

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Neuroanatomie

Prof. Dr. Dr. Barbara Braunger

**Untersuchung der Astrozytenaktivierung in einem *in vitro*-Modell für
Hirntrauma**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von:

Lisanne Bongarts
aus Hamburg

Hamburg 2024

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 12.12.2024**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Julia Neumann

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Roland Bender

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

1. Abkürzungsverzeichnis	6
2. Abbildungsverzeichnis	8
3. Einleitung	9
3.1. Hintergrund der Studie.....	9
3.2. Hippocampus.....	11
3.3. Astrozyten	13
3.4. GFAP.....	14
3.5. Östrogene	15
3.6. Propidiumiodid.....	16
3.5. Ziele der Arbeit	17
4. Material	19
4.1. Chemikalien	19
4.2. Antikörper	20
4.3. Technische und Labormedizinische Hilfsmittel	21
4.4. Software	23
4.5. Kulturmedien und Lösungen.....	23
5. Methoden	27
5.1. Tiere	27
5.2. Präparation der Gewebekulturen.....	27
5.3. Mechanische Schädigung durch die <i>rolling-cylinder</i> Technik (<i>in vitro</i> -TBI)	30
5.4. Western Blot.....	32
5.4.1 Lyse und Zentrifugation.....	32
5.4.2 Proteinmengenbestimmungen nach Bradford.....	32
5.4.3 <i>Sodium Dodecyl Sulfate – PolyAcrylamid Gel Elektrophoresis</i> (SDS-PAGE)	33
5.4.4 <i>Blotting</i>	34
5.4.5 Entwicklung	35
5.4.6 Auswertung	35
5.5. Immunhistochemie	36
5.5.1 Fixierung und Einfrieren der Gewebekulturen	36
5.5.2 Gefrierschnitte.....	36
5.5.3 Immunhistochemisches Verfahren.....	37
5.5.4 Mikroskopie und Aufnahmen der Gewebekulturen.....	38
5.6. Auswertung	38
5.7. Statistische Analyse.....	39
6. Ergebnisse	40

6.1. Nachweis der hippocampalen GFAP Expression nach <i>in vitro</i> -TBI mit dem Western Blot-Verfahren.....	40
6.2. Histochemische Darstellung der PI-Aufnahme und der GFAP-Expression in CA1.....	42
6.3. Bestimmung der Zell-Viabilität nach <i>in vitro</i> -TBI in der CA1 Region	44
6.4. Bestimmung der GFAP-Intensität als Indikator für Astrozytenaktivierung	47
6.5. Korrelieren die GFAP-Intensität und die PI-Aufnahme nach <i>in vitro</i> -TBI in der CA1 Region?.....	50
7. Diskussion	57
7.1. GFAP-Expression nach <i>in vitro</i> -TBI als Indikator der Astrozytenaktivierung.....	58
7.2. Die Wirkung von E2 auf Astrozyten nach <i>in vitro</i> -TBI.....	59
7.3. Geschlechtsunterschiede bei der Astrozytenaktivierung.....	60
7.4. Nutzen und Grenzen des <i>in vitro</i> -TBI Modells	62
7.5. Fazit.....	63
8. Zusammenfassung	64
8.1 Summary	65
9. Literaturverzeichnis	66
10. Erklärung des Eigenanteils	71
11. Danksagung	71
12. Lebenslauf	73

1. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
CA	Cornu ammonis
C°	Grad Celsius
µm	Mikrometer
µl	Mikroliter
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
Aqua dest.	Aqua destillata
BSA	<i>bovine serum albumin</i> (Rinderserumalbumin)
bzw.	beziehungsweise
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindol
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
E1	Estron
E3	Estriol
E4	Estetrol
E2	17β-Estradiol
EC	Entorhinaler Cortex
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
f	<i>female</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
GFAP	<i>Glial fibrillary acidic protein</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GPER	<i>G-protein-coupled estrogen receptor</i>
h	lat. Hora (Stunde)
HCl	Salzsäure, Chlorwasserstoff
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
NaOH	Natriumhydroxid
NGS	<i>Normal goat serum</i>
l	Liter
M	Molar
m	<i>male</i>
min	Minute

ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mg	Milligramm
NP40	Nonidet P-40 Octylphenoxypolyethoxyethanol
<i>in vitro</i>	im Glas
<i>in vivo</i>	im Lebenden
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
OT	Objektträger
pH	Pondus hydrogenii
P7	7. Tag postnatal
P8	8. Tag postnatal
PFA	Paraformaldehyd
PI	Propidiumiodid
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SHT	Schädelhirntrauma
SLM	Stratum lacunosum-moleculare
SP	Stratum pyramidale
SR	Stratum radiatum
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TBI	<i>Traumatic Brain Injury</i>
UKE	Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf
ZNS	Zentrales Nervensystem

2. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Transversaler Querschnitt durch den Hippocampus (Maus) mit Darstellung der Schichtengliederung und Aufzeichnung wichtiger axonaler Verbindungswege..	12
Abbildung 2: Präparation und experimentelle Zuordnung der hippocampalen Gewebeproben.	29
Abbildung 3: Durchführung der mechanischen Schädigung nach der rolling-cylinder Technik.	31
Abbildung 4: A) Repräsentative Western Blot Banden für GFAP (48 kDa) und die Ladungskontrolle GAPDH (38 kDa). B) Grafische Darstellung und statistische Auswertung der GFAP-Expression in hippocampalen Kulturen 24 h nach in vitro-TBI, analysiert mithilfe des Western Blot Verfahrens.	41
Abbildung 5: Ausschnitt aus einer hippocampalen Gewebekultur (P7/DIV15) mit der CA1-Region und dem Gyrus dentatus (GD).	42
Abbildung 6: Exemplarische Darstellung einer Übersichtsaufnahme der Resultate eines Kultur-Triplets auf einem Objektträger zum Nachweis von Astrozytenaktivität und Zelltod in der CA1-Region von hippocampalen Gewebekulturen.	43
Abbildung 7: Grafische Darstellung und statistische Auswertung der PI positiven Zellen im Stratum pyramidale (SP) 24h (A) und 48h (B) nach in vitro TBI.	45
Abbildung 8: Grafische Darstellung und statistische Auswertung der PI positiven Zellen in den Strata radiatum und lacunosum-moleculare (SR/SLM) 24h (A) und 48h (B) nach in vitro TBI.	46
Abbildung 9: Grafische Darstellung und statistische Auswertung der GFAP-Intensität im Stratum pyramidale (SP) 24h (A) und 48h (B) nach in vitro TBI.	48
Abbildung 10: Grafische Darstellung und statistische Auswertung der GFAP-Intensität in den Strata radiatum und lacunosum-moleculare (SR/SLM) 24h (A) und 48h (B) nach in vitro TBI.	49
Abbildung 11: Grafische Darstellung und statistische Auswertung der Korrelation zwischen GFAP-Intensität und PI positiven Zellen in der CA1 Region für die TBI-Gruppe 24h nach in vitro TBI.	51
Abbildung 12: Grafische Darstellung und statistische Auswertung der Korrelation zwischen GFAP-Intensität und PI positiven Zellen in der CA1 Region für die TBI-Gruppe 48h nach in vitro TBI.	52
Abbildung 13: Grafische Darstellung und statistische Auswertung der Korrelation zwischen GFAP Intensität und PI positiven Zellen in der CA1 Region für die TBI+E2-Gruppe 24h nach in vitro TBI.	54
Abbildung 14: Grafische Darstellung und statistische Auswertung der Korrelation zwischen GFAP-Intensität und PI positiven Zellen in der CA1 Region für die TBI+E2-Gruppe 48h nach in vitro TBI.	55
Abbildung 15: Tabellarische Darstellung der Two-Way Anova Analyse für den Vergleich männlicher und weiblicher Kulturen.	56

3. Einleitung

3.1. Hintergrund der Studie

Ein Schädelhirntrauma (SHT; engl. *Traumatic brain injury*, TBI) ist eine Verletzung des Schädels mit struktureller Schädigung des Gehirns, gefolgt von Funktionsstörungen in den betroffenen Arealen. Epidemiologisch betrachtet liegt die Inzidenz des SHT in Deutschland bei 332/100 000 Einwohner, wobei die Mehrzahl der Fälle (ca. 90%) nach der *Glasgow Coma Scale* als „leicht“ und nur ca. 10% als „mittelschwer“ oder „schwer“ eingestuft werden (Rickels et al., 2022). Dennoch ist ein SHT die häufigste Todesursache bis zu einem Alter von 45 Jahren. Statistisch betrachtet liegt die innerklinische Mortalität bei 23,5 % (Hagebusch et al., 2020).

Pathophysiologisch lassen sich beim SHT eine primäre und sekundäre Schädigung unterscheiden. Bei der primären Schädigung kommt es durch die Einwirkung mechanischer Kräfte auf das Gehirn zu direkten Schäden an Neuronen (z. B. die Durchtrennung von Axonen) sowie zu intrakraniellen Blutungen aufgrund rupturierter Gefäße mit der Folge intrakranieller Drucksteigerung, Ödembildung und (mindestens lokaler) zerebraler Ischämie (Werner und Engelhardt, 2007). Von großer Bedeutung ist darüber hinaus die dabei erfolgende Eröffnung der Blut-Hirn-Schranke, wodurch Immunzellen aus dem Blut in das zuvor weitgehend vom peripheren Immunsystem abgeschottete Hirngewebe eindringen können. Im Zentrum der Verletzung führen die akute neuronale Schädigung und die begleitende Ischämie meist innerhalb von Minuten zu nekrotischem Zelltod. Die sekundären Schädigungen sind definiert als die Folgeerscheinungen der Primärschädigung. Da diese eine Störung der Homöostase im Hirngewebe bewirkt (z. B. durch exzessive Glutamatausschüttung, McGinn und Povlishock, 2016), werden biochemische Kaskaden auslöst (McIntosh et al., 1998), die zu pathologischen zellulären und metabolischen Veränderungen auch in der Umgebung des unmittelbar geschädigten Gewebes führen können und den primären Schaden dadurch noch verstärken. Diese Prozesse, zu denen auch die Aktivierung von Astrozyten und Mikrogliazellen gehören (Kettenmann et al., 2011; Gölz et al., 2019; Zwirner et al., 2021), sind noch weitgehend unverstanden.

