M.S., Hwang, S.J., Kim, J.M., Kim, C.H., 2011. The effect of minocycline on motor neuron recovery and neuropathic pain in a rat model of spinal cord injury. *J. Korean Neurosurg. Soc.* 49, 83–91.
- Chou, L.Y.T.**, Ming, K., Chan, W.C.W., 2010. Strategies for the intracellular delivery of nanoparticles. *Chem. Soc. Rev.* 40, 233.
- Cui, W.**, Allen, N.D., Skynner, M., Gusterson, B., Clark, A.J., 2001. Inducible ablation of astrocytes shows that these cells are required for neuronal survival in the adult brain. *Glia*. 34, 272–282.
- Cui, Y.**, Liao, X.-X., Liu, W., Guo, R.-X., Wu, Z.-Z., Zhao, C.-M., Chen, P.-X., Feng, J.-Q., 2008. A novel role of minocycline: Attenuating morphine antinociceptive tolerance by inhibition of p38 MAPK in the activated spinal microglia. *Brain Behav. Immun.* 22, 114–123.
- Czirr, E.**, Wyss-Coray, T., 2012. The immunology of neurodegeneration. *J. Clin. Invest.* 122, 1156–1163.
- David, S.**, Kroner, A., 2011. Repertoire of microglial and macrophage responses after spinal cord injury. *Nat Rev Neurosci.* 12, 388–399.
- Diguët, E.**, Fernagut, P.-O., Wei, X., Du, Y., Rouland, R., Gross, C., Bezard, E., Tison, F., 2004a. Deleterious effects of minocycline in animal models of Parkinson's disease and Huntington's disease. *Eur. J. Neurosci.* 19, 3266–3276.
- Diguët, E.**, Gross, C.E., Tison, F., Bezard, E., 2004b. Rise and fall of minocycline in neuroprotection: need to promote publication of negative results. *Exp. Neurol.* 189, 1–4.
- Dillingham, T.R.**, 1998. Approach to Trauma of Peripheral Nerves. 1998 AAEM Course C: Electrodiagnosis in Traumatic Conditions—Course Handout. AAEM, Rochester, MN, 7–12.
- Ditsch, A.**, Laibinis, P.E., Wang, D.I.C., Hatton, T.A., 2005. Controlled Clustering and Enhanced Stability of Polymer-Coated Magnetic Nanoparticles. *Langmuir*. 21, 6006–6018.
- Doherty, G.J.**, McMahon, H.T., 2009. Mechanisms of Endocytosis. *Annu. Rev. Biochem.* 78, 857–902.
- Dong, Y.**, Benveniste, E.N., 2001. Immune function of astrocytes. *Glia*. 36, 180–190.
- Donnelly, D.J.**, Popovich, P.G., 2008. Inflammation and its role in neuroprotection, axonal regeneration and functional recovery after spinal cord injury. *Exp. Neurol.* 209, 378–388.

- Dunning, M.D.**, Kettunen, M.I., French Constant, C., Franklin, R.J., Brindle, K.M., 2006. Magnetic resonance imaging of functional Schwann cell transplants labelled with magnetic microspheres. *31*, 172–180.
- Eggers, R.**, Tannemaat, M.R., Ehlert, E.M., Verhaagen, J., 2010. A spatio-temporal analysis of motoneuron survival, axonal regeneration and neurotrophic factor expression after lumbar ventral root avulsion and implantation. *Exp. Neurol.* **223**, 207–220.
- Fansa, H.**, Keilhoff, G., 2003. Faktoren, die die Regeneration peripherer Nerven beeinflussen. *Handchir Mikrochir plast Chir.* **35**, 72–82.
- Farahani, R.**, Pina-Benabou, M.H., Kyrozis, A., Siddiq, A., Barradas, P.C., Chiu, F.-C., Cavalcante, L.A., Lai, J.C., Stanton, P.K., Rozental, R., 2005. Alterations in metabolism and gap junction expression may determine the role of astrocytes as good samaritans or executioners. *Glia.* **50**, 351–361.
- Farina, C.**, Aloisi, F., Meinl, E., 2007. Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. *Trends in Immunology.* **28**, 138–145.
- 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**, 2143–2155.
- Faustmann, P.M.**, Haase, C.G., Romberg, S., Hinkerohe, D., Szlachta, D., Smikalla, D., Krause, D., Dermietzel, R., 2003. Microglia activation influences dye coupling and Cx43 expression of the astrocytic network. *Glia.* **42**, 101–108.
- Fields, R.D., Ellisman, M.H., 1986a. Axons regenerated through silicone tube splices: I. Conduction properties. *Experimental Neurology.* **92**, 48–60.
- Fields, R.D.**, Ellisman, M.H., 1986b. Axons regenerated through silicone tube splices: II. Functional morphology. *Experimental Neurology.* **92**, 61–74.
- Fleige, G.**, Nolte, C., Synowitz, M., Seeberger, F., Kettenmann, H., Zimmer, C., 2001. Magnetic labeling of activated microglia in experimental gliomas. *Neoplasia.* **3**, 489–499.
- Fortun, J.**, Hill, C.E., Bunge, M.B., 2009. Combinatorial strategies with Schwann cell transplantation to improve repair of the injured spinal cord. *Neurosci. Lett.* **456**, 124–132.
- Gallo, V.**, Kingsbury, A., Balazs, R., Jorgensen, O.S., 1987. The role of depolarization in the survival and differentiation of cerebellar granule cells in culture. *The Journal of Neuroscience.* **7**, 2203–2213.
- Gao, Z.**, Zhu, Q., Zhang, Y., Zhao, Y., Cai, L., Shields, C., Cai, J., 2013. Reciprocal Modulation Between Microglia and Astrocyte in Reactive Gliosis Following the CNS Injury. *Mol Neurobiol.* **48**, 690–701.

- Garcia-Martinez, E.M.**, Sanz-Blasco, S., Karachitos, A., Bandez, M.J., Fernandez-Gomez, F.J., Perez-Alvarez, S., Mera, R.M.M.F. de, Jordan, M.J., Aguirre, N., Galindo, M.F., Villalobos, C., Navarro, A., Kmita, H., Jordán, J., 2010. Mitochondria and calcium flux as targets of neuroprotection caused by minocycline in cerebellar granule cells. *Biochem. Pharmacol.* 79, 239–250.
- Gerardo-Nava, J.**, Hodde, D., Katona, I., Bozkurt, A., Grehl, T., Steinbusch, H.W.M., Weis, J., Brook, G.A., 2014. Spinal cord organotypic slice cultures for the study of regenerating motor axon interactions with 3D scaffolds. *Biomaterials.* 35, 4288–4296.
- Gieseler, A.**, Schultze, A.T., Kupsch, K., Haroon, M.F., Wolf, G., Siemen, D., Kreutzmann, P., 2009. Inhibitory modulation of the mitochondrial permeability transition by minocycline. *Biochem. Pharmacol.* 77, 888–896.
- Gimona, M.**, Olk, S., Zoidl, G., Dermietzel, R., 2009. Connexins, cell motility, and the cytoskeleton. *Cell Motil. Cytoskeleton.* 66, 1000–1016.
- Gimsa, U.**, Mitchison, N.A., Brunner-Weinzierl, M.C., 2013. Immune Privilege as an Intrinsic CNS Property: Astrocytes Protect the CNS against T-Cell-Mediated Neuroinflammation. *Mediators of Inflammation.* 2013, 1–11.
- Goldberg, J.L.**, Barres, B.A., 2000. The Relationship between Neuronal Survival and Regeneration. *Annu. Rev. Neurosci.* 23, 579–612.
- Griffin, J.W.**, Hogan, M.V., Chhabra, A.B., Deal, D.N., 2013. Peripheral Nerve Repair and Reconstruction. *J Bone Joint Surg Am.* 95, 2144.
- Gu, H.-Y.**, Chai, H., Zhang, J.-Y., Yao, Z.-B., Zhou, L.-H., Wong, W.-M., Bruce, I., Wu, W.-T., 2004. Survival, regeneration and functional recovery of motoneurons in adult rats by reimplantation of ventral root following spinal root avulsion. *European Journal of Neuroscience.* 19, 2123–2131.
- Guo, G.**, Bhat, N.R., 2007. p38alpha MAP kinase mediates hypoxia-induced motor neuron cell death: a potential target of minocycline's neuroprotective action. *Neurochem. Res.* 32, 2160–2166.
- Gupta, A.K.**, Gupta, M., 2005. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials.* 26, 3995–4021.
- Gwak, Y.S.**, Nam, T.S., Paik, K.S., Hulsebosch, C.E., Leem, J.W., 2003. Attenuation of mechanical hyperalgesia following spinal cord injury by administration of antibodies to nerve growth factor in the rat. *Neuroscience Letters.* 336, 117–120.
- Hamasaki, T.**, Tanaka, N., Kamei, N., Ishida, O., Yanada, S., Nakanishi, K., Nishida, K., Oishi, Y., Kawamata, S., Sakai, N., Ochi, M., 2007. Magnetically Labeled Neural Progenitor Cells, Which Are Localized by Magnetic Force, Promote Axon Growth in Organotypic Cocultures. *Spine.* 32, 2300–2305.