Mortalität und Morbidität sowie kognitive und emotionale Beeinträchtigungen und neurodegenerative Erscheinungen stehen als führende Folgen mit dem Schädelhirntrauma in Verbindung (Fleminger, 2008, Mollayeva et al., 2017). Die derzeit angewendeten Therapien sind grundsätzlich symptomorientiert mit nur teilweiser Erfolgsquote (McConeghy et al.,

2012). Deswegen ist es von Nöten, die endogenen Mechanismen zu erforschen und zu untersuchen. Klinische Studien konnten in den letzten Jahrzehnten zwar die Komplexität der Pathophysiologie nach SHT darstellen, waren jedoch für ein detaillierteres Verständnis der pathologischen Abläufe bislang wenig hilfreich, da die Pathophysiologie nach SHT sich in multiplen Prozessen widerspiegelt, begründet durch eine Kaskade vielseitiger biologischer Reaktionen im Gewebe auf zellulärer und subzellulärer Ebene (Wang et al., 2018).

Bisheriger Erkenntnisgewinn zur Pathologie nach SHT stammt daher überwiegend aus Tierversuchen (an Ratten und Mäusen). Bei den gängigen Tiermodellen wird die Schädelkalotte eröffnet und die freigelegte Hirnoberfläche einer definierten mechanischen Schädigung ausgesetzt („*controlled cortical impact*“, Osier und Dixon., 2017). Dadurch konnten wichtige Erkenntnisse über die Entwicklung im betroffenen Hirngewebe in den ersten Tagen nach der Schädigung gewonnen werden. Unter anderem bestätigten Studien, dass Astrozytenaktivierung eine akute Folge im geschädigten Hirngewebe ist (Muñoz-Ballester et al., 2017; Gözl et al., 2019). Ein weiteres bemerkenswertes Resultat dieser Studie war, dass die Astrozytenaktivierung durch Sexualhormone geschlechtsspezifisch beeinflusst wird (Gözl et al., 2019). Dies deutet darauf hin, dass der hormonelle Status und das Geschlecht für die Prognose nach einem SHT bedeutsam sein könnten. Tatsächlich beschäftigen sich Forschungsgruppen schon länger mit den geschlechtsspezifischen Folgen eines SHTs mit Hinsicht auf kognitive und emotionale Auswirkungen – sowohl bei Kindern als auch im Erwachsenenalter (Arambula et al 2019). Insbesondere Östrogene könnten hierbei eine Rolle spielen, da ihnen, neben ihrer vorherrschenden Rolle als weibliches Sexualhormon, auch eine neuroprotektive Funktion zugeschrieben wird (Arevalo et al., 2015). Tatsächlich kamen einige klinische Studien zu dem Ergebnis, dass Frauen im Vergleich zu Männern eine bessere klinische Prognose nach hypoxischen Hirnschädigungen haben (Phelan et al., 2007, Berry et al., 2009, Ley et al., 2013). Und auch in Tierversuchen wurde nach SHT festgestellt, dass sowohl weibliche als auch männliche Nagetiere nach Applikation von 17 β -Estradiol eine signifikant verbesserte Endprognose haben (Soustiel et al., 2005; Bao et al., 2011; Day et al., 2013; Lu et al., 2018).

In dieser Dissertation wird daher auch die Frage untersucht, ob 17 β -Estradiol (E2), das potenteste der Östrogene, auf die Astrozytenaktivierung nach SHT-Einfluss nimmt. Da Tierversuche aufwendig sind und spezielle Kenntnisse, Techniken sowie Genehmigungen erfordern, wurde für diese Studien ein *in vitro*-Tiermodell für SHT (im Folgenden: *in vitro*-

TBI) verwendet. In diesem Modell wird die mechanische Schädigung des Nervengewebes durch einen Metallzylinder erzeugt, der über organotypische Gewebekulturen des Hippocampus rollt (*rolling-cylinder-Technik* nach Adamchik et al., 2000; siehe Abb. 3). Der Hippocampus wurde für diese Untersuchungen ausgewählt, weil er häufig bei SHTs mitgeschädigt wird (siehe z. B.: Gölz et al., 2019) und organotypische Hippocampuskulturen in der neurobiologischen Forschung bereits seit Jahrzehnten erfolgreich zur Untersuchung physiologischer und pathologischer Prozesse im Hippocampus eingesetzt werden (Stoppini et al., 1991; DelTurco & Deller, 2007; Li et al., 2016; Meseke et al., 2019). Zur Darstellung von Astrozyten wurde der Astrozytenmarker *glia fibrillary acidic protein* (GFAP) verwendet und die GFAP-Befunde wurden mit Befunden zum Zelltod nach *in vitro*-TBI – unter Verwendung von Propidiumiodid als Indikator – korreliert. Die wichtigsten experimentellen Komponenten der Studie werden nachfolgend kurz vorgestellt.

3.2. Hippocampus

Der Hippocampus ist ein paarig angelegter Abschnitt der Großhirnrinde welcher im Lobus temporalis liegt und dort beidseitig die mediale Wand des Seitenventrikels bildet. Als Teil des Allocortex gehört er zu den entwicklungsgeschichtlich ältesten Regionen der Großhirnrinde. Man unterscheidet im Hippocampus das Ammonshorn (Cornu ammonis; CA) und den durch die hippocampale Fissur vom Ammonshorn getrennten Gyrus dentatus. Wird auch noch das Subiculum hinzugezählt, spricht man von der Hippocampusformation (Kipp und Radlanski, 2020).

Histologisch ist der Hippocampus durch eine für den Allocortex typische Dreischichtung charakterisiert (Abb. 1). Diese drei Schichten bezeichnet man im Gyrus dentatus als (von außen nach innen): Stratum moleculare, Stratum granulosum (= Körnerzellschicht, mit den Somata der Körnerzellen), und „Hilus“, der im menschlichen Hippocampus auch als „CA4 Region“ bezeichnet wird. Im Cornu Ammonis, das noch weiter in drei prägnante Felder (CA1, CA2, CA3) untergliedert wird (Parsana und Brown, 2010), findet man entsprechend (von außen nach innen): ein Stratum moleculare, ein Stratum pyramidale (= Pyramidenzellschicht, mit den Somata der Pyramidenzellen) und ein Stratum oriens. In der CA1-Region, die in dieser Arbeit insbesondere untersucht wurde, wird das Stratum moleculare zusätzlich noch in ein Stratum radiatum und ein Stratum lacunosum-moleculare unterteilt. Diese Unterteilung ist durch unterschiedliche axonale Afferenzen bedingt. Im Stratum radiatum terminieren die Axone aus

der CA3-Region (Schaffer-Kollaterale), während das Stratum lacunosum-moleculare spezielle Afferenzen aus dem entorhinalen Cortex (EC) erhält. Beide – Stratum radiatum und Stratum lacunosum-moleculare – enthalten die apikalen Dendriten der exzitatorischen Pyramidenzellen, während sich die basalen Dendriten in das Stratum oriens erstrecken.

Für die Funktion des Hippocampus wichtig ist der sog. „trisynaptische Pfad“ (siehe Abb. 1). Damit wird eine schleifenförmige Kette von axonalen Verbindungen bezeichnet, über die neuronale Reize aus dem entorhinalen Cortex in den Hippocampus hinein- und am Ende, synaptisch modifiziert, wieder zum entorhinalen Cortex zurückgeleitet werden. Der trisynaptische Pfad beginnt mit dem Tractus perforans, dessen Axone an den Dendriten der Körnerzellen des Gyrus dentatus terminieren (Knierim, 2015). Danach projizieren die Körnerzellaxone als sogenannte Moosfasern zu den Pyramidenzellen der CA3 Region. Anschließend senden diese die Schaffer-Kollateralen zu den apikalen Dendriten der Pyramidenzellen in der CA1-Region (Grauer, 2009).

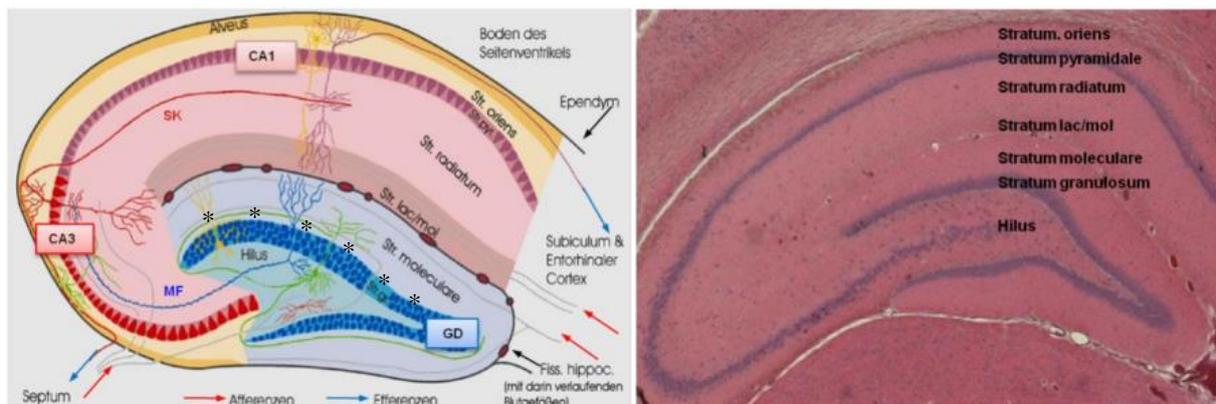


Abbildung 1: Transversaler Querschnitt durch den Hippocampus (Maus) mit Darstellung der Schichtgliederung und Aufzeichnung wichtiger axonaler Verbindungswege: A) Schematische Darstellung B) Histologische Färbung mit Cresylviolett). Abkürzungen: Cornus ammonis Region 1-3 (CA1-3), Gyrus dentatus (GD), Fissura hippocampalis (Fiss.hippoc.), Moosfasern (MF), Stratum granulosum (Str. Gr.), Stratum lacunosum moleculare (Str. lac./mol.), Schaffer-Kollaterale (SK). (Pforte, 2008).

Funktionelle Aufgaben des Hippocampus sind vordergründig Gedächtnis- und Lernprozesse (Murakami et al., 2018). Erstmals festgestellt wurde dies in den 1950er Jahren, als eine bilaterale Hippocampektomie eine partielle retrograde Amnesie sowie eine vollständige anterograde Amnesie ab dem Jahr der Operation zur Folge hatte (Scoville und Milner, 2000). Außerdem bewiesen 1973 Bliss und Lomo im Hippocampus das Phänomen der Langzeitpotenzierung synaptischer Transmission, welches unter anderem als zelluläres Modell für Lern- und Gedächtnisprozesse gilt (Bliss und Lomo, 1973; Miyamoto, 2006). Es wurde außerdem bei Nagetieren und Primaten (inklusive des Menschen) festgestellt, dass im Gyrus

dentatus neue Körnerzellen aus Vorläuferzellen entstehen können und in die umliegenden Strukturen migrieren (Kempermann, 2002). Der Hippocampus ist somit eine der wenigen Regionen im Gehirn, in der nach der Geburt und bis ins Erwachsenenalter Neurogenese in nennenswertem Umfang stattfindet. Studien haben darüber hinaus Astrozyten mit radialen Fortsätzen (*radial glia*) als Vorläuferzellen für die Neurogenese im adulten Gyrus dentatus identifiziert (Seri et al., 2001; Hüttmann et al., 2003).

3.3. Astrozyten

Astrozyten, auch Astroglia genannt, gehören zur Gruppe der Gliazellen. Erstmals im 19. Jahrhundert namentlich durch Michael (Mihály) von Lenhossék als eigenständige Zellgruppe innerhalb der Gliazellen erwähnt (Lenhossék, 1895), werden sie in neueren Arbeiten selbst als eine heterogene Population mit Unterschieden in Morphologie und Eigenschaften beschrieben (Matyash und Kettenmann, 2010).

Morphologisch lassen sie sich in fibrilläre, protoplastische sowie plasmato fibrilläre Astrozyten einteilen (Matyash und Kettenmann, 2010). Während die fibrillären Faserastrozyten vor allem in der weißen Substanz vorkommen und schlanke verzweigte Zytoplasmafortsätze aufweisen, befinden sich die protoplastischen vorwiegend in der grauen Substanz und bilden dort eher kurze, dicke Zytoplasmafortsätze aus (Reichenbach und Wolburg, 2005). Plasmato fibrilläre Astrozyten befinden sich an der Grenze der weißen und grauen Substanz. Neueste Arbeiten teilen Astrozyten weiterhin in verschiedene Kategorien ein: Tanycten, radiale Glia, Bergmann-Glia, perivaskuläre Glia und ependymale Glia (Emsley und Macklis, 2006). Diese Untergliederung ist darauf zurückzuführen, dass in verschiedenen Arealen des Gehirns unterschiedliche Astrozyten-Typen - mit unterschiedlichen Funktionen und Morphologie - coexistieren (Emsley und Macklis, 2006).

Astrozyten bilden das Gerüst des Nervensystems und regulieren die Homöostase im Nervengewebe. Sie sind die am häufigsten vorkommenden Gliazellen im ZNS und sind charakterisiert durch kleine Zellkörper und zahlreiche radiär vom Soma abgehende Zellfortsätze. Diese stehen über Gliaendfüße in Kontakt mit dem Kapillärsystem des ZNS und bilden einen Teil der neurovaskulären Einheit der Blut-Hirn-Schranke über diese sie an der Immunantwort des Gehirns auf pathologische Prozesse und Einwirkungen teilen haben. Des Weiteren sind diese unter einander sowie mit Oligodendrozyten über Gap Junctions verbunden,

bilden also ein funktionelles Syncytium. Über die Vernetzung ihrer Fortsätze bilden die Astrozyten im ZNS zwei prägnante Strukturen aus: die Membrana *limitans gliae perivascularis* zur Unterstützung der Blut-Hirn-Schranke sowie die unter der Pia mater gelegene Membrana *limitans gliae superficialis*.

Der Aufgabenbereich der Astrozyten im ZNS umfasst neben Stützfunktionen und Beteiligung an der Blut-Hirn-Schranke die Aufnahme von neuronalen Stoffwechselprodukten, die Ernährung und Regeneration von Neuronen sowie die Aufrechterhaltung des neuronalen Milieus u. a. durch die Aufnahme des bei Aktionspotenzialen in den Extrazellulärraum abgegebenen Kaliums. Darüber hinaus geht man davon aus, dass Astrozyten besondere Funktionen übernehmen, wenn das Nervengewebe beispielsweise durch Traumata, Ischämien oder neurodegenerative Prozesse pathologisch geschädigt wird (Sofroniew, 2009). Dabei verändern Astrozyten ihre Morphologie und verändern die Expression bestimmter Gene wie z. B. die für GFAP und andere astrozytäre Prozesse in direkter Umgebung der betroffenen Seite des Gehirns (Muñoz-Ballester et al., 2017). Man spricht in diesem Fall von reaktiven Astrozyten bzw. von reaktiver Gliosis oder Astroglisis, wenn noch eine Astrozytenvermehrung hinzukommt (Pekny und Pekna, 2004; Liddelow et al., 2017). Dieses ist jedoch nicht zwingend der Fall. So zeigen Studien, dass Astrozyten, die zur Verdichtung der durch Gliazellen induzierte Grenzen zu verletzten Regionen beitragen, keine neugeborenen Astrozyten sind. Jedoch haben aktivierte Astrozyten generell das Potential zur Proliferation (Bardehle, 2013; Lange Canhos, 2021) und dienen in Teilen des Hippocampus als neuronale Vorläuferzellen, aus denen sich neue Astrozyten und Neurone bei neurodegenerativen Prozessen bilden können (Mamber et al., 2013).

Die Bedeutung reaktiver Astrozyten nach pathologischer ZNS-Schädigung ist noch nicht geklärt. Allgemein wird ihnen eine neuroprotektive Funktion zugeschrieben (Verkhatsky et al., 2017). Einer einflussreichen Studie zu Folge können reaktive Astrozyten jedoch auch neurotoxischen Einfluss ausüben und die Neurodegeneration verstärken (Liddelow et al., 2017).

3.4. GFAP

Neben ihrer charakteristischen Morphologie zeichnen sich Astrozyten durch die Expression spezifischer Gene aus. Dazu zählen beispielsweise die Glutamat in Glutamin umwandelnde Glutamin-Synthetase, das Calcium-bindende Protein S100 β sowie die Intermediärfilamente

Vimentin und GFAP (*glia fibrillary acidic protein*). Insbesondere Letzteres wird häufig – und auch in der vorliegenden Studie – als Biomarker für die Untersuchung von Astrozyten verwendet (Escartin et al., 2019).

GFAP wird vor allem in Astrozyten und Ependymzellen des ZNS sowie in geringeren Vorkommen auch in Zellen des peripheren Nervensystems exprimiert. Es ist vor allem für die Verwendung als Astrozyten-assoziiertes Tumormarker bekannt (Escartin et al., 2021). Das saure Gliafaserprotein befindet sich in den astrozytären Fortsätzen reifer Astrozyten und ist als Stabilisator des Zytoskelettes maßgeblich an der Stützfunktion und Beweglichkeit der Astrozyten beteiligt (Eng et al., 2000). Kommt es zu einer Astroglie, wie bei multipler Sklerose, nach traumatischen oder neuroplastischen Läsionen, wird die Expression von GFAP hochreguliert (Ceyzériat et al., 2018). Aber auch physiologische Stimuli wie sportliche Aktivität (Rodríguez et al., 2013) oder Glucocorticoide (O'Callaghan et al., 1991) können die Expression von GFAP anregen. Im Nucleus suprachiasmaticus schwankt seine Expression mit dem circadianen Rhythmus (Gericis et al., 2006).

3.5 Östrogene

Östrogene gehören zur Gruppe der Sexualhormone und zählen zu den C18 Steroidhormonen. Die Hauptvertreter des Östrogens werden bestimmt durch ihre Hydroxylgruppe, dazu zählen das Estron (E1), das Estradiol (E2), das Estriol (E3) und das Estretol (E4). Das potenteste Östrogen ist das 17 β -Estradiol (E2). Grundlage der Biosynthese von E2 ist das Sterangerüst Cholesterin. Cholesterin wird nachfolgend zu Pregnenolon und dieses über mehrere Schritte zu Testosteron umgewandelt. Den finalen Schritt der E2-Bildung aus Testosteron übernimmt die Aromatase (CYP19A1; Arevalo et al., 2015; Micevych et al., 2008). Während bei den Frauen die E2-Synthese vor allem im Rahmen des hormonellen Zyklus in den Granulosazellen der Ovarien erfolgt, findet E2-Produktion grundsätzlich auch in anderen Geweben statt, in denen Aromatase exprimiert wird z. B. in der Nebennierenrinde, dem Fettgewebe, der Plazenta, den Hoden und sogar in einer Vielzahl neuronaler Areale wie beispielsweise dem Hippocampus (Taxier et al., 2020; Arevalo et al., 2015). Im ZNS wirkt E2 überwiegend als Neurosteroid. Das heißt, es beeinflusst durch die Bindung an neuronale E2-Rezeptoren direkt die neuronale Aktivität und die synaptische Plastizität und wirkt darüber z. B. auf Lern- und Gedächtnisprozesse ein (Taxier et al., 2020). Darüber hinaus werden neuronal aktivem E2 auch neuroprotektive Wirkungen zugeschrieben. Beispielsweise wird vermutet, dass E2 die

Expression von anti-apoptotischen Genen und die Freisetzung neuroprotektiver Wachstumsfaktoren verstärkt (Arevalo et al., 2015; Taxier et al., 2020). Als Quelle für neuroprotektiv wirkendes E2 werden Astrozyten angenommen, in denen die Expression von Aromatase durch die Gewebsschädigung induziert wird (Arevalo et al., 2015). Umgekehrt scheinen Astrozyten selbst auf E2 zu reagieren, wie die Studie von Gözl et al. (2019) nahelegt. Hier wurde in einigen Mäusen die E2-Bildung durch systemische Applikation des Aromatase-Inhibitors Letrozol gehemmt und danach festgestellt, dass die ansonsten nach experimentellem SHT beobachtete Zunahme der hippocampalen GFAP-Expression auf ca. 300% nach Letrozolgabe signifikant auf ca. 500% erhöht war (Gözl et al., 2019). Nach SHT im Nervengewebe freigesetztes E2 scheint daher regulierend auf die Astrozyten einzuwirken. Interessanterweise war dieser Effekt nur in weiblichen Mäusehirnen zu beobachten, was auf eine Geschlechterdifferenz hindeutet. Die hormonellen Effekte der Östrogene werden über zwei unterschiedliche Typen von Rezeptoren vermittelt. Die klassischen Östrogenrezeptoren ER α und ER β liegen im Zytosol vor und werden nach Bindung ihrer Liganden in den Kern transportiert, wo sie die Transkription von Genen aktivieren, die über eine Estrogen-Erkennungssequenz (ERE) verfügen (Klinge, 2001). Zusätzlich ist mindestens ein membranständiger Östrogenrezeptor bekannt, der G-Protein gekoppelte Estrogen Rezeptor (GPER1; (Sandén et al., 2011; Bustamante-Barrientos et al., 2021), welcher über zelluläre Signaltransduktionskaskaden für die schnellen physiologischen Effekte der Östrogene verantwortlich ist (Srivastava et al., 2013).