- Haninac, P.**, Dubový, P., Šámal, F., Houštava, L., Stejskal, L., 2004. Reinnervation of the rat musculocutaneous nerve stump after its direct reconnection with the C5 spinal cord segment by the nerve graft following avulsion of the ventral spinal roots: a comparison of intrathecal administration of brain-derived neurotrophic factor and Cerebrolysin. *Exp Brain Res.* 159, 425–432.
- Hanisch, U.-K.**, Kettenmann, H., 2007. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci.* 10, 1387–1394.
- Harms, V.**, 2004. *Physik für Mediziner und Pharmazeuten*, 16. Harms.
- Haroon, M.F.**, Fatima, A., Schöler, S., Gieseler, A., Horn, T.F.W., Kirches, E., Wolf, G., Kreuzmann, P., 2007. Minocycline, a possible neuroprotective agent in Leber's hereditary optic neuropathy (LHON): Studies of cybrid cells bearing 11778 mutation. *Neurobiology of Disease.* 28, 237–250.
- Harten, U.**, 2007. *Physik für Mediziner*, 12. Springer.
- Hoffmann, N.**, Mittnacht, U., Hartmann, H., Baumer, Y., Kjems, J., Oberhoffner, S., Schlosshauer, B., 2011. Neuronal and glial responses to siRNA-coated nerve guide implants in vitro. *Neuroscience Letters.* 494, 14–18.
- Homkajorn, B.**, Sims, N.R., Muyderman, H., 2010. Connexin 43 regulates astrocytic migration and proliferation in response to injury. *Neurosci. Lett.* 486, 197–201.
- Huang, C.**, Han, X., Li, X., Lam, E., Peng, W., Lou, N., Torres, A., Yang, M., Garre, J.M., Tian, G.-F., Bennett, M.V.L., Nedergaard, M., Takano, T., 2012. Critical Role of Connexin 43 in Secondary Expansion of Traumatic Spinal Cord Injury. *J. Neurosci.* 32, 3333–3338.
- Huang, S.-H.**, 2006. Gold nanoparticle-based immunochromatographic test for identification of *Staphylococcus aureus* from clinical specimens. *Clinica Chimica Acta.* 373, 139–143.
- Iannotti, C.**, Li, H., Yan, P., Lu, X., Wirthlin, L., Xu, X.-M., 2003. Glial cell line-derived neurotrophic factor-enriched bridging transplants promote propriospinal axonal regeneration and enhance myelination after spinal cord injury. *Exp. Neurol.* 183, 379–393.
- IJkema-Paassen, J.**, Jansen, K., Gramsbergen, A., Meek, M.F., 2004. Transection of peripheral nerves, bridging strategies and effect evaluation. *Animal Models for Tissue Engineering Applications.* 25, 1583–1592.
- Iversen, T.-G.**, Skotland, T., Sandvig, K., 2011. Endocytosis and intracellular transport of nanoparticles: Present knowledge and need for future studies. *Nano Today.* 6, 176–185.
- Jenkins, S.I.**, Pickard, M.R., Furness, D.N., Yiu, H.H.P., Chari, D.M., 2013. Differences in magnetic particle uptake by CNS neuroglial subclasses: implications for neural tissue engineering. *Nanomedicine.* 8, 951–968.

- Jenkins, S.I.**, Pickard, M.R., Granger, N., Chari, D.M., 2011. Magnetic Nanoparticle-Mediated Gene Transfer to Oligodendrocyte Precursor Cell Transplant Populations Is Enhanced by Magnetofection Strategies. *ACS Nano*. 5, 6527–6538.
- Jordan, A.**, Scholz, R., Maier-Hauff, K., Johannsen, M., Wust, P., Nadobny, J., Schirra, H., Schmidt, H., Deger, S., Loening, S., Lanksch, W., Felix, R., 2001. Presentation of a new magnetic field therapy system for the treatment of human solid tumors with magnetic fluid hyperthermia. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. 225, 118–126.
- Jordan, A.**, Scholz, R., Wust, P., Föhling, H., Roland Felix, 1999. Magnetic fluid hyperthermia (MFH): Cancer treatment with AC magnetic field induced excitation of biocompatible superparamagnetic nanoparticles. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. 201, 413–419.
- Kalmár, B.**, Kittel, Á., Lemmens, R., Környei, Z., Madarász, E., 2001. Cultured astrocytes react to LPS with increased cyclooxygenase activity and phagocytosis. *Neurochemistry International*. 38, 453–461.
- Kandel, E.R.**, 2000. *Principles of Neural Science*, 3. McGraw-Hill Medical.
- Kashihara, Y.**, Kuno, M., Miyata, Y., 1987. Cell death of axotomized motoneurons in neonatal rats, and its prevention by peripheral reinnervation. *J. Physiol*. 386, 135–148.
- Keilhoff, G.**, Fansa, H., Wolf, G., 2004. Neuronal NOS deficiency promotes apoptotic cell death of spinal cord neurons after peripheral nerve transection. *Nitric Oxide*. 10, 101–111.
- Keilhoff, G.**, Langnaese, K., Wolf, G., Fansa, H., 2007. Inhibiting effect of minocycline on the regeneration of peripheral nerves. *Dev. Neurobiol*. 67, 1382–1395.
- Keilhoff, G.**, Langnaese, K., Wolf, G., Fansa, H., 2007. Inhibiting effect of minocycline on the regeneration of peripheral nerves. *Dev. Neurobiol*. 67, 1382–1395.
- Keilhoff, G.**, Schild, L., Fansa, H., 2008. Minocycline protects Schwann cells from ischemia-like injury and promotes axonal outgrowth in bioartificial nerve grafts lacking Wallerian degeneration. *Experimental Neurology*. 212, 189–200.
- Keller, A.F.**, Gravel, M., Kriz, J., 2011. Treatment with minocycline after disease onset alters astrocyte reactivity and increases microgliosis in SOD1 mutant mice. *Exp. Neurol*. 228, 69–79.
- Kielian, T.**, 2008. Glial connexins and gap junctions in CNS inflammation and disease. *J. Neurochem*. 106, 1000–1016.
- Kigerl, K.A.**, Gensel, J.C., Ankeny, D.P., Alexander, J.K., Donnelly, D.J., Popovich, P.G., 2009. Identification of Two Distinct Macrophage Subsets with Divergent Effects Causing either Neurotoxicity or Regeneration in the Injured Mouse Spinal Cord. *J. Neurosci*. 29, 13435–13444.
- Kim, H.-S.**, Suh, Y.-H., 2009. Minocycline and neurodegenerative diseases. *Behav. Brain Res*. 196, 168–179.

- Kim, J.A.**, Lee, N., Kim, B.H., Rhee, W.J., Yoon, S., Hyeon, T., Park, T.H., 2011. Enhancement of neurite outgrowth in PC12 cells by iron oxide nanoparticles. *Biomaterials*. 32, 2871–2877.
- Kirshblum, S.C.**, Waring, W., Biering-Sorensen, F., Burns, S.P., Johansen, M., Schmidt-Read, M., Donovan, W., Graves, D.E., Jha, A., Jones, L., Mulcahey, M.J., Krassioukov, A., 2011. Reference for the 2011 revision of the international standards for neurological classification of spinal cord injury. *The Journal of Spinal Cord Medicine*. 34, 547–554.
- Koliatsos, V.E.**, Price, W.L., Pardo, C.A., Price, D.L., 1994. Ventral root avulsion: An experimental model of death of adult motor neurons. *J. Comp. Neurol.* 342, 35–44.
- Kroll, A.**, Pillukat, M.H., Hahn, D., Schnekenburger, J., 2009. Current in vitro methods in nanoparticle risk assessment: Limitations and challenges. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 72, 370–377.
- Kupsch, K.**, Hertel, S., Kreutzmann, P., Wolf, G., Wallesch, C.-W., Siemen, D., Schönfeld, P., 2009. Impairment of mitochondrial function by minocycline. *FEBS J.* 276, 1729–1738.
- Kwon, B.K.**, Okon, E., Hillyer, J., Mann, C., Baptiste, D., Weaver, L.C., Fehlings, M.G., Tetzlaff, W., 2011. A systematic review of non-invasive pharmacologic neuroprotective treatments for acute spinal cord injury. *J. Neurotrauma*. 28, 1545–1588.
- Lee, I.-H.**, Lindqvist, E., Kiehn, O., Widenfalk, J., Olson, L., 2005. Glial and neuronal connexin expression patterns in the rat spinal cord during development and following injury. *J. Comp. Neurol.* 489, 1–10.
- 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, 1017–1027.
- Levi, G.**, Aloisi, F., Wilkin, G.P., 1987. Differentiation of cerebellar bipotential glial precursors into oligodendrocytes in primary culture: Development profile of surface antigens and mitotic activity. *J. Neurosci. Res.* 18, 407–417.
- Li, L.**, Houenou, L.J., Wu, W., Lei, M., Prevet, D.M., Oppenheim, R.W., 1998. Characterization of spinal motoneuron degeneration following different types of peripheral nerve injury in neonatal and adult mice. *J. Comp. Neurol.* 396, 158–168.
- Li, L.**, Oppenheim, R.W., Lei, M., Houenou, L.J., 1994. Neurotrophic agents prevent motoneuron death following sciatic nerve section in the neonatal mouse. *J. Neurobiol.* 25, 759–766.
- Lim, P.A.**, Tow, A.M., 2007. Recovery and regeneration after spinal cord injury: a review and summary of recent literature. *Ann Acad Med Singapore*. 36, 49–57.
- Lin, J.H.-C.**, Weigel, H., Cotrina, M.L., Liu, S., Bueno, E., Hansen, A.J., Hansen, T.W., Goldman, S., Nedergaard, M., 1998. Gap-junction-mediated propagation and amplification of cell injury. *Nat. Neurosci.* 1, 494–500.