3.6 Propidiumiodid

Propidiumiodid (PI) ist ein Nukleinsäure-Interkalator, der sich bevorzugt in die doppelsträngige DNA einlagert. Sobald der Farbstoff an DNA gebunden ist, wird seine Fluoreszenz 20- bis 30fach gesteigert und das Anregungs- bzw. Emissionsmaximum von 493 bzw. 639 nm auf 535 nach 617 nm verlagert (Crowley et al., 2016; Arndt-Jovin und Jovin, 1989). Zellen, die PI aufgenommen haben, können dann im Fluoreszenzmikroskop detektiert werden. PI wird gerne für Studien zum Zelltod eingesetzt, weil es eine intakte Zellmembran nicht durchdringen und daher nur mit der DNA interkalieren kann, wenn die Zellmembran beschädigt ist, was in der Regel zum Absterben der Zelle führt (Macklis und Madison, 1990; Pollack und Ciancio, 1990).

3.5. Ziele der Arbeit

In einer Vorläuferstudie zu dieser Dissertation (Hemmat, 2022) wurde auf Grundlage der *rolling-cylinder*-Technik von Adamchik et al. (2000) in der Abteilung von Prof. Bender ein *in vitro*-TBI-Modell mit organotypischen hippocampalen Gewebekulturen etabliert. Darin wurde gezeigt, dass die angewandte mechanische Schädigung zur einer erhöhten PI-Aufnahme nach 24 Stunden sowie zu einer damit korrelierenden Aktivierung von Mikroglia-Zellen führt. Zugabe von E2 zum Medium direkt nach der Schädigung schien diese Effekte abzumildern. Da – wie oben ausgeführt – insbesondere auch Astrozyten durch mechanische Traumata aktiviert werden und Hinweise dafürsprechen, dass diese Astrozyten E2-sensitiv sind, wurde in der vorliegenden Arbeit das *in vitro*-TBI Versuchsmodell dazu benutzt, um die Auswirkungen einer mechanischen Schädigung auf die Astrozytenaktivierung in den organotypischen Hippocampuskulturen zu bestimmen und die Befunde mit dem Ausmaß der Neurodegeneration – bestimmt über PI – zu korrelieren. Zusätzlich wurde untersucht, welchen Einfluss E2 auf die beobachteten Effekte hat. Speziell wurden die Zeiträume von 24 und 48 Stunden zur Untersuchung ausgewählt und der Fokus auf die CA1 Region gelegt, in der das Stratum pyramidale und die benachbarten Strata radiatum und lacunosum moleculare (als Einheit: Stratum radiatum/lacunosum-moleculare) separat voneinander untersucht wurden. Für die quantitative Untersuchung der Astrozyten wurde GFAP genutzt. Weiterhin wurde PI zur Darstellung geschädigter Zellen eingesetzt.

Mit diesen Mitteln wurden folgende Fragestellungen untersucht:

1. Ist die GFAP-Expression in organotypischen Gewebekulturen nach *in vitro*-TBI verändert:
 - a) im gesamten Hippocampus (Untersuchung mit dem Western Blot-Verfahren)
 - b) in der CA1-Region (speziell in den Strata pyramidale und radiatum/lacunosum-moleculare, über immunhistochemische Analysen)?

2. Besteht eine Korrelation zwischen Astrozytenaktivierung und erhöhter PI-Aufnahme nach *in vitro*-TBI?

3. Beeinflusst die Zugabe von 17 β -Estradiol (E2) nach *in vitro*-TBI die Astrozytenaktivierung und/oder PI-Aufnahme?

4. Gibt es Geschlechtsunterschiede?

4. Material

4.1. Chemikalien

Tabelle 1: Angewendete Chemikalien und deren Hersteller

Produkt	Hersteller
17- β -Estradiol, wasserlöslich	SIGMA, # E4389
Acrylamid	SIGMA-ALDRICH/MERCK
Ammonium Persulfat (APS)	SIGMA-ALDRICH/MERCK
Bromphenolblau (BPB)	SIGMA-ALDRICH/MERCK
Aqua dest.	ARIUM COMFORT SARTORIUS
Aqua	BRAUN
Einbettmedium (für Fluoreszenz)	DAKO
DAPI (4, 6-diamidino-2-phenylindol)	SIGMA-ALDRICH/MERCK
DNP (Diarylpropionitril)	TOCRIS; # 1494
ECL Western Blotting Substrat	THERMO FISHER SCIENTIFIC
Einfriermedium (Tissue Tek)	SAKURA
Ethanol (96%)	UKE APOTHEKE
Magermilchpulver	HEIRLER
Methanol	J.T. BAKER
Paraformaldehyd	MERCK
PBS (Tabletten)	GIBCO
Phos-Stop	ROCHE
Ponceau-Rot	ROCHE
<i>Prestained Page Ruler</i> (Marker)	FERMENTAS
Protease Inhibitoren – Mix	ROCHE
Saccharose	MERCK

Salzsäure, (2N)	UKE APOTHEKE
Stickstoff, (N ₂)	MERCK
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	SIGMA-ALDRICH/MERCK
Tris	CARL ROTH
Tween	SIGMA-ALDRICH/MERCK
Ziegen Serum (<i>normal goat serum</i> , NGS)	SIGMA-ALDRICH/MERCK

4.2. Antikörper

Table 2: Angewendete Antikörper und deren Hersteller

Antikörper (anti-)	Hersteller (Bestellnummer)	Verdünnung (Blockierlösung)	Herkunft (Typ)
Immunhistochemie:			
GFAP	Dako (Z0334)	1:800	Hase
NeuN clone A60	Merck (MAB377)	1:400	Maus
Maus-IgG+Alexa Fluor 488	Thermo Fisher (A-11001)	1:500	Ziege
Kaninchen-IgG+Alexa Fluor 647	Life Technolgie (A-31573)	1:500	Esel
Western:			
GFAP	Sigma-Aldrich (G3893)	1:1000 (Milchpulver)	Maus
GAPDH	Thermo Fisher (AM4300)	1:10000 (Milchpulver)	Maus
Maus IgG H&L + HRP	Thermo Fisher (31400)	1:2500	Ziege

4.3. Technische und Labormedizinische Hilfsmittel

Table 3: Technische und Labormedizinische Hilfsmittel und deren Hersteller

Produkte	Hersteller
Accu-Jet Saugpipette	BRAND
Analyse-Waage	SARTORIUS AG, GÖTTINGEN
Aufbewahrungsboxen	HS
Biophotometer	EPPENDORF, WESSLING-BERZDORF
Becherglas	SONSTIGES
Centrifuge 5415C	EPPENDORF, WESSLING-BERZDORF
Centrifuge 5417R	EPPENDORF, WESSLING-BERZDORF
Chemielumineszenz	VILBER LOURMAT
Deckgläser	AUTOMAT STAR
Feuchte Kammer	UKE LABOR NEUROANATIMIE
Elektrophorese System: XCell SureLock	THERMO FISHER SCIENTIFIC
Mini-Cell	
Electrophoresis constant power supply ECPS 3000/150	AMERSHM PHARMACIE BIOTECH
Electrophoresis constant power supply EPS 3501 XL	AMERSHM PHARMACIE BIOTECH
Ep T.I.P.S Standard (Pipettenspitzen)	EPPENDORF
Einmalhandschuhe, Nitril	ANSELL
Erlenmeyerkolben	SCHOTT, MAINZ
Folienstift	FABER-CASTELL, STEIN
Gefrierschrank, -25 Grad C	LIEBHERR

Gefrierschrank - 80 Grad C	FORMA SCIENTIFIC; MARIETTA OHIO
Heidemann Spatel	HENRY SCHEIN
Inkubator	DRAEGER
Kosmetiktücher	GVS eG
Kryostat, HM 560	MICROM
Kulturschalen (Six Wheel)	FALCON
Kühlschrank	BOSCH
Küvetten	RESISTANCE
Magnetrührstäbchen	VWR INTERNATIONAL GmbH
Mikroliter-Pipetten (2,20,200,100 µl)	EPPENDORF
Mikroskop, Biorevo BZ 9000	KEYENCE
Mini Zentrifuge	NATIONAL LABNET CO.
Nitrocellulose-Blotting-Membran	GE HEALTHCARE LIFE SCIENCES
Objektiv, 2x und 10x	NIKON
Objektträger (Super Frost Plus)	GLASWARENFABRIK KARL HECHT KG
Perfusionspumpe, Masterflex L/S	COLE-PARMER
pH Meter, PH M93 Reference pH Meter	RADIOMETER COPENHAGEN
Pinsel	DA VINCI, FARBER CASTELL
Pipetten für 10, 100, 200, 1000 µl	EPPENDORF
Pipettenspitzen	TIP ONE
Pinzette	FST
Reaktionsgefäße 15,50, 100ml	GREINER
Reagenzglasschüttler, Vortex Genie 2	SCIENTIFIC INDUSTRIES
Schere, gerade	FST
Schere, gebogen	FST

Schüttler, MS-2	IKA
Sterile Werkbank	HAREUS INSTRUMENTS
Stoppuhr	JUNGHANS
Tissue Chopper	MCILWAIN
Tissue Kosmetiktücher	TAPIRA, GVS
Vivobook 15	ASUS

4.4. Software

Tabelle 4: Softwareprogramme zur Analyse und Auswertung der Daten

Produkte	Hersteller
BZ-2-Viewer	KEYENCE
Excel Microsoft 365°	MICROSOFT
Fiji (ImageJ)	WAYNE RASBAND (NIH)
FusionCapt Advance Solo 2	VILBER SMART IMAGING
Windows 11	MICROSOFT
Word Microsoft 365°	MICROSOFT
GraphPad Prism 8	GraphPad Software, Inc.

4.5. Kulturmedien und Lösungen

PBS (Phosphate-Buffered Saline), 1000 ml:

- 8 g NaCl
- 0,2 g KCl
- 1,44 g Na₂HPO₄
- 0,2 g KH₂PO₄

Becherglas mit 1000ml mit Aqua dest. auffüllen und im Anschluss unter Nutzung des Magnetrührers mit 1 M HCl oder 1 M NaOH auf pH 7,4 bei Raumtemperatur einstellen.

4 % PFA (Paraformaldehyd), 1000 ml

40 g PFA

760 ml PBS

Mit Hilfe eines Magnetrührers die Lösung mit 1M HCl oder 1M NaOH auf pH 7,4 eingestellt.
Zur Lagerung bei -18 °C einfrieren.

Präparationsmedium, 500 ml

50 ml 10x HBSS

5,04 ml Hepes 1M

Medium mit Aqua dest. Auf 500ml in einem Erlenmeyerkolben auffüllen, anschließend mit Hilfe eines Magnetrührers die Lösung auf pH 7,3 mit 1M HCl oder 1M NaOH einstellen.
Anschließend Lösung steril filtrieren.

Inkubationsmedium, 50 ml

Neurobasal A 45 ml

10% FCS 5 ml

B27 500 µl

L Glutamin 125 µl

Penicillin 500 µl

30% Glucose 500 µl

Saccharose 25%, 250 ml

PBS 250 ml

D+Saccharose 62,5 g

In einem Messzylinder die Saccharose auflösen, anschließend mit PBS in einem Becherglas auffüllen.

17 β -Estradiol, E2:

2,72 mg E2 in 100 ml Aqua dest. lösen ($=10^{-4}$ M), anschließend auf 1:1000 verdünnen mit dem Inkubationsmedium für eine Endkonzentration von 10^{-7} M.

Solution 2, pH 8,8

36,3 g Tris
8 ml SDS 10%
200 ml Aqua dest.

Solution 3, pH 6,8

6 g Tris
4 ml SDS 10%
200 ml Aqua dest.

Lämmli-Probenpuffer, 10fach

30 g Tris Base
144 g Glycin
100 ml 10% SDS

Mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen.

Für die zu verwendende 1x Lösung, jeweils 100 ml mit 900 ml Aqua dest. auffüllen.

Milchpulver 5% in PBS-Tween, 80ml

4 g Milchpulver auf 80ml PBS-T

Transferpuffer, 1000ml

80 ml 12,5x Transfer Buffer
300 ml Methanol
Mit Aqua dest. auffüllen bis 1000 ml
2 ml 10% SDS zugeben.

PBS-Tween, 1000ml

100 ml 10xPBS
30 ml 10% Tween

870 ml Aqua dest., steril

RIPA-Puffer, Stammlösung

1,5 ml NaCl

2,5 ml Tris pH 7,5

5 ml NP40

500 µl 0,1% SDS

2,5 ml Natrium desoxydolot

0,5 ml EDTA pH 8,0

50 ml Aqua dest.

RIPA-Puffer mit Phos-Stop und Protease Inhibitor

1 Tablette Phos-Stop auf 1 ml RIPA-Stammlösung, davon 100 µl auf 1 ml RIPA Stammlösung
+ 40 µl 25x Protease Inhibitor.

Sammelgel, 12 % (für 2 Gele)

1,2 ml Acrylamid 30%

2,5 ml Solution 3

6,1 ml H₂O

100 µl 10% APS (Ammoniumpersulfat)

20 µl TEMED

Trenngel, 12% (für 2 Gele)

7,9 ml Acrylamid 30%

5 ml Solution 2

7,1 ml H₂O

200 µl 10% APS (Ammoniumpersulfat)

40 µl TEMED

5. Methoden

5.1. Tiere

Die für das Experiment notwendigen Tiere stammten aus der Forschungstierhaltung des UKEs. Es wurden weibliche und männliche Mäuse des Zuchtstammes C57BL/ 6J_2019 verwendet. Insgesamt wurden 83 Tiere (32 weiblich, 51 männlich) im Alter von 7 (P7) oder 8 (P8) Tagen zum Anlegen von Kulturen verwendet. Bei der Haltung der Mäuse sowie bei der Durchführung der Experimente wurden die gesetzlichen Richtlinien für Tierhaltung und Tierversuche der Bundesrepublik Deutschland eingehalten.

5.2 Präparation der Gewebekulturen

Die Präparation der Gewebekulturen erfolgte auf Grundlage etablierter, dokumentierter und veröffentlichter Methoden (Meseke et al., 2018) unter semisterilen Bedingungen durch Prof. Dr. Bender. Nach Festlegung des Geschlechts der entsprechenden Maus erfolgte die Dekapitation mittels autoklavierter Schere. In dorso-sagittaler Richtung wurde die Kopfhaut aufgeschnitten und nach lateral weggeklappt. Die Schädelkalotte wurde anschließend aufgetrennt und ebenfalls nach lateral, entlang der Sutura coronalis, weggeklappt. Das Gehirn wurde daraufhin vollständig entnommen und mithilfe eines Spatels in eine eisgekühlte Petrischale mit Präparationsmedium überführt. Danach wurden zuerst das Cerebellum und der Lobus frontalis entfernt, dann die beiden Gehirnhälften voneinander getrennt und der Hirnstamm sowie das Diencephalon aus der Umhüllung durch die Großhirnrinde herausgelöst. Anschließend konnte der Hippocampus mit anhängendem entorhinalen Cortex unter dem Mikroskop mit einem gebogenen Spatel aus der Großhirnrinde herauspräpariert werden. Die Proben wurden auf die Arbeitsfläche eines Gewebehäckslers (McIlwain) platziert und senkrecht zur Longitudinalachse des Hippocampus in 0,4 mm-dicke Scheiben geschnitten. Um die Varianz zu minimieren und die Vergleichbarkeit zwischen den experimentellen Gruppen zu optimieren, wurden unter dem Mikroskop Triplets aus benachbarten Scheiben aus allen Scheiben isoliert und von den Triplets jeweils eine Scheibe den folgenden Untergruppen zugeordnet und auf entsprechende Kultur-Membranen (Millicell CM, 0,4 µm Porengröße, 30 mm Durchmesser) platziert (Abb. 2A-C):

1. TBI
2. Kontrolle
3. TBI+E2

Es wurde darauf geachtet, dass nur unbeschädigte Scheiben ausgewählt wurden. Abschließend wurde unter Berücksichtigung der Sterilität mittels einer Flüssigkeits-Absaugung das Präparationsmedium vollständig entfernt und die Membranen in mit je 1 ml Inkubationsmedium gefüllte Kulturschalen (*Six-well*-Schalen) transferiert (siehe Abb. 2D). Danach erfolgte die Inkubation der Gewebekulturen im Inkubator bei 37°C und 95% CO₂-Gehalt für 14 Tage, um eine Regeneration des geschädigten Gewebes nach erfolgtem Trauma zu ermöglichen. Das Wechseln des Mediums erfolgte erstmalig 24 h nach der Präparation, danach nur noch alle 48 h.

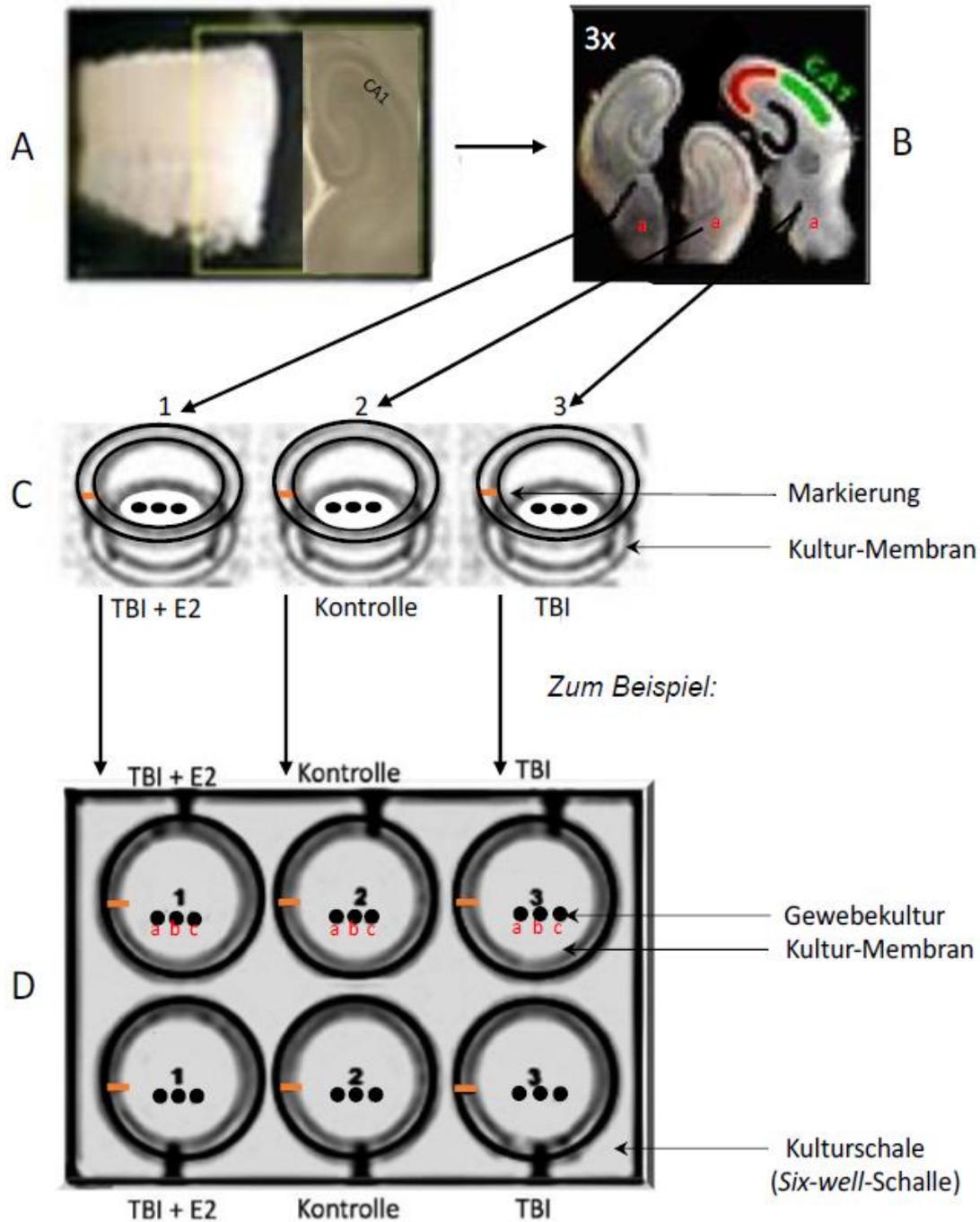


Abbildung 2: Präparation und experimentelle Zuordnung der hippocampalen Gewebeproben (Abb. freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Bender) A. Hippocampusscheibe 400 μm B. Triplet benachbarter Hippocampusscheiben C. Die Scheiben eines Triplets wurden so auf dem Durchmesser einer Kulturmembran platziert, sodass die aus einem Triplet stammenden Scheiben später wieder identifiziert werden konnten. Dazu diente eine Markierung am Rand. Scheiben aus einem bestimmten Triplet wurden in Relation zur Markierung immer gleich platziert, d. h. auf den Membranen entweder markierungsnah, mittig oder markierungsfern. Auf diese Weise konnten 3 Triplets pro Tier auf den drei Membranen für die unterschiedlichen experimentellen Gruppen untergebracht werden. D. Die Membranen wurden nachfolgend in eine Six-Well-Kulturschale mit Inkubationsmedium überführt und damit inkubiert. Eine horizontale Gruppe (3 Membranen) enthält jeweils Scheiben aus einem Tier.