- Liu, W.**, Tang, Y., Feng, J., 2011. Cross talk between activation of microglia and astrocytes in pathological conditions in the central nervous system. *Life Sci.* 89, 141–146.
- Loane, D.**, Byrnes, K., 2010. Role of microglia in neurotrauma. *Neurotherapeutics.* 7, 366–377.
- Lodish, H.**, Lange, C., 2001. *Molekulare Zellbiologie*, 4. Spektrum, Akad. Verl.
- Lundqvist, M.**, Stigler, J., Elia, G., Lynch, I., Cedervall, T., Dawson, K.A., 2008. Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impacts. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 105, 14265–14270.
- Machado, L.S.**, Kozak, A., Ergul, A., Hess, D.C., Borlongan, C.V., Fagan, S.C., 2006. Delayed minocycline inhibits ischemia-activated matrix metalloproteinases 2 and 9 after experimental stroke. *BMC Neurosci.* 7, 56.
- Maier, I.C.**, Schwab, M.E., 2006. Sprouting, regeneration and circuit formation in the injured spinal cord: factors and activity. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences.* 361, 1611–1634.
- Mailänder, V.**, Landfester, K., 2009. Interaction of Nanoparticles with Cells. *Biomacromolecules.* 10, 2379–2400.
- Marsh, D.R.**, Wong, S.T., Meakin, S.O., MacDonald, J.I.S., Hamilton, E.F., Weaver, L.C., 2002. Neutralizing Intraspinal Nerve Growth Factor with a trkA-IgG Fusion Protein Blocks the Development of Autonomic Dysreflexia in a Clip-Compression Model of Spinal Cord Injury. *Journal of Neurotrauma.* 19, 1531–1541.
- McAllister, J.P.**, Miller, J.M., 2010. Minocycline inhibits glial proliferation in the H-Tx rat model of congenital hydrocephalus. *Cerebrospinal Fluid Res.* 7, 7.
- McDonald, J.W., Sadowsky, C., 2002. Spinal-cord injury. *The Lancet.* 359, 417–425.
- Mittnacht, U.**, Hartmann, H., Hein, S., Oliveira, H., Dong, M., P. Pêgo, A., Kjems, J., Howard, K.A., Schlosshauer, B., 2010. Chitosan/siRNA Nanoparticles Biofunctionalize Nerve Implants and Enable Neurite Outgrowth. *Nano Lett.* 10, 3933–3939.
- Mortimer, C.E.**, Müller, U., 2003. *Chemie*, 8. Thieme.
- Mukherjee, S., Ghosh, R.N., Maxfield, F.R., 1997. Endocytosis. *Physiological Reviews.* 77, 759–803.
- Nagy, J.I.**, Rash, J., 2000. Connexins and gap junctions of astrocytes and oligodendrocytes in the CNS. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 32, 29–44.
- Nakajima, K.**, Honda, S., Tohyama, Y., Imai, Y., Kohsaka, S., Kurihara, T., 2001. Neurotrophin secretion from cultured microglia. *J. Neurosci. Res.* 65, 322–331.
- Nakajima, K.**, Kohsaka, S., 2004. Microglia: Neuroprotective and Neurotrophic Cells in the Central Nervous System. *CDTCHD.* 4, 65–84.
- Navarro, X.**, Vivó, M., Valero-Cabré, A., 2007. Neural plasticity after peripheral nerve injury and regeneration. *Progress in Neurobiology.* 82, 163–201.

- Nedergaard, M.**, Cooper, A.J.L., Goldman, S.A., 1995. Gap junctions are required for the propagation of spreading depression. *J. Neurobiol.* 28, 433–444.
- Neumann, H.**, Kotter, M.R., Franklin, R.J.M., 2008. Debris clearance by microglia: an essential link between degeneration and regeneration. *Brain.* 132, 288–295.
- Neumann, J.**, Gunzer, M., Gutzeit, H.O., Ullrich, O., Reymann, K.G., Dinkel, K., 2006. Microglia provide neuroprotection after ischemia. *FASEB J.* 20, 714–716.
- Nichterwitz, S.**, Hoffmann, N., Hajosch, R., Oberhoffner, S., Schlosshauer, B., 2010. Bioengineered glial strands for nerve regeneration. *Neuroscience Letters.* 484, 118–122.
- Nikodemova, M.**, Watters, J.J., Jackson, S.J., Yang, S.K., Duncan, I.D., 2007. Minocycline Down-regulates MHC II Expression in Microglia and Macrophages through Inhibition of IRF-1 and Protein Kinase C (PKC) /betaII. *J. Biol. Chem.* 282, 15208–15216.
- Noble, J.**, Munro, C.A., Prasad, V.S.S.V., Midha, R., 1998. Analysis of Upper and Lower Extremity Peripheral Nerve Injuries in a Population of Patients with Multiple Injuries. *The Journal of Trauma: Injury, Infection, and Critical Care.* 45, 116–122.
- Norenberg, M.D.**, Smith, J., Marcillo, A., 2004. The Pathology of Human Spinal Cord Injury: Defining the Problems. *J. Neurotrauma.* 21, 429–440.
- Noske, W.**, Lentzen, H., Lange, K., Keller, K., 1982. Phagocytotic activity of glial cells in culture. *Experimental Cell Research.* 142, 437–445.
- Nutile-McMenemy, N.**, Elfenbein, A., DeLeo, J.A., 2007. Minocycline decreases in vitro microglial motility, β 1 -integrin, and Kv1.3 channel expression. *J. Neurochem.* 103, 2035–2046.
- Olk, S.**, Turchinovich, A., Grzendowski, M., Stühler, K., Meyer, H.E., Zoidl, G., Dermietzel, R., 2010. Proteomic analysis of astroglial connexin43 silencing uncovers a cytoskeletal platform involved in process formation and migration. *Glia.* 58, 494–505.
- Pekny, M.**, Nilsson, M., 2005. Astrocyte activation and reactive gliosis. *Glia.* 50, 427–434.
- Pi, R.**, Li, W., Lee, N.T.K., Chan, H.H.N., Pu, Y., Chan, L.N., Sucher, N.J., Chang, D.C., Li, M., Han, Y., 2004. Minocycline prevents glutamate-induced apoptosis of cerebellar granule neurons by differential regulation of p38 and Akt pathways. *J. Neurochem.* 91, 1219–1230.
- Pickard, M.R.**, Chari, D.M., 2010. Robust Uptake of Magnetic Nanoparticles (MNPs) by Central Nervous System (CNS) Microglia: Implications for Particle Uptake in Mixed Neural Cell Populations. *IJMS.* 11, 967–981.
- Pinkernelle, J.**, Calatayud, P., Goya, G.F., Fansa, H., Keilhoff, G., 2012. Magnetic nanoparticles in primary neural cell cultures are mainly taken up by microglia. *BMC Neurosci.* 13, 32.
- Pinkernelle, J.**, Fansa, H., Ebmeyer, U., Keilhoff, G., 2013. Prolonged Minocycline Treatment Impairs Motor Neuronal Survival and Glial Function in Organotypic Rat Spinal Cord Cultures. *PLoS ONE* 8(8):e73422. doi:10.1371/journal.pone.0073422.

- Plane, J.M.**, Shen, Y., Pleasure, D.E., Deng, W., 2010. Prospects for minocycline neuroprotection. *Arch. Neurol.* 67, 1442–1448.
- Prewitt, C.M.F.**, Niesman, I.R., Kane, C.J.M., Houlé, J.D., 1997. Activated Macrophage/Microglial Cells Can Promote the Regeneration of Sensory Axons into the Injured Spinal Cord. *Experimental Neurology.* 148, 433–443.
- Rabchevsky, A.G.**, Streit, W.J., 1997. Grafting of cultured microglial cells into the lesioned spinal cord of adult rats enhances neurite outgrowth. *J. Neurosci. Res.* 47, 34–48.
- Raffa, V.**, Cristina Riggio, Calatayud, Hoskins, Pinkernelle, Goya, Wang, L., Keilhoff, Cuschieri, A., 2012. Poly-L-lysine-coated magnetic nanoparticles as intracellular actuators for neural guidance. *IJN*, 3155.
- Rakowicz, W.P.**, Staples, C.S., Milbrandt, J., Brunstrom, J.E., Johnson, E.M., 2002. Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor Promotes the Survival of Early Postnatal Spinal Motor Neurons in the Lateral and Medial Motor Columns in Slice Culture. *J. Neurosci.* 22, 3953–3962.
- Ransohoff, R.M.**, Perry, V.H., 2009. Microglial Physiology: Unique Stimuli, Specialized Responses. *Annu. Rev. Immunol.* 27, 119–145.
- Reichert, F.**, Saada, A., Rotshenker, S., 1994. Peripheral nerve injury induces Schwann cells to express two macrophage phenotypes: phagocytosis and the galactose-specific lectin MAC-2. *The Journal of Neuroscience.* 14, 3231–3245.
- Riggio, C.**, Calatayud, M.P., Giannaccini, M., Sanz, B., Torres, T.E., Fernández-Pacheco, R., Ripoli, A., Ibarra, M.R., Dente, L., Cuschieri, A., Goya, G.F., Raffa, V. The orientation of the neuronal growth process can be directed via magnetic nanoparticles under an applied magnetic field. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine.*
- Riggio, C.**, Nocentini, S., Catalayud, M., Goya, G., Cuschieri, A., Raffa, V., del Río, J., 2013. Generation of Magnetized Olfactory Ensheathing Cells for Regenerative Studies in the Central and Peripheral Nervous Tissue. *IJMS.* 14, 10852–10868.
- Rivest, S.**, 2009. Regulation of innate immune responses in the brain. *Nat Rev Immunol.* 9, 429–439.
- Roberts, I.**, Yates, D., Sandercock, P., Farrell, B., Wasserberg, J., Lomas, G., Cottingham, R., Svoboda, P., CRASH trial collaborators, 2004. Effect of intravenous corticosteroids on death within 14 days in 10 008 adults with clinically significant head injury (MRC CRASH trial): randomised placebo-controlled trial. *The Lancet.* 364, 1321–1328.
- Robinson, L.R.**, 2000. Traumatic injury to peripheral nerves. *Muscle Nerve.* 23, 863–873.
- Rojanathanes, R.**, Sereemasapun, A., Pimpha, N., Buasorn, V., Ekawong, P., Wiwanitkit, V., 2008. Gold Nanoparticle as an Alternative Tool for a Urine Pregnancy Test. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology.* 47, 296–299.