5.3 Mechanische Schädigung durch die *rolling-cylinder* Technik (*in vitro*-TBI)

Um die Folgen einer SHT *in vitro* untersuchen zu können, wurde an den organotypischen Kulturen der TBI- und der TBI+E2-Gruppe mithilfe der *rolling-cylinder* Technik eine mechanische Schädigung (*in vitro*-TBI) induziert. Dafür wurde die *Six-well* Schale mit den Gewebekulturen randständig auf einen Wippschüttlertisch platziert und dieser in seiner stärksten Auslenkung (Neigungswinkel von 12°) fixiert. Danach wurden autoklavierte Stahlzylinder mit einem Gewicht von 3,16 g, einer Länge von 12 mm und einem Durchmesser von 5 mm am tiefst gelegenen Rand der Kulturmembran unterhalb der Kulturen in den Gruppen 1 (TBI) und 3 (TBI+E2) platziert. Nach Betätigung des Einschaltknopfes bewegte sich der Wippschüttler zur Gegenseite (ebenfalls bis zu 12°), um anschließend wieder in seine Ausgangsposition zurückzuschwingen. Dabei wurden die Kulturen mit einer Geschwindigkeit von 140 mm/s zweimal vom Zylinder überrollt (Abb. 3). Nach Erreichen der Ausgangsposition wurde der Schüttler ausgeschaltet. Die Kontrollkulturen wurden mitbewegt, jedoch nicht überrollt.

Nach erfolgter *in vitro*-TBI wurden die Gewebekulturen in neue *Six-well* Schalen transferiert, die mit frischem Inkubationsmedium gefüllt waren. Diesem Kulturmedium wurde (für alle Kulturen) 5 µM Propidiumiodid zugemischt sowie bei der experimentellen Gruppe 3 (TBI+E2) zusätzlich noch 20 nM E2. Bis zur Entnahme nach 24 oder 48 h verblieben die Gewebekulturen im Inkubator.

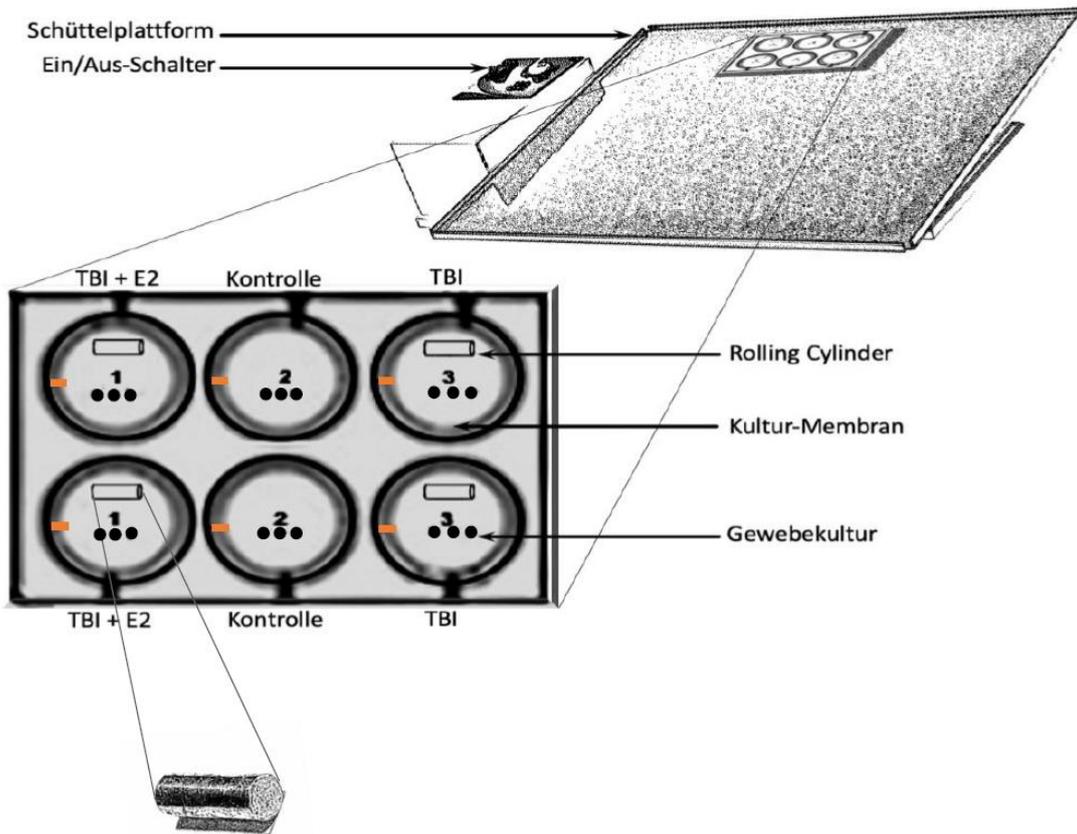


Abbildung 3: Durchführung der mechanischen Schädigung nach der rolling-cylinder Technik (Abb. freundlicherweise zur Verfügung gestellt von H. Hemmat). Dargestellt ist eine Six-well Schale mit Gewebekulturen auf dem Wipptisch. Die Vergrößerung zeigt die Zylinder in der Ausgangsposition.

5. 4 Western Blot

Für Western Blots wurden die Gewebekulturen 24 h nach *in vitro* TBI mittels eines feinen Spatels von der Kulturmembran abgezogen, in 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen überführt, danach sofort bei -196°C in flüssigen Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Um für eine Western Blot-Analyse genügend Gewebe zu haben, wurden hier die Kulturen nicht einzeln eingefroren, sondern alle Kulturen auf einer Membran (in der Regel 3 Kulturen, die von einem Tier stammen) wurden zusammen („gepoolt“) in das Eppendorf-Röhrchen überführt. In diesem Teil der Untersuchung entspricht die Einzel-Stichprobe (n) somit einem Tier, während in den immunhistochemischen Untersuchungen das „n“ eine Kultur repräsentiert (siehe 5.5).

5.4.1 Lyse und Zentrifugation

Für die weitere Verwendung wurden die Kulturen mit RIPA-Puffer lysiert. Dafür wurden 70µl RIPA-Puffer zu den jeweiligen Eppendorf-Röhrchen hinzugegeben. Zum Schutz der Proteine wurden die Proben in Experimentpausen auf Eis gelagert und zwischendurch geschüttelt. Nach 30-minütiger Lagerung auf Eis erfolgte das Zentrifugieren der Proben mittels Laborzentrifuge bei 4°C für 30 min und einer relativen Zentrifugenbeschleunigung von 13.000 rpm, um feste Zellbestandteile zu präzipitieren. Das Filtrat wurde mit einer Pipette entnommen und in ein neues Eppendorf-Röhrchen überführt. Anschließend wurden diese wieder in flüssigem Stickstoff bei -196°C schockgefroren und für die weitere Verarbeitung bei -80°C aufbewahrt.

5.4.2 Proteinmengenbestimmungen nach Bradford

Der Bradford-Test dient der quantitativen Bestimmung der Proteinmengen der Gewebeproben mittels photometrischer Analyse. Nach erfolgter Lysierung der Gewebeproben wurden jeweils 1 µl pro Eppi zu 19 µl Aqua dest. pipettiert. Anschließend wurde das Bradford Reagenz 1:5 mit Aqua dest. verdünnt und davon 1 ml zu den Proben gegeben. Im Sinne der Validierung wurde jede Gewebeprobe zweifach angesetzt.

Zusätzlich für die Kalibrierung des Photometers wurden Standards hergestellt, deren Kalibrierungsbereich zwischen 0-10 µg lag. Dafür wurde eine BSA-Lösung mit Aqua dest. im Verhältnis der folgenden Tabelle 5 vermengt und jeweils 1 ml RIPA hinzugefügt.

Tabelle 5: Standardreihe Bradford Test (µg/µl)

	0	1,25	2,5	5	7,5	10
H2O [µl]	20	17,5	15	10	5	0
BSA [µl]	0	2,5	5	10	15	20
Ripa [µl]	1	1	1	1	1	1

Anschließend erfolgte die Bestimmung im Photometer. Die Menge wurde jeweils doppelt bestimmt, um einen Mittelwert berechnen zu können, da in den Lösungen der Anteil an Medium schwanken kann. Der ermittelte Mittelwert wurde durch 25 µg geteilt, wodurch sich die Proteinmenge x ergab. Die entsprechenden Probemulden der Kassetten des Western Blot Setups haben ein Fassungsvermögen von circa 10 µl, weswegen die Proteinmenge x mit H₂O bis maximal 10 µl verdünnt wurde. Anschließend wurde 2,5 µl Lämmli-puffer hinzugefügt, welcher als Laufpuffer dient und die Auftrennung der Proteine ermöglicht.

$$\text{Mittelwert}/25 \mu\text{g} \rightarrow \text{Proteinmenge } X + \text{H}_2\text{O} + \text{Lämmli-puffer} = \text{Menge } Y \mu\text{L}$$

5.4.3 Sodium Dodecyl Sulfate – PolyAcrylamid Gel Elektrophoresis (SDS-PAGE)

Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese, entsprechend der SDS-PAGE-Methode, dient der Auftrennung und Linearisierung der Proteine. Dazu wurden ein engporiges Trenngel und ein weitporiges Sammelgel hergestellt, in beiden Fällen auf Basis von 12% Acrylamid. Beim Trenngel (pH8,8) wurde dem Acrylamid die Solution 2 beigemischt und beim Sammelgel (pH 6,8) die Solution 3. Für die Autopolymerisation wurden jeweils 100 µl 10% Ammoniumpersulfat und 20 µl TEMED (Tetramethylethyldiamin) beigemischt, zusätzlich SDS als anionisches Tensid, das durch Anheftung an die Proteine deren Eigenladung überdeckt. Zuerst wurde das 12% Acrylamidgel für das Trenngel hergestellt und in die Kassette gegossen. Um dieses vor Austrocknung zu schützen, wurde die oberste Schicht mit Isopropanol benetzt. Nach Aushärten des Gels und Verwerfen des Isopropanols wurde das Sammelgel angesetzt und

in einem Verhältnis Sammelgel zu Trenngel von 2:1 in die Kassette eingebracht. Der Kamm für die Probemulden wurde in das Setup platziert und bis zum Aushärten der Gele in der Kassette belassen (ca. 30 min). Bis zur weiteren Verarbeitung können die Gele unter feuchten Bedingungen bei 4° im Kühlschrank gelagert werden. In Vorbereitung der Gelelektrophorese wurden die Kammern der Setups mit Lämmli Puffer gefüllt und die Probemulden nach Entfernung der Kämmen ebenfalls mit Lämmli Puffer gespült, um Acrylamid Reste zu entfernen. Die Proben wurden nach erfolgtem Auftauen, zur Denaturierung der Proteine, in einem Heizblock bei 45° für 5 min erhitzt und anschließend wieder auf Trockeneis transferiert. Es erfolgte das erneute Zentrifugieren der Proben und Lagern auf Trockeneis bis zum weiteren Gebrauch. Für die Elektrophorese wurden die mittigen Probemulden im Sammelgel mit den experimentellen Proteinproben befüllt. Dabei wurde darauf geachtet, dass stets alle 3 experimentellen Gruppen aus einem Tier im selben Gel liefen. Auf diese Weise konnten 2 Triplets (= die Proben von 2 Tieren) mit einem Gel ausgewertet werden. In eine der randständigen Mulden wurde zusätzlich ein Positionsmarker pipettiert, der eine Größenbestimmung der detektierten Proteine ermöglichte. Es wurde eine elektrische Spannung von 180 Volt für 1,5 h eingestellt.

5.4.4 Blotting

Nach erfolgter Elektrophorese wurden die aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran übertragen (*geblottet*). Dafür wurden zuerst Schwämme (*Sponge Pads*) sowie die notwendigen Filterpapiere, in Transferpuffer eingelegt. Das Sammelgel wurde vorsichtig vom Trenngel entfernt und zwischen zwei Nitrozellulose-Membranen platziert, denen von außen zuerst die Filterpapiere und danach die Schwämme aufgelegt wurden. Um keine Ungenauigkeiten bei der Auswertung zu erhalten, wurden dabei Lufteinschlüsse vermieden. Anschließend wurde das Paket in ein Blotmodul überführt und wieder in das Western Blot Setup eingebracht. Das Setup wurde für das Blotten auf Eis gelagert und mit Transferpuffer umspült. Anschließend wurde eine elektrische Spannung von 40 Volt und eine elektrische Stromstärke von 184 mA für 2 Stunden eingestellt.

Nach Ablauf der 2 h wurden die Nitrozellulose-Membranen in PonceauS Färbung für eine Minute gefärbt und danach eine Minute mit Aqua dest. gespült. Dadurch wurden die Banden sichtbar und die Membranen konnten zwischen 38 kDa (GAPDH) und 48 kDa (GFAP) geteilt und die beiden Hälften separat entwickelt werden. Dazu wurden sie zuerst zur Blockierung

(= Absättigung elektrisch geladener Oberflächen der Proteine) in 5% Milchpulver (gelöst in PBS-T) für 1 h eingelegt und daraufhin mit den Primärantikörpern (anti-GAPDH oder anti-GFAP, 1:10.000 bzw. 1:1.000 in jeweils 3 ml Blockierungslösung verdünnt) für 24 h unter Schütteln im Kühlschrank inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte das Entfernen der Primärantikörper und die Spülung der Membranen (3x 10 min in PBS-T). Anschließend wurden die Membranen mit den Sekundärantikörpern (anti-goat-IgG mit Peroxidase gekoppelt, 1:2.500 in 3 ml Blockierungslösung verdünnt) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und danach erneut für 3x 10 min in PBS-T gewaschen.

5.4.5 Entwicklung

Da die Zweitantikörper mit einer Peroxidase gekoppelt waren, wurde für die Visualisierung der Proteinbanden am selben Tag ein ECL (*enhanced chemiluminescence*) Western Blot Substrat angesetzt, bei dessen enzymatischer Umsetzung durch Peroxidase Chemilumineszenz entsteht. Die Antikörper-bindenden Banden konnten dadurch in einer lichtsensitiven Photoentwicklungsmaschine (*EPI White Light*) mit Hilfe des *FusionCapt Advances Solo*-Programmes detektiert und fotografiert werden. Die zwei Komponenten des Substrats wurden im Verhältnis 1:1 angemischt. Die Membranen wurden anschließend hintereinander jeweils für 2 min mit dem Substrat bedeckt und danach entsprechend der Antikörper einzeln entwickelt, da die Sensitivität des ECL nachlässt.

5.4.6 Auswertung

Die Ergebnisse der Western Blots wurden mittels der ImageJ Software ausgewertet (Abb. 4). Die Intensitäten der Grauwerte der Banden wurden für die Quantifizierung der Expression genutzt. Als Ladungskontrolle diente das GAPDH bei 38 kDA. Für die Auswertung wurde für jede GFAP-Bande das Verhältnis zur zugehörigen GAPDH-Ladungskontrolle ermittelt und die resultierenden Werte als GFAP rel. GAPDH dargestellt. Jede Gewebeprobe wurde 2x, d.h. in zwei unabhängigen Western Blots, analysiert und aus den beiden Werten der Mittelwert ermittelt. Dieser Mittelwert ging in die statistische Auswertung ein (Abb. 4).

5.5. Immunhistochemie

5.5.1 Fixierung und Einfrieren der Gewebekulturen

Für die Immunhistochemie wurden die Gewebekulturen 24 oder 48 h nach *in vitro*-TBI aus dem Inkubator genommen und die Membranen kurz in PBS-Puffer getaucht, bevor 4% PFA-Lösung auf die Gewebekulturen gegeben wurden und sie zur Fixierung für 2h im Kühlschrank gelagert wurden. Anschließend folgte die Kryoprotektion, wofür die Membranen mit den Gewebekulturen in eine neue *Six-well* Schale transferiert, mit 25% Saccharose überschichtet und für mindestens 4 h bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt wurden. Zum Einfrieren der Gewebekulturen wurde wie folgt vorgegangen: Die Gewebekulturen wurden mit Hilfe eines feinen Pinsels von der Membran gelöst und auf 24x60 mm große Deckgläschen überführt. Die Kulturen eines Triplets wurden dabei stets auf dasselbe Deckgläschen transferiert und nachfolgendem Muster platziert (von links nach rechts): TBI, Kontrollgruppe (Ctl), TBI+E2. Die mit übertragene Saccharose-Lösung wurde mit einem Stück Zellstoff vorsichtig vom Deckgläschen entfernt, die Gewebekulturen wurden danach mit einem Tropfen Gefriermedium (*Tissue Tec*) bedeckt und auf Trockeneis platziert, bis das Gefriermedium und die Kulturen gefroren waren. Abschließend wurden die weißlich erscheinenden, die Kulturen bedeckenden Tropfen des Gefriermediums, um Verwechslungen auszuschließen, mit schwarzen Punkten markiert: Ein Punkt für Kulturen der TBI-Gruppe, zwei Punkte für solche der TBI+E2-Gruppe und kein Punkt für die Kontrollen. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Kulturen danach bei -80°C gelagert.

5.5.2 Gefrierschnitte

Für die mikroskopische Untersuchung wurden die eingefrorenen Kulturen mithilfe eines Kryostats (CryoStar, Eppredia) geschnitten. Dazu wurde der Tropfen Gefriermedium mit der die Kulturen enthaltenden planen Fläche nach oben in die Halterung eingespannt und bei einer Schneidetemperatur von -17°C wurden Schnitte von 20 µm Dicke hergestellt. Aus jeder Kultur konnten zwischen 3-6 Schnitte gewonnen werden. Diese wurden mithilfe eines Spatels in eine mit PBS gefüllte *Six-well*-Kulturschale überführt. Aus diesen wurden anschließend komplette Schnitte ausgesucht und mit Hilfe eines Pinsels und eines Tropfen *Aqua dest.* auf einen Objektträger übertragen. Auch bei diesem Schritt wurde darauf geachtet, dass Schnitte aus den

Kulturen eines Triplets auf denselben Objektträger gelangten und dort in reproduzierbarer Reihenfolge (von links nach rechts: TBI – Ctl – TBI+E2) angeordnet wurden. Abschließend wurden die Objektträger für 1-2 h bei Raumtemperatur getrocknet und danach bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren.

5.5.3 Immunhistochemisches Verfahren

Für die Immunhistochemie wurden die eingefrorenen Objektträger mit den Schnitten dem Gefrierschrank entnommen und für ca. 30 min an die Raumtemperatur äquilibriert, dann in eine Küvette mit 4% PFA eingestellt und die Schnitte für 5 min nachfixiert. Es folgte eine Waschung der Schnitte für 10 min mit PBS. Danach wurden die Objektträger in eine feuchte Kammer überführt (eine Plastikkammer mit wassergetränkten Tüchern) und mit Präinkubationslösung (250 µl pro Objektträger) überschichtet. Nach ca. 30 min Präinkubation erfolgte die Inkubation mit den Primärantikörpern. Dazu wurde die bisherige Lösung durch neue Präinkubationslösung ersetzt, der jedoch die Primärantikörper *rabbit* anti-GFAP (in einer Verdünnung von 1:800) und *mouse* anti-NeuN (in einer Verdünnung von 1:400) zugesetzt waren. Pro Objektträger wurden wieder 250 µl Lösung verwendet und darauf geachtet, dass die Lösung die Schnitte gleichmäßig und vollständig benetzt. Die Inkubation erfolgte über Nacht.

Am folgenden Tag wurden die Objektträger zuerst in Küvetten überführt und für 2x 10 min in PBS gewaschen. Danach erfolgte die Inkubation mit den Zweitantikörpern. Dazu wurden Antikörper gegen Maus (*goat*-anti-*mouse*-IgG, mit Alexa 488 markiert) und gegen Kaninchen-Immunglobuline (*donkey*-anti-*rabbit*-IgG mit Alexa 647 markiert) jeweils 1:500 in PBS verdünnt und die Objektträger wieder mit je 250 µl dieser Lösung überschichtet. Die Inkubation erfolgte für 3 h in der feuchten Kammer. Danach wurden die Schnitte ein weiteres Mal in PBS für 10 min gewaschen, anschließend für eine Minute mit 250 µl DAPI-Lösung (1:1.000.000 in PBS) überschichtet und nach einer finalen Waschung in PBS (10 min) kurz in *Aqua dest.* getaucht, um abschließend vor Licht geschützt an der Luft zu trocknen. Nach erfolgter Trocknung wurden 2-3 Tropfen Einbettmedium auf die Objektträger gegeben und die Schnitte mit einem Deckglas bedeckt.