- Rolls, A.**, Shechter, R., Schwartz, M., 2009. The bright side of the glial scar in CNS repair. *Nat. Rev. Neurosci.* 10, 235–241.
- Rossiter, J.P.**, Riopelle, R.J., Bisby, M.A., 1996. Axotomy-Induced Apoptotic Cell Death of Neonatal Rat Facial Motoneurons: Time Course Analysis and Relation to NADPH-Diaphorase Activity. *Exp. Neurol.* 138, 33–44.
- Rouach, N.**, Calvo, C.-F., Glowinski, J., Giaume, C., 2002. Brain macrophages inhibit gap junctional communication and downregulate connexin 43 expression in cultured astrocytes. *Eur J Neurosci.* 15, 403–407.
- Ruan, G.**, Agrawal, A., Marcus, A.I., Nie, S., 2007. Imaging and Tracking of Tat Peptide-Conjugated Quantum Dots in Living Cells: New Insights into Nanoparticle Uptake, Intracellular Transport, and Vesicle Shedding. *J. Am. Chem. Soc.* 129, 14759–14766.
- Saadoun, S.**, Papadopoulos, M.C., Watanabe, H., Yan, D., Manley, G.T., Verkman, A.S., 2005. Involvement of aquaporin-4 in astroglial cell migration and glial scar formation. *J. Cell. Sci.* 118, 5691–5698.
- Saijo, K.**, Glass, C.K., 2011. Microglial cell origin and phenotypes in health and disease. *Nat Rev Immunol.* 11, 775–787.
- Scheib, J.**, Höke, A., 2013. Advances in peripheral nerve regeneration. *Nat Rev Neurol.* 9, 668–676.
- Shubayev, V.I.**, Pisanic II, T.R., Jin, S., 2009. Magnetic nanoparticles for theragnostics. *Nat Rev Mater.* 61, 467–477.
- Silva Bastos, L.F.**, Pinheiro Oliveira, A.C. de, Magnus Schlachetzki, J.C., Fiebich, B.L., 2011. Minocycline reduces prostaglandin E synthase expression and 8-isoprostane formation in LPS-activated primary rat microglia. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 33, 576–580.
- Sofroniew, M.V.**, 2009. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends in Neurosciences.* 32, 638–647.
- Song, Y.**, Wei, E.-Q., Zhang, W.-P., Zhang, L., Liu, J.-R., Chen, Z., 2004. Minocycline protects PC12 cells from ischemic-like injury and inhibits 5-lipoxygenase activation. *NeuroReport.* 15, 2181–2184.
- Stahel, P.F.**, VanderHeiden, T., Finn, M.A., 2012. Management strategies for acute spinal cord injury. *Current Opinion in Critical Care.* 18, 651–660.
- Stavridis, S.I.**, Dehghani, F., Korf, H.-W., Hailer, N.P., 2005. Characterisation of transverse slice culture preparations of postnatal rat spinal cord: preservation of defined neuronal populations. *Histochem Cell Biol.* 123, 377–392.
- Stoll, G.**, Griffin, J.W., Li, C.Y., Trapp, B.D., 1989. Wallerian degeneration in the peripheral nervous system: participation of both Schwann cells and macrophages in myelin degradation. *J Neurocytol.* 18, 671–683.
- Stoppini, L.**, Buchs, P.-A., Muller, D., 1991. A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *J. Neurosci. Methods.* 37, 173–182.

- Streit, W.J.**, 2002. Microglia as neuroprotective, immunocompetent cells of the CNS. *Glia*. 40, 133–139.
- Sunderland, S.S.**, 1990. The anatomy and physiology of nerve injury. *Muscle Nerve*. 13, 771–784.
- Sundstrom, L.**, Pringle, A., Morrison, B., Bradley, M., 2005. Organotypic cultures as tools for functional screening in the CNS. *Drug Discovery Today*. 10, 993–1000.
- Suzumura, A.**, Marunouchi, T., Yamamoto, H., 1991. Morphological transformation of microglia in vitro. *Brain Res*. 545, 301–306.
- Takami, T.**, Oudega, M., Bates, M.L., Wood, P.M., Kleitman, N., Bunge, M.B., 2002. Schwann Cell But Not Olfactory Ensheathing Glia Transplants Improve Hindlimb Locomotor Performance in the Moderately Contused Adult Rat Thoracic Spinal Cord. *J. Neurosci*. 22, 6670–6681.
- Tanaka, T.**, Ueno, M., Yamashita, T., 2009. Engulfment of Axon Debris by Microglia Requires p38 MAPK Activity. *Journal of Biological Chemistry*. 284, 21626–21636.
- Tansey, F.A.**, Cammer, W., 1998. Differential uptake of dextran beads by astrocytes, macrophages and oligodendrocytes in mixed glial-cell cultures from brains of neonatal rats. *Neuroscience Letters*. 248, 159–162.
- Thuret, S.**, Moon, L.D.F., Gage, F.H., 2006. Therapeutic interventions after spinal cord injury. *Nat Rev Neurosci*. 7, 628–643.
- Tikka, T.**, Fiebich, B.L., Goldsteins, G., Keinänen, R., Koistinaho, J., 2001. Minocycline, a Tetracycline Derivative, Is Neuroprotective against Excitotoxicity by Inhibiting Activation and Proliferation of Microglia. *J. Neurosci*. 21, 2580–2588.
- Toku, K.**, Tanaka, J., Yano, H., Desaki, J., Zhang, B., Yang, L., Ishihara, K., Sakanaka, M., Maeda, N., 1998. Microglial cells prevent nitric oxide-induced neuronal apoptosis in vitro. *J. Neurosci. Res*. 53, 415–425.
- Trepel, M.**, 1999. *Neuroanatomie*, 2. Auflage, Urban & Fischer.
- Trepel, M.**, 2004. *Neuroanatomie*, 3. Auflage, Urban & Fischer.
- Trepel, M.**, 2012. *Neuroanatomie*, 5. Auflage, Urban & Fischer.
- Triarhou, L.C.**, Del Cerro, M., Herndon, R.M., 1985. Ultrastructural evidence for phagocytosis by oligodendroglia. *Neuroscience Letters*. 53, 185–189.
- Unfried, K.**, Albrecht, C., Klotz, L.-O., Mikecz, A. von, Grether-Beck, S., Schins, R.P., 2007. Cellular responses to nanoparticles: Target structures and mechanisms. *Nanotoxicology*. 1, 52–71.
- Vargas, M.E.**, Barres, B.A., 2007. Why Is Wallerian Degeneration in the CNS So Slow? *Annu. Rev. Neurosci*. 30, 153–179.
- Volterra, A.**, Meldolesi, J., 2005. Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. *Nat Rev Neurosci*. 6, 626–640.

- Vyas, A.**, Li, Z., Aspalter, M., Feiner, J., Hoke, A., Zhou, C., O'Daly, A., Abdullah, M., Rohde, C., Brushart, T.M., 2010. An in vitro model of adult mammalian nerve repair. *Exp. Neurol.* 223, 112–118.
- Wang, Y.**, Wang, B., Zhu, M.-T., Li, M., Wang, H.-J., Wang, M., Ouyang, H., Chai, Z.-F., Feng, W.-Y., Zhao, Y.-L., 2011. Microglial activation, recruitment and phagocytosis as linked phenomena in ferric oxide nanoparticle exposure. *Toxicology Letters.* 205, 26–37.
- Watson, C.**, Paxinos, G., Kayalioglu, G., 2009. *The spinal cord*, 1. Elsevier/Academic Press.
- Weaver, L.C.**, Verghese, P., Bruce, J., Fehlings, M., Krenz, N., Marsh, D., 2001. Autonomic Dysreflexia and Primary Afferent Sprouting after Clip-Compression Injury of the Rat Spinal Cord. *Journal of Neurotrauma.* 18, 1107–1119.
- Wells, J.E.A.**, Hurlbert, R.J., Fehlings, M.G., Yong, V.W., 2003. Neuroprotection by minocycline facilitates significant recovery from spinal cord injury in mice. *Brain.* 126, 1628–1637.
- White, R.E.**, Jakeman, L.B., 2008. Don't fence me in: Harnessing the beneficial roles of astrocytes for spinal cord repair. *Restor. Neurol. Neurosci.* 26, 197–214.
- Wiesmann, M.**, Linn, J., Brückmann, H., 2014. *Atlas Klinische Neuroradiologie. Atlas klinische Neuroradiologie.*
- Wörle-Knirsch, J.M.**, Pulskamp, K., Krug, H.F., 2006. Oops They Did It Again! Carbon Nanotubes Hoax Scientists in Viability Assays. *Nano Lett.* 6, 1261–1268.
- Wyndaele, M.**, Wyndaele, J.-J., 2006. Incidence, prevalence and epidemiology of spinal cord injury: what learns a worldwide literature survey? *Spinal Cord.* 44, 523–529.
- Yang, H.**, Liu, C., Yang, D., Zhang, H., Xi, Z., 2009. Comparative study of cytotoxicity, oxidative stress and genotoxicity induced by four typical nanomaterials: the role of particle size, shape and composition. *J. Appl. Toxicol.* 29, 69–78.
- Yang, L.**, Sugama, S., Chirichigno, J.W., Gregorio, J., Lorenzl, S., Shin, D.H., Browne, S.E., Shimizu, Y., Joh, T.H., Beal, M.F., Albers, D.S., 2003. Minocycline enhances MPTP toxicity to dopaminergic neurons. *J. Neurosci. Res.* 74, 278–285.
- Yiu, G.**, He, Z., 2006. Glial inhibition of CNS axon regeneration. *Nat. Rev. Neurosci.* 7, 617–627.
- Zhang, H.**, Yoon, S.-Y., Zhang, H., Dougherty, P.M., 2012. Evidence That Spinal Astrocytes but Not Microglia Contribute to the Pathogenesis of Paclitaxel-Induced Painful Neuropathy. *The Journal of Pain.* 13, 293–303.

Anhang A: Geräte, Chemikalien, Medien, Puffer

A1: Geräte und Verbrauchsmaterialien

Geräte/Verbrauchsmaterialien	Hersteller
AxioImager Mikroskop	Zeiss, Jena
Biorad Tankblotting	Biorad, Hercules, USA
Brutschrank	Hareus, Hanau
Deckgläschen	VWR, Radnor, USA
EM 900 Transmissionselektronenmikroskop	Zeiss, Jena
Entwicklermaschine	AGFA, Köln
FACSCanto II Flow cytometer	BD Bioscience, Franklin Lakes, USA
Gauge-Kanülen (18, 23 Gauge)	Braun, Melsungen
Leica DMI3000 Mikroskop	Leica, Wetzlar
M200 Mikroplattenreader	Tecan, Männedorf, Schweiz
McIlwain Tissue Chopper	Mickle Laboratory Engineering, Gomshall, UK
Millicell-Membraninserts	Millipore/Merck
Neubauer-Zählkammer	Jena-Feinoptik, Jena
Nitrocellulose-Membran	Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, UK
TCS SPE DMI4000 Konfokalmikroskop	Leica, Wetzlar
Ultramikrotom EM UC6	Leica, Wetzlar
Well-Platten (6-, 12-, 24-, 96-Well)	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Zellkulturflaschen	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Zellkulturpetrischalen (35 mm)	Nunc, Wiesbaden-Biebrich
Zentrifuge Biofuge 15R	Hareus, Hanau

A2: Chemikalien/Substanzen und Hersteller

Substanzen	Hersteller
10 x PBS	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Alexa 488, 546	Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, USA
Ammoniumpersulfat (APS)	Serva Electrophoresis, Heidelberg
Anti-Aktin	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Anti-CD11b/c	Pharmingen, Franklin Lakes, USA
Anti-Cx43	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Anti-Fibronectin	Abcam, Cambridge, GB
Anti-GALC	Chemicon, Billerica, USA
Anti-GAPDH	Chemicon, Billerica, USA
Anti-GFAP	Progen, Heidelberg
Anti-GFAP	Progen, Heidelberg
Anti-IBA-1	Wako Pure Chemicals Industries, Osaka, Japan
Anti-MAP2	Sternberger Monoclonals, Baltimore, USA
Anti-NeuN	Chemicon, Billerica, USA
Anti-Pan-NF	Sternberger Monoclonals, Baltimore, USA

Anti-S100	DAKO, Glostrup, Dänemark
BCA Kit Pierce	Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA
BSA	PAA/GE Healthcare, Little Chalfont, UK
Cacodylatpuffer	Serva Electrophoresis, Heidelberg
CompleteMini Protease Inhibitor Cocktail	Roche Applied Science, Basel, Schweiz
DAPI	Roche Applied Science, Basel, Schweiz
D-Glukose	Riedel-de-Haen/Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Dispase II	Roche Applied Sciences, Basel, Schweiz
DMEM high glucose	PAA/GE Healthcare, Little Chalfont, UK
DMSO	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Durcupan	Fluka/Sigma Aldrich, St. Louis, USA
ECL-Detektionssystem	Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, UK
Ethanol 100 % unvergällt	Zentralapotheke Universität Magdeburg
Ethanol 96 % vergällt	Otto Fischar, Saarbrücken
FKS	Biochrom, Berlin
fluidMAG-ARA	Chemicell, Berlin
GDNF	R&D Systems, Minneapolis, USA
GDNF-PEI-NPs	INA, Zaragoza, Spanien/SSSA, Pisa, Italien
Gly	Carl Roth, Karlsruhe
Glycin	Merck, Darmstadt
Größenstandard Gelelektrophorese (PageRuler)	Fermentas/Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA
HBSS	Biochrom, Berlin
HEPES	Gibco, Life Technologies, Darmstadt
Hyaluronidase	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Kaliumhexacyanoferrat(II)	Carl Roth, Karlsruhe
KCl	Carl Roth, Karlsruhe
Kernechtrot	Carl Roth, Karlsruhe
Kollagenase	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
L-Alanin-L-Glutamin	Biochrom, Berlin
Laminin	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
MEM (Hank's Salze)	Biochrom, Berlin
Methanol	Carl Roth, Karlsruhe
MgSO ₄	Merck, Darmstadt
Minozyklinhydrochlorid	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
MTT	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
NaCl	Merck, Darmstadt
NaHCO ₃	Fluka/Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Nano-screenMAG-ARA	Chemicell, Berlin
Osmiumtetroxid	Carl Roth, Karlsruhe
PDL	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
PEI-NPs	INA, Zaragoza, Spanien

Pen/Strep	Gibco, Life Technologies, Carlsbad, USA
PFA	Merck, Darmstadt
Polyacrylamid	Serva Electrophoresis, Heidelberg
Roti-Load	Carl Roth, Karlsruhe
Salzsäure	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
SDS	Carl Roth, Karlsruhe
Sekundärer Antikörper anti-Maus, anti-Kanninchen für Western Blot	Jackson Immuno Research, West Grove, USA
Shandon Immu-Mount	Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Serva Electrophoresis, Heidelberg
Tris	Carl Roth, Karlsruhe
Triton-X	Carl Roth, Karlsruhe
Trockenmilch	Carl Roth, Karlsruhe
Tween-20	Carl Roth, Karlsruhe
Uranylacetat	Ted Pella, Inc, Redding, USA

A3: Zellkulturmedien/Puffer/Lösungen und ihre Zusammensetzung

Zellkulturmedien, Puffer	Zusammensetzung
DMEM-PM	DMEM high-glucose, 6 g/l D-Glukose, 1 % Pen/Strep
DMEM-KM	DMEM high-glucose, 10 % FKS, 6 g/l D-Glukose, 1 % Pen/Strep
Astroglia-DMEM-KM	DMEM high-glucose (4,5 g/l D-Glukose), 10 % FKS, 1 % Pen/Strep
Serum-reduziertes Astroglia-DMEM-KM	DMEM high-glucose (4,5 g/l D-Glukose), 3 % FKS, 1 % Pen/Strep
RM-P	HBSS, 33,3 mM D-Glukose, 10 mM HEPES, 5,8 mM MgSO ₄ , 4,3 mM NaHCO ₃ , 0,03 % BSA, 1 % Pen/Strep
RM-M	50 % MEM, 25 % HBSS, 25 % FKS, 35 mM D-Glukose, 25 mM HEPES, 2 mM L-Alanin-L-Glutamin, 1 % Pen/Strep, 100 ng/ml GDNF
Reduziertes RM-M	50 % MEM, 25 % HBSS, 25 % FKS, 35 mM D-Glukose, 25 mM HEPES, 2 mM L-Alanin-L-Glutamin, 1 % Pen/Strep, 50 ng/ml GDNF
Null-RM-M	50 % MEM, 25 % HBSS, 25 % FKS, 35 mM D-Glukose, 25 mM HEPES, 2 mM L-Alanin-L-Glutamin, 1 % Pen/Strep
Blockpuffer (Immunzytochemie, Immunohistochemie)	PBS, 10 % FKS, 0,3 % Triton-X
Homogenisierungspuffer	20 mM Tris, 150 mM NaCl, 10 % Triton-X, SDS, CompleteMini Protease Inhibitor Cocktail
Trenngelpuffer (4x)	1,5 M Tris, 0,4 % SDS
Trenngel 10 %	5 ml H ₂ O, 2,5 ml Polyacrylamid, 2,5 ml Trenngelpuffer (4x), 50 µl APS (10 %), TEMED
Sammelgelpuffer (4x)	10 M Tris, 0,4 % SDS
Sammelgel 5 %	5,65 ml H ₂ O, 1,15 ml Polyacrylamid, 2,5 ml Sammelgelpuffer (4x), 700 µl Glycerin, 33 µl APS (10 %), 20 µl TEMED
Elektrophoresepuffer	0,25 M Tris, 1,92 M Glycin, 1 % SDS
Blotpuffer (10x)	1,92 M Glycin, 0,25 M Tris
Transferpuffer	100 ml Blotpuffer (10x), 200 ml Methanol, 700 ml H ₂ O
TBST	20 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1 % Tween-20
Blockpuffer (Western Blot)	TBST, 5 % Trockenmilch

Anhang B: Statistik und Werte

Viabilitätstest neuronenangereicherte cerebellare Mischkulturen mit k-NPs:

B1: 2-Wege-ANOVA (Kontrolle).

2-Wege-ANOVA		
	F-Wert	p-Wert
Interaktion	0,7855	0,5702
Behandlung	2,7290	0,0434
Zeit	0,0691	0,7949

B2: 1-Wege-ANOVA Faktor Behandlung (Kontrolle).

1-Wege-ANOVA		
	F-Wert	p-Wert
24 h	1,793	0,1889
72 h	11,83	0,0003

B3: Werte % zur Kontrolle, Mittelwerte ± Standardabweichung. 1-Wege-ANOVA Kontrolle vs. k-NP-Konzentration.

	1 µg/ml	5 µg/ml	10 µg/ml	20 µg/ml	50 µg/ml
24 h	117,2 ± 16,6	108,2 ± 10,7	118,7 ± 11,4	113,5 ± 9,2	106,5 ± 9,4
	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05
72 h	120,8 ± 18,0	123,2 ± 18,8	128,0 ± 15,9	110,7 ± 23,7	89,5 ± 15,5
	p<0,05	p<0,05	p<0,01	p>0,05	p>0,05

B4: 2-Wege-ANOVA (Kontrolle+Minozyklin).

2-Wege-ANOVA		
	F-Wert	p-Wert
Interaktion	0,3207	0,8956
Behandlung	4,240	0,0066
Zeit	1,972	0,1731

B5: Werte Kontrolle+Minozyklin % zur Kontrolle, ansonsten Werte % zur Kontrolle+Minozyklin, Mittelwerte ± Standardabweichung. Bonferroni Post-Hoc Test Kontrolle vs. k-NP-Konzentration.

	Kontrolle +Minozyklin	1 µg/ml	5 µg/ml	10 µg/ml	20 µg/ml	50 µg/ml
24 h	94,8 ± 9,4	93,0 ± 5,6	86,4 ± 9,5	88,2 ± 7,8	84,3 ± 9,8	82,7 ± 13,5
	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05
72 h	89,1 ± 10,3	92,0 ± 11,1	84,3 ± 9,6	79,1 ± 9,5	80,2 ± 5,8	71,8 ± 10,3
	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,01

Viabilitätstest gliareiche cerebellare Mischkulturen mit k-NPs:

B6: 2-Wege-ANOVA (Kontrolle+Minozyklin).

2-Wege-ANOVA		
	F-Wert	p-Wert
Interaktion	0,8211	0,5468
Behandlung	29,22	<0,0001
Zeit	10,29	0,0038

B7: Werte % zur Kontrolle+Minozyklin, Mittelwerte ± Standardabweichung. Bonferroni Post-Hoc Test Kontrolle+Minozyklin vs. k-NP-Konzentration.

	<i>Kontrolle</i> <i>+Minozyklin</i>	<i>1 µg/ml</i>	<i>5 µg/ml</i>	<i>10 µg/ml</i>	<i>20 µg/ml</i>	<i>50 µg/ml</i>
24 h	116,0 ± 20,7	70,6 ± 13,4	50,2 ± 11,6	55,3 ± 5,8	54,9 ± 8,1	50,0 ± 4,9
	p>0,05	p<0,01	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001
72 h	101,2 ± 11,9	60,4 ± 14,5	46,5 ± 4,6	39,3 ± 4,3	37,7 ± 6,2	32,9 ± 6,7
	p>0,05	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001

Viabilitätstest Schwanzzell-Kulturen mit k-NPs:

B8: 2-Wege-ANOVA (Kontrolle).