5.5.4 Mikroskopie und Aufnahmen der Gewebekulturen

Die Objektträger wurden mit Hilfe eines Keyence Biorevo BZ 9000-Fluorescence-Mikroskops untersucht und die histochemischen Färbungen damit photographisch dokumentiert. Dazu wurden die Kulturschnitte unter 100x Vergrößerung aufgesucht und unter 200x Vergrößerung Aufnahmen aus der CA1-Region erstellt. Zur Bestimmung der CA1-Region wurde zuerst das Körnerzellband aufgesucht und oberhalb seines suprapyramidalen Anteils der Aufnahmebereich festgelegt. Als Begrenzung zum Gyrus dentatus diente die hippocampale Fissur, die in der Regel durch eine Konzentration an Zellen zu identifizieren war. Von der ausgewählten Stelle wurden danach 4 Aufnahmen angefertigt: Mit Blaufilter (358 nm Anregung) zur Darstellung der DAPI-Färbung, mit Grünfilter (495 nm Anregung) zur Darstellung der NeuN-Immunhistochemie, mit Rotfilter (546 nm Anregung) zur Darstellung von Propidiumiodid (PI) und mit Ultrarotfilter (647 nm Anregung) zur Darstellung der GFAP-Immunhistochemie (siehe Abb. 5). Die dabei verwendeten Einstellungen (z. B. Belichtungszeiten) wurden für alle Aufnahmen eines Kulturtriplets identisch beibehalten. Diese Aufnahmen wurden, um eine verblindete Auswertung zu gewährleisten, nicht von mir selbst, sondern von einem Mitarbeiter des Instituts für Neuroanatomie gemacht. Nur wenn von jeder der experimentellen Gruppen auf dem Objektträger (d. h. eines Triplets) mindestens eine verwertbare Aufnahme zur Verfügung stand, wurden die Bilder zur Auswertung an mich weitergegeben. Dazu wurden die Bilder durch einen Code verschlüsselt und die Verschlüsselung erst nach der quantitativen Auswertung gelüftet.

5.6 Auswertung

Die Auswertung der Bilder wurde mittels ImageJ Software durchgeführt. Als Vorbereitung auf die Erhebung der Daten war es notwendig, die Bilddateien der zusammengehörenden Bilder (angefärbt für GFAP, NeuN, PI) auf dieselbe Pixel-Größe von 0.05329 μm und die Bit-Tiefe auf 16bit einzustellen. Anschließend wurden mit Hilfe der DAPI- oder der NeuN-Färbung das Stratum pyramidale und das Stratum radiatum/lacunosum-moleculare sowie der gesamte Bereich der im Bild enthaltenen CA1-Region definiert. Im Folgenden wurden die dadurch definierten Bereiche auf das GFAP-abbildende und das PI-abbildende Bild übertragen. In den GFAP-abbildenden Bildern konnte danach die Intensität der GFAP-Immunfärbung als Indikator für die Astrozytenaktivität in den einzelnen Strata per ImageJ bestimmt werden, während auf dem PI-abbildenden Bild die PI positiven Zellen direkt gezählt wurden.

5.7 Statistische Analyse

Bei der Auswertung wurden stets die Daten innerhalb eines Triplets miteinander verglichen und dabei eine Paarung („*Matching*“) der Werte angenommen, da benachbarte Hippocampusschnitte als annähernd identisch angesehen werden können (siehe z. B. Meseke et al., 2019). Folglich kamen für die statistische Analyse (bei 3 experimentellen Gruppen) entweder die *Repeated Measures (RM) One-Way-ANOVA* bei normal verteilten Werten oder der Friedman-Test bei nicht normal verteilten Werten in Frage. Für eine Entscheidung über eine Normalverteilung der Werte wurde der Kolmogorow-Smirnow-Test eingesetzt. Für Post-hoc Analysen wurden entweder der Holm-Sidak-Test (bei normal verteilten Daten) oder der Dunn's *Multiple Comparison* Test (bei nicht normal verteilten Daten) verwendet. Das Signifikanzniveau wurde bei $p < 0,05$ festgelegt. Die Daten werden in Form von Balkendiagrammen graphisch dargestellt. Zusätzlich wurden mit ihnen zur statistischen Untersuchung von Geschlechtsunterschieden *Two-Way-ANOVA* mit den Faktoren „Sex“ (männlich, weiblich) und „Treatment“ (Ctl, TBI, TBI+E2) durchgeführt.

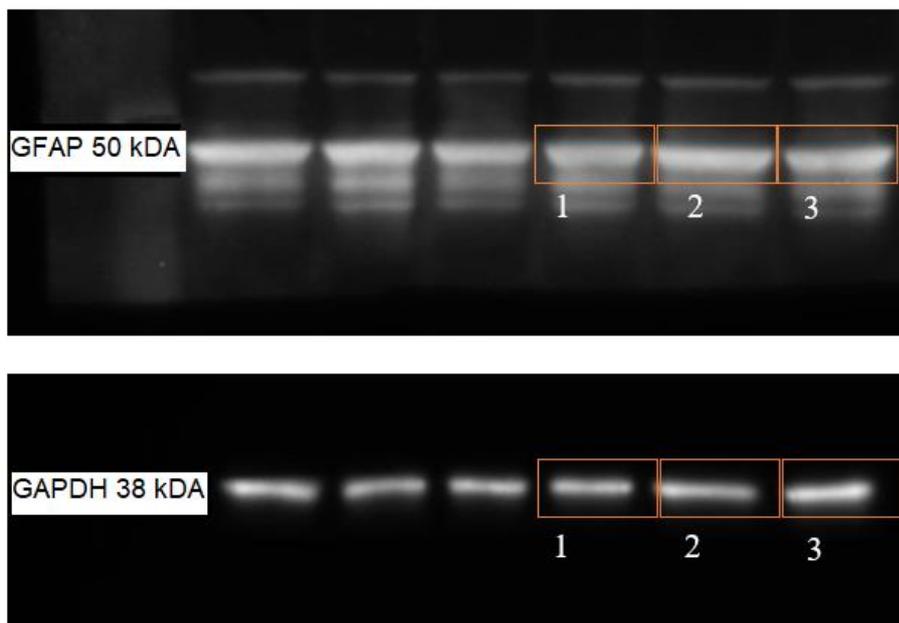
Für die Korrelationsanalyse wurden zuerst für alle Triplets die Differenzen der TBI- bzw. TBI+E2-Werte zu ihren jeweiligen Kontrollen in den GFAP- und PI-Analysen ermittelt. Anschließend wurde die Korrelationswahrscheinlichkeit der PI-Differenzen und der GFAP-Differenzen durch Ermittlung des Pearson-Koeffizienten (r) bestimmt. Dieser Koeffizient erkennt lineare Zusammenhänge zweier Variablen. Er liegt stets zwischen 1 und -1. Ist er positiv, spricht dies für eine positive Korrelation der verglichenen Parameter, ist er negativ für eine negative. Die Daten werden in Form von Streudiagrammen graphisch dargestellt.

6. Ergebnisse

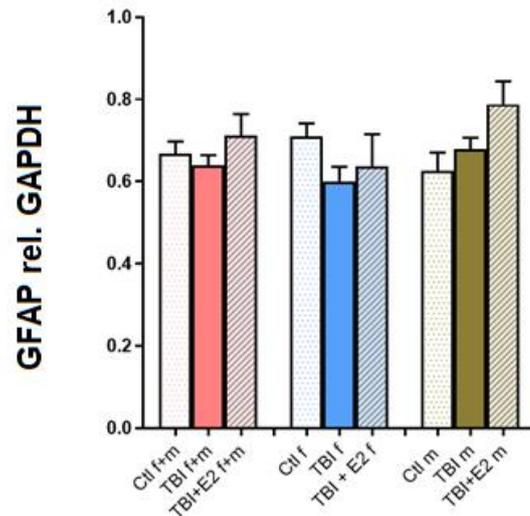
6.1 Nachweis der hippocampalen GFAP-Expression nach *in vitro*-TBI mit dem Western Blot-Verfahren

Um einen Gesamteindruck über die Auswirkungen einer *in vitro*-TBI auf die Expression von GFAP im Hippocampus zu erhalten, wurde das Western Blot-Verfahren eingesetzt. Bei diesem Verfahren wurde die GFAP-Expression in der gesamten Hippocampuskultur untersucht. Eine Differenzierung nach einzelnen Regionen oder Schichten war damit nicht möglich. Untersucht wurde die Expression 24 h nach erfolgter *in vitro*-TBI, weil die Ergebnisse früherer Studien (Hemmat, 2022) und Pilotdaten der GFAP-Immunhistochemie zu diesem Zeitpunkt eine Reaktion vermuten ließen. Jedoch ergab die Quantifizierung der GFAP-Expression 24 h nach *in vitro*-TBI keine Hinweise auf eine signifikante GFAP-Expressionsänderung. Auch zwischen den Geschlechtern waren keine Unterschiede erkennbar. Die Ergebnisse dieser Auswertung finden sich in der nachfolgenden Abbildung 4.

A



B



hippocampale GFAP Expression	Ctf f+m	TBI f+m	TBI+ E2 f+m
N	10	10	10
Mittelwert	0,690	0,640	0,712
Standardabweichung	0,092	0,080	0,164
Standardfehler	0,030	0,030	0,052
RM One-way ANOVA: p=0,4297, F=0,7827 (f+m)			

hippocampale GFAP Expression	Ctf f	TBI f	TBI+E2 f
N	5	5	5
Mittelwert	0,710	0,600	0,640
Standardabweichung	0,070	0,080	0,180
Standardfehler	0,031	0,040	0,080
RM One-way ANOVA: p=0,3758, F=1,030 (f)			

hippocampale GFAP Expression	Ctl m	TBI m	TBI+E2 m
N	5	5	5
Mittelwert	0,630	0,680	0,790
Standardabweichung	0,100	0,063	0,130
Standardfehler	0,044	0,030	0,056
RM One-way ANOVA: p=0,1767, F=2,365 (m)			

Abbildung 4: A) Repräsentative Western Blot Banden für GFAP (50 kDa) und die Ladungskontrolle GAPDH (38 kDa). Die Western Blots zeigten für GFAP regelhaft mehrere Banden unterschiedlicher Stärke. In die Auswertung einbezogen wurde nur die oberste, nahe 50 kDa verlaufende Bande, die dem Molekulargewicht von GFAP entspricht B) Grafische Darstellung und statistische Auswertung der GFAP-Expression in hippocampalen Kulturen 24 h nach in vitro-TBI, analysiert mithilfe des Western Blot Verfahrens. Gezeigt sind Balkendiagramme, in denen die Kontrollgruppe jeweils hell gepunktet, die TBI-Gruppe farbig und die TBI+E2-Gruppe farbig gestreift hervorgehoben sind. Beide Geschlechter zusammen (f+m) sind mit roter, nur die weiblichen Kulturen (f) mit blauer und nur die männlichen (m) mit grüner Farbe unterlegt. Im Anschluss folgen die statistischen Daten. Es fanden sich keine statistisch signifikanten Unterschiede.

6.2. Histochemische Darstellung der PI-Aufnahme und der GFAP-Expression in CA1

Zur spezifischeren Untersuchung der Astrozytenreaktion nach *in vitro*-TBI wurden histochemische Verfahren angewandt und die Untersuchung konzentrierte sich auf die CA1-Region, in der speziell die Pyramidenzellschicht (Stratum pyramidale, SP) und die benachbarten Schichten Stratum radiatum und lacunosum-moleculare (zusammengefasst zu SR/SLM) analysiert wurden. Bestimmt wurde dabei die Dichte