<i>2-Wege-ANOVA</i>		
	<i>F-Wert</i>	<i>p-Wert</i>
<i>Interaktion</i>	0,2969	0,9098
<i>Behandlung</i>	28,75	<0,0001
<i>Zeit</i>	0,00715	0,9333

B9: Werte % zur Kontrolle, Mittelwerte ± Standardabweichung. Bonferroni Post-Hoc Test Kontrolle vs. k-NP-Konzentration.

	<i>1 µg/ml</i>	<i>5 µg/ml</i>	<i>10 µg/ml</i>	<i>20 µg/ml</i>	<i>50 µg/ml</i>
24 h	66,3 ± 7,9	60,5 ± 5,2	51,8 ± 5,9	43,0 ± 5,1	38,7 ± 4,2
	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001
72 h	61,0 ± 8,1	57,8 ± 7,7	51,5 ± 13,0	46,0 ± 10,8	45,7 ± 7,3
	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001

Viabilitätstest neuronenangereicherte cerebellare Mischkulturen inkubiert mit PEI-NPs:

B10: 2-Wege-ANOVA (Kontrolle+Minozyklin).

<i>2-Wege-ANOVA</i>		
	<i>F-Wert</i>	<i>p-Wert</i>
<i>Interaktion</i>	1,444	0,2449
<i>Behandlung</i>	5,474	0,0017
<i>Zeit</i>	8,483	0,0076

B11: Werte % zur Kontrolle+Minozyklin, Mittelwerte ± Standardabweichung. Bonferroni Post-Hoc Test Kontrolle vs. PEI-NP-Konzentration.

	<i>Kontrolle</i> <i>+Minozyklin</i>	<i>1 µg/ml</i>	<i>5 µg/ml</i>	<i>10 µg/ml</i>	<i>20 µg/ml</i>	<i>50 µg/ml</i>
24 h	94,8 ± 9,4	87,4 ± 11,8	101,3 ± 11,9	86,4 ± 8,9	88,9 ± 8,4	77,4 ± 9,9
	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p<0,05
72 h	89,1 ± 10,2	99,1 ± 9,9	86,3 ± 11,4	85,7 ± 9,0	71,9 ± 9,0	65,2 ± 12,7
	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p<0,05	p<0,01

Viabilitätstest gliareicher cerebellare Mischkulturen mit PEI-NPs:

B12: 2-Wege-ANOVA (Kontrolle+Minozyklin).

<i>2-Wege-ANOVA</i>		
	<i>F-Wert</i>	<i>p-Wert</i>
<i>Interaktion</i>	0,3463	0,8795
<i>Behandlung</i>	17,51	<0,0001
<i>Zeit</i>	21,56	0,0001

B13: Werte % zur Kontrolle+Minozyklin, Mittelwerte ± Standardabweichung. Bonferroni Post-Hoc Test Kontrolle vs. PEI-NP-Konzentration.

	<i>Kontrolle</i>	<i>1 µg/ml</i>	<i>5 µg/ml</i>	<i>10 µg/ml</i>	<i>20 µg/ml</i>	<i>50 µg/ml</i>
	<i>+Minozyklin</i>					
24 h	116,0 ± 20,7	99,7 ± 22,5	92,8 ± 15,2	77,4 ± 7,8	62,2 ± 7,5	55,3 ± 12,8
	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p<0,01	p<0,001
72 h	101,2 ± 11,9	96,4 ± 12,1	81,7 ± 7,8	66,9 ± 14,7	49,0 ± 7,5	29,6 ± 5,9
	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p<0,05	p<0,001	p<0,001

Viabilitätstest Schwanzzell-Kulturen mit PEI-NPs:

B14: 2-Wege-ANOVA (Kontrolle).

<i>2-Wege-ANOVA</i>		
	<i>F-Wert</i>	<i>p-Wert</i>
<i>Interaktion</i>	0,7588	0,5882
<i>Behandlung</i>	0,6561	0,6599
<i>Zeit</i>	6,911	0,0147

B15: Werte % zur Kontrolle, Mittelwerte ± Standardabweichung. Bonferroni Post-Hoc Test Kontrolle vs. PEI-NP-Konzentration.

	<i>1 µg/ml</i>	<i>5 µg/ml</i>	<i>10 µg/ml</i>	<i>20 µg/ml</i>	<i>50 µg/ml</i>
24 h	92,3 ± 12,3	83,4 ± 7,6 p>0,05	88,8 ± 11,1 p>0,05	85,3 ± 10,2 p>0,05	81,5 ± 7,8 p>0,05
	p>0,05				
72 h	103,7 ± 19,4 p>0,05	101,5 ± 9,3 p>0,05	88,9 ± 14,0 p>0,05	103,2 ± 9,6 p>0,05	101,0 ± 14,4 p>0,05

Quantifizierung Zellzahl und zellspezifische Aufnahmehäufigkeit von k-NPs in cerebellaren Mischkulturen und Schwanzzell-Kulturen:

B16: Mittelwerte ± Standardabweichung. T-Test Kontrolle vs. k-NPs.

<i>t-Test</i>			
	<i>Kontrolle</i>	<i>k-NPs</i>	<i>p-Wert</i>
<i>Granularzellen</i>	17,7 ± 7,7	16,5 ± 9,9	0,6908
<i>Astroglia</i>	67,8 ± 13,3	67,7 ± 8,1	0,9811
<i>Mikroglia</i>	35,4 ± 12,5	43,2 ± 11,3	0,0464
<i>Oligodendroglia</i>	6,9 ± 4,8	5,9 ± 4,4	0,5156
<i>Schwanzzellen</i>	61,9 ± 14,8	44,8 ± 24,7	0,0116
<i>Fibroblasten</i>	61,4 ± 19,5	73,5 ± 19,3	0,0541

Quantifizierung organotypische Rückenmarkskulturen mit 50 µg/ml k-NPs:

B17: Mittelwerte ± Standardabweichung. T-Test Kontrolle vs. k-NPs.

<i>t-Test</i>			
	<i>Kontrolle</i>	<i>k-NPs</i>	<i>p-Wert</i>
<i>Überlebende Motorneurone</i>	58,9 ± 12,6	55,9 ± 11,3	0,4156
<i>Gesamtzahl überlebender Neurone</i>	91,0 ± 35,1	83,4 ± 28,3	0,1173
<i>Prozentuale Fläche Neurofilamente</i>	4,3 ± 2,8	5,0 ± 2,0	0,3045
<i>Prozentuale Fläche Mikroglia</i>	13,0 ± 3,7	14,6 ± 2,4	0,3715
<i>Prozentuale Fläche Astroglia</i>	24,9 ± 3,6	22,2 ± 1,9	0,0599
<i>Prozentuale Fläche DAPI</i>	18,7 ± 3,8	18,1 ± 5,8	0,6677

Stabilität der Funktionalisierung GDNF-PEI-NPs:

B18: 1-Wege-ANOVA Faktor Behandlung.

1-Wege-ANOVA

	<i>F-Wert</i>	<i>p-Wert</i>
<i>Überlebende Motorneurone</i>	3,760	0,0273
<i>Gesamtzahl überlebender Neurone</i>	3,007	0,0545

B19: Überlebende Motorneurone Mittelwerte ± Standardabweichung (grau unterlegt). Bonferroni Post-Hoc Test linke Spalte vs. obere Zeile.

	<i>Kontrolle100</i>	<i>Kontrolle50</i>	<i>Überstand GDNF-PEI-NPs</i>	<i>Resuspendierte GDNF-PEI-NPs</i>
<i>Kontrolle100</i>	56,8 ± 15,8	-	-	-
<i>Kontrolle50</i>	p>0,05	66,3 ± 25,3	-	-
<i>Überstand GDNF-PEI-NPs</i>	p>0,05	p>0,05	59,2 ± 31,3	-
<i>Resuspendierte GDNF-PEI-NPs</i>	p>0,05	P<0,05	p>0,05	26,0 ± 12,8

B20: Überlebende Neurone Mittelwerte ± Standardabweichung (grau unterlegt). Bonferroni Post-Hoc Test linke Spalte vs. obere Zeile.

	<i>Kontrolle100</i>	<i>Kontrolle50</i>	<i>Überstand GDNF-PEI-NPs</i>	<i>Resuspendierte GDNF-PEI-NPs</i>
<i>Kontrolle100</i>	66,7 ± 22,3	-	-	-
<i>Kontrolle50</i>	p>0,05	74,7 ± 27,8	-	-
<i>Überstand GDNF-PEI-NPs</i>	p>0,05	p>0,05	68,0 ± 34,6	-
<i>Resuspendierte GDNF-PEI-NPs</i>	p>0,05	P>0,05	p>0,05	33,8 ± 14,6

Anwendung GDNF-PEI-NPs an organotypischen Rückenmarkskulturen:

B21: 1-Wege-ANOVA Faktor Behandlung.

1-Wege-ANOVA

	<i>F-Wert</i>	<i>p-Wert</i>
<i>Überlebende Motorneurone</i>	3,647	0,0212
<i>Gesamtzahl überlebender Neurone</i>	4,068	0,0136
<i>Prozentuale Fläche Neurofilamente</i>	2,188	0,1058

B22: Überlebende Motorneurone Mittelwerte ± Standardabweichung (grau unterlegt). Bonferroni Post-Hoc Test linke Spalte vs. obere Zeile.

	<i>Kontrolle100</i>	<i>Kontrolle50</i>	<i>Negativkontrolle</i>	<i>GDNF-PEI-NPs</i>
<i>Kontrolle100</i>	48,6 ± 40,2	-	-	-
<i>Kontrolle50</i>	p>0,05	44,5 ± 29,3	-	-
<i>Negativkontrolle</i>	P<0,05	p>0,05	9,0 ± 13,4	-
<i>GDNF-PEI-NPs</i>	p>0,05	p>0,05	p>0,05	29,0 ± 24,9

B23: Überlebende Neurone Mittelwerte ± Standardabweichung (grau unterlegt). Bonferroni Post-Hoc Test linke Spalte vs. obere Zeile.

	<i>Kontrolle100</i>	<i>Kontrolle50</i>	<i>Negativkontrolle</i>	<i>GDNF-PEI-NPs</i>
<i>Kontrolle100</i>	65,8 ± 54,0	-	-	-
<i>Kontrolle50</i>	p>0,05	57,1 ± 38,9	-	-
<i>Negativkontrolle</i>	P<0,05	p>0,05	12,0 ± 14,1	-
<i>GDNF-PEI-NPs</i>	p>0,05	p>0,05	p>0,05	34,3 ± 27,8

B24: Prozentuale Fläche Neurofilamente Mittelwerte ± Standardabweichung (grau unterlegt). Bonferroni Post-Hoc Test linke Spalte vs. obere Zeile.

	<i>Kontrolle100</i>	<i>Kontrolle50</i>	<i>Negativkontrolle</i>	<i>GDNF-PEI-NPs</i>
<i>Kontrolle100</i>	12,6 ± 17,2	-	-	-
<i>Kontrolle50</i>	p>0,05	10,7 ± 15,8	-	-
<i>Negativkontrolle</i>	P>0,05	p>0,05	2,1 ± 4,1	-
<i>GDNF-PEI-NPs</i>	p>0,05	p>0,05	p>0,05	2,1 ± 3,0

B25: Einfluss Magnetfeld auf GDNF-PEI-NP inkubierte Rückenmarkskulturen. Mittelwerte ± Standardabweichung. T-Test MF- vs. MF+.

<i>t-Test</i>	<i>GDNF-PEI-NPs-MF</i>	<i>GDNF-PEI-NPs +MF</i>	<i>p-Wert</i>
<i>Überlebende Motorneurone</i>	29,0 ± 24,9	36,1 ± 31,1	0,5292
<i>Gesamtzahl überlebender Neurone</i>	34,3 ± 27,8	41,6 ± 35,2	0,5534
<i>Prozentuale Fläche Neurofilamente</i>	1,3 ± 1,5	1,6 ± 2,6	0,2501

Inkubation organotypischer Rückenmarkskulturen mit Minozyklin:

B26: Mittelwerte ± Standardabweichung. T-Test Kontrolle vs. 10 µM.

<i>t-Test</i>		<i>Kontrolle</i>	<i>10 µM Minozyklin</i>	<i>p-Wert</i>
<i>Ab DIV 1</i>	<i>Überlebende Motorneurone</i>	38,8 ± 7,9	31,2 ± 9,6	0,0459
	<i>Gesamtzahl überlebender Neurone</i>	50,5 ± 12,3	43,1 ± 12,8	0,0213
	<i>Prozentuale Fläche Neurofilamente</i>	3,1 ± 1,0	2,3 ± 0,4	0,1701
	<i>Prozentuale Fläche Mikroglia</i>	16,1 ± 6,7	11,2 ± 5,4	0,1587
	<i>Prozentuale Fläche Astroglia</i>	30,4 ± 3,1	32,0 ± 3,7	0,2592
	<i>Prozentuale Fläche DAPI</i>	26,3 ± 2,9	25,4 ± 3,8	0,2403
<i>Ab DIV 4</i>	<i>Überlebende Motorneurone</i>	31,2 ± 20,2	34,9 ± 12,1	0,5442
	<i>Gesamtzahl überlebender Neurone</i>	46,2 ± 26,6	58,5 ± 23,5	0,2010
	<i>Prozentuale Fläche Neurofilamente</i>	3,3 ± 3,3	2,96 ± 1,8	0,7231
	<i>Prozentuale Fläche Mikroglia</i>	6,0 ± 1,9	5,8 ± 3,0	0,9044
	<i>Prozentuale Fläche Astroglia</i>	23,5 ± 4,3	27,7 ± 5,8	0,1184
	<i>Prozentuale Fläche DAPI</i>	14,6 ± 5,6	17,7 ± 5,1	0,0071

B27: Mittelwerte ± Standardabweichung. T-Test Kontrolle vs. 100 µM.

<i>t-Test</i>		<i>Kontrolle</i>	<i>100 µM Minozyklin</i>	<i>p-Wert</i>
<i>Ab DIV 1</i>	<i>Überlebende Motorneurone</i>	19,4 ± 10,2	2,4 ± 2,6	<0,0001
	<i>Gesamtzahl überlebender Neurone</i>	31,0 ± 14,6	13,6 ± 7,4	<0,0001
	<i>NeuN-gefärbte Neurone</i>	824,9 ± 493,3	198,6 ± 48,3	0,0230
	<i>Prozentuale Fläche Neurofilamente</i>	1,0 ± 1,1	14,1 ± 7,1	<0,0001
	<i>Prozentuale Fläche Mikroglia</i>	25,0 ± 7,3	0,0 ± 0,0	<0,0001
	<i>Prozentuale Fläche Astroglia</i>	28,4 ± 4,4	33,4 ± 5,2	0,1845
	<i>Prozentuale Fläche DAPI</i>	19,2 ± 3,7	9,8 ± 5,2	<0,0001
<i>Ab DIV 4</i>	<i>Überlebende Motorneurone</i>	36,5 ± 12,9	21,7 ± 8,7	<0,0001
	<i>Gesamtzahl überlebender Neurone</i>	48,8 ± 17,6	28,1 ± 10,1	<0,0001
	<i>NeuN-gefärbte Neurone</i>	785,2 ± 703,4	278,6 ± 269,5	0,0410
	<i>Prozentuale Fläche Neurofilamente</i>	2,7 ± 1,6	2,5 ± 1,5	0,5844
	<i>Prozentuale Fläche Mikroglia</i>	19,9 ± 3,5	1,6 ± 0,5	<0,0001
	<i>Prozentuale Fläche Astroglia</i>	28,5 ± 7,3	20,9 ± 7,7	0,0064
	<i>Prozentuale Fläche DAPI</i>	21,1 ± 3,6	13,2 ± 2,3	0,0006

B28: Mittelwerte ± Standardabweichung. Zeitreihe 100 µM Minozyklin, T-Test Kontrolle vs. 100 µM.

<i>t-Test</i>		<i>Kontrolle</i>	<i>100 µM Minozyklin</i>	<i>p-Wert</i>
Ab DIV 1	Überlebende Motorneurone	19,4 ± 10,2	2,4 ± 2,6	<0,0001
	Gesamtzahl überlebender Neurone	31,0 ± 14,6	13,6 ± 7,4	<0,0001
	Prozentuale Fläche Neurofilamente	1,0 ± 1,1	14,1 ± 7,1	<0,0001
Ab DIV 3	Überlebende Motorneurone	19,5 ± 14,6	3,6 ± 5,9	0,0067
	Gesamtzahl überlebender Neurone	29,6 ± 18,3	7,5 ± 8,0	0,0008
	Prozentuale Fläche Neurofilamente	2,9 ± 2,8	8,2 ± 3,3	0,0002
Ab DIV 4	Überlebende Motorneurone	36,5 ± 12,9	21,7 ± 8,7	<0,0001
	Gesamtzahl überlebender Neurone	48,8 ± 17,6	28,1 ± 10,1	<0,0001
	Prozentuale Fläche Neurofilamente	2,7 ± 1,6	2,5 ± 1,5	0,5844
Ab DIV 6	Überlebende Motorneurone	47,8 ± 21,3	47,1 ± 15,1	0,9366
	Gesamtzahl überlebender Neurone	54,0 ± 19,6	54,7 ± 14,5	0,9218
	Prozentuale Fläche Neurofilamente	2,0 ± 1,1	1,7 ± 1,1	0,4424

Inkubation organotypischer Ko-Kulturen mit Minozyklin:

B29: Mittelwerte ± Standardabweichung. T-Test Kontrolle vs. 100 µM.

<i>t-Test</i>		<i>Kontrolle</i>	<i>100 µM Minozyklin</i>	<i>p-Wert</i>
Ab DIV 1	Überlebende Motorneurone	35,3 ± 13,6	2,6 ± 3,1	0,0016
	Gesamtzahl überlebender Neurone	52,9 ± 10,6	18,0 ± 4,7	0,0001
	Prozentuale Fläche Neurofilamente	1,2 ± 0,7	13,1 ± 3,2	0,0001
	Prozentuale Fläche Astroglia	28,7 ± 13,1	29,7 ± 14,8	0,4484
Ab DIV 4	Überlebende Motorneurone	55,6 ± 19,5	30,3 ± 13,6	0,0063
	Gesamtzahl überlebender Neurone	71,4 ± 26,4	38,8 ± 14,8	0,0038
	Prozentuale Fläche Neurofilamente	2,9 ± 2,4	3,9 ± 2,4	0,2616
	Prozentuale Fläche Astroglia	36,8 ± 7,9	33,7 ± 8,9	0,0635

Viabilitätstest kortikale gliareiche Mischkulturen mit Minozyklin:

B30: 2-Wege-ANOVA.

<i>2-Wege-ANOVA</i>	<i>F-Wert</i>	<i>p-Wert</i>
Interaktion	18,18	<0,0001
Behandlung	15,84	<0,0001
Zeit	284,5	<0,0001

B31: Werte % zur Kontrolle, Mittelwerte ± Standardabweichung. Bonferroni Post-Hoc Test Kontrolle vs. k-Minozyklin-Konzentration.

	<i>25 µM</i>	<i>50 µM</i>	<i>75 µM</i>	<i>100 µM</i>	<i>125 µM</i>
24 h	107,1 ± 1,7	110,5 ± 2,5	107,9 ± 2,3	111,3 ± 8,8	115,2 ± 1,6
	p>0,05	p<0,01	p<0,005	p<0,001	p<0,001
72 h	91,2 ± 1,7	88,2 ± 1,1	85,0 ± 2,2	79,8 ± 4,3	80,4 ± 5,1
	p<0,005	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001
7 Tage	90,0 ± 1,6	85,3 ± 1,6	81,8 ± 2,5	76,3 ± 0,7	69,2 ± 0,8
	p<0,01	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001

Wundheilungstest kortikale gliareiche Mischkulturen:

B32: 2-Wege-ANOVA.

2-Wege-ANOVA		
ANOVA	F-Wert	p-Wert
Interaktion	0,14	0,8734
Behandlung	10,03	0,0021
Zeit	102,10	<0.0001

B33: Wundheilungstest kortikale gliareiche Mischkulturen. % Distanz der Wundränder zu Zeitpunkt 0, Mittelwerte \pm Standardabweichung. T-Test Kontrolle vs. 100 μ M Minozyklin.

t-Test	Kontrolle	100 μM Minozyklin	p-Wert
24 h	79,7 \pm 6,6	87,5 \pm 5,1	0,0029
48 h	47,5 \pm 21,6	59,0 \pm 9,6	0,0563
72 h	26,5 \pm 22,1	35,8 \pm 16,6	0,0305

Proteinexpression kortikale gliareiche Mischkulturen:

B34: Aktin-Expression kortikale gliareiche Mischkulturen. Ratio zu GAPDH-Expression, Mittelwerte \pm Standardabweichung. T-Test Kontrolle vs. 100 μ M Minozyklin.

t-Test	Kontrolle	100 μM Minozyklin	p-Wert
Aktin	0,7 \pm 0,2	0,8 \pm 0,3	0,7285
Cx43	1,3 \pm 1,0	2,8 \pm 1,2	0,0445

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich die Gelegenheit nutzen und all jenen Menschen zu danken, die zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben:

Als erstes möchte meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Gerburg Keilhoff danken. Sie gab mir mit der Etablierung der Rückenmarkskulturen und der Bearbeitung des MARVENE-Projektes eine Herausforderung, die ich gerne annahm. Ich danke Ihnen vor allem auch dafür, dass ich viel eigenverantwortlich und selbstständig arbeiten durfte und trotzdem immer auf ihre Hilfe zählen konnte. Auch für Ihre Geduld, Ihre konstruktiven Ratschläge und Hinweise und natürlich die zahlreichen Korrekturen in Publikationen und dieser Arbeit möchte ich Ihnen danken. Ich weiß, dass gerade die Korrekturen für uns beide manchmal eine Prüfung waren. Ich danke Ihnen, dass Sie diesen steinigen Weg mit mir gegangen sind und bin mir sicher, dass mir mein erworbenes Wissen und meine Erfahrungen auf meinem zukünftigen Weg oft weiterhelfen werden.

Prof. Dr. Klaus-Dieter Fischer gebührt mein Dank für die Möglichkeit, an seinem Institut (Institut für Biochemie und Zellbiologie) meine Experimente durchführen zu können und meine Dissertation schreiben zu dürfen.

Auch wenn sie es nie lesen werden, möchte ich an dieser Stelle auch all den Menschen danken, die ich im Rahmen des MARVENE-Projektes kennenlernen durfte. Es war nicht immer einfach mit ihnen zu arbeiten und die disziplinären Wissensgrenzen zu überschreiten, aber wir haben uns durchgeboxt und das Projekt zu einem guten Abschluss geführt. Besonders den Jungwissenschaftlern Clare Hoskins, Pilar Catalayud und Cristina Riggio möchte ich für ihre Gesellschaft und Freundschaft während unserer wechselseitigen Laboraustausche danken!

Ein großes Dankeschön geht natürlich auch an Frau Leona Bück, die mich, gerade in der ersten Zeit, unter ihre Fittiche genommen hat und mich in das Feld der Zellkulturen und der Immunzytochemie eingewiesen hat. Leona, ich danke dir für deine Ratschläge, Hinweise, Hilfe und Ermutigungen! Auch von dir habe ich vieles gelernt.

Ein weiteres großes DANKE geht natürlich an die Mitarbeiter des Institutes für Biochemie und Zellbiologie! Eure freundliche Aufnahme, eure Hilfsbereitschaft, eure Lebenswürdigkeit und natürlich all die geselligen Anlässe werden mir stets in sehr guter Erinnerung bleiben. Besonders hervorheben möchte ich Julia Czerney und Beate Zörner, bei denen ich immer auf der Suche nach Hilfe aufschlagen konnte. Auch Dr. Karin

Richter, Dr. Kristina Langnäse, Dr. Peter Kreutzmann und Prof. Dr. Mario Engelmann möchte ich für all die offenen Ohren, zahlreichen Ratschläge, moralische Unterstützungen und netten Gespräche danken. Nicht unerwähnt sollten bleiben: Andrea Mohrmann, die mich gerade in der letzten Phase immer mal abgelenkt hat und so verhinderte, das mein Kopf platzte; Kathleen Zocher, die mit ihrer erfrischenden, freundlichen Art mir immer ein Lächeln auf die Lippen zauberte; Kerstin Schilling, die mit mir einen Teil ihrer Erfahrungen geteilt und mir Mut gemacht hat; und natürlich allen TAs Heike Baumann, Rita Murau, Regina Dobrowolny, Irmgard Leschka, Karla Klingenberg und Gudrun Schmidt, die alle immer da waren, wenn man Hilfe oder Ablenkung suchte.

Nadine Sündermann, Anna Fiedler, Julia Noack, Micha Steiner und Judith Camats möchte ich für ihre nette Gesellschaft im Büro danken, auch wenn es bei einigen nur für eine kurze Zeit war. Ihr habt mir gezeigt, dass man sich als Doktorand nicht immer nur im Labor verkriechen sollte.

Meinen Freundinnen Julia Noack, Anne Gieseler, Judith Camats und Susi Bonifatius möchte ich für ihre Freundschaft und Unterstützung ganz besonders danken. Ihr habt mir oft Mut gemacht, wenn ich ihn nicht mehr hatte und immer zugehört. Ich möchte euch nicht mehr missen und hoffe ihr bleibt noch ganz lange ein Teil meines Lebens!

Susi Bonifatius möchte ich zusätzlich für ihre Unterstützung bei meinen Experimenten danken. Du warst eine tolle TA und ich danke dir, dass du mir die Sicherheit gegeben hast aus der Laborarbeit auszusteigen. Ohne dich wäre Oscar vielleicht noch nicht auf der Welt und das wäre unendlich schade.

Als letzten, aber wichtigsten Punkt möchte ich meiner Familie danken, die mich immer seelisch, moralisch und auch finanziell unterstützt hat und mir mein Studium und letztendlich auch diese Dissertation erst möglich gemacht hat. DANKE! Mit dieser Arbeit beginne ich die dritte Generation unserer Familie, die einen Dr. erwirbt und hoffe, dass ich nicht die letzte bin. Ich denke, Opa wäre stolz.

Und natürlich vergesse ich nicht meine beiden Männer: Danke Jürgen für deine jahrelange Unterstützung, fürs Zuhören, Mutmachen und für dein Verständnis, wenn ich lernen oder ins Labor musste. Und danke für unseren großartigen Sohn Oscar! Und Oscar, dir danke ich dafür, dass du nicht ein „Selbstläufer“ bist, sondern ein sensibles, freundliches, wissbegieriges und manchmal bockiges, aber total süßes Kind. Ich hätte viel verpasst, wenn du mich nicht gefordert hättest.

Curriculum vitae

Persönliche Daten

Name	Josephine Pinkernelle
Geburtsdatum	14.06.1983
Geburtsort	Magdeburg
Staatsangehörigkeit	deutsch
Adresse	Wilhelm-Niemann-Str. 13, 39112 Magdeburg
Email	pinkernelle.j@gmail.com

Schulische und Akademische Ausbildung

1990 – 2003	Grundschule in Magdeburg und Gymnasium in Wanzleben
2003 – 2005	Grundstudium der Biologie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Abschluss: Vordiplom
2005 – 2008	Hauptstudium der Neurobiologie an der Otto-von-Guericke Universität Magdeburg, Abschluss: Diplom
2007 – 2008	Diplomarbeit am Institut für Biologie der Otto-von-Guericke Universität Magdeburg Thema: Einfluss früher Stresserfahrung auf die Verhaltensentwicklung bei Degus (<i>Octodon degus</i>): Quantitative Verhaltensanalyse und funktionelle Bildgebung
2009	wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Biologie der Otto-von-Guericke Universität Magdeburg
2009 – 2014	wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Biochemie und Zellbiologie der Otto-von-Guericke Universität Magdeburg

Publikationen

- 07/2014 Keilhoff G, Lucas B, Pinkernelle J, Steiner M, Fansa H. Effects of cerebrolysin on motor-neuron-like NSC-34 cells. *Exp Cell Res.* In press.
- 02/2014 Lucas B, Pinkernelle J, Fansa H, Keilhoff G.
Effects of cerebrolysin on rat Schwann cells in vitro. *Acta histochem*, 2014, 116 :820-830.
- 08/2013 Pinkernelle J, Fansa H, Ebmeyer U, Keilhoff G.
Prolonged minocycline treatment impairs motor neuronal survival and glial function in organotypic rat spinal cord cultures. *PLoS ONE* 8(8): e73422. doi:10.1371/journal.pone.0073422.
- 05/2013 Calatayud MP, Riggio C, Raffa V, Sanz B, Torres TE, Ibarra MR, Hoskins C, Cuschieri A, Wang L, Pinkernelle J, Keilhoff G, Goya GF.
Neuronal cells loaded with PEI-coated Fe₃O₄ nanoparticles for magnetically guided nerve regeneration. *J Mater Chem* 2013, 1:3607-3616.
- 06/2012 Riggio C, Calatayud MP, Hoskins C, Pinkernelle J, Sanz B, Torres TE, Ibarra MR, Wang L, Keilhoff G, Goya GF, Raffa V, Cuschieri A.
Poly-l-lysine-coated magnetic nanoparticles as intracellular actuators for neural guidance. *Int J Nanomedicine*. 2012; 7: 3155–3166.
- 03/2012 Pinkernelle J, Calatayud P, Goya GF, Fansa H, Keilhoff G.
Magnetic nanoparticles in primary neural cell cultures are mainly taken up by microglia. *BMC Neuroscience* 2012, 13:32 <http://www.biomedcentral.com/1471-2202/13/32>
- 03/ 2009 Pinkernelle J, Abraham A, Seidel K, Braun K.
Paternal deprivation induces dendritic and synaptic changes and hemispheric asymmetry of pyramidal neurons in the somatosensory cortex. *Dev Neurobiol*. 2009,1:663-73.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die von mir eingereichte Dissertation zu dem Thema

„Etablierung eines *in vitro*-Modells zur Untersuchung der Regeneration spinaler Motorneurone und ihrer Axone nach Axotomie und Neurodegeneration“

selbstständig verfasst, nicht schon als Dissertation verwendet und alle verwendeten Hilfsmittel und Quellen vollständig angegeben habe.

Weiterhin erkläre ich, dass ich weder diese noch eine andere Arbeit zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.) an anderen Einrichtungen eingereicht habe.

Magdeburg, den 23.07.2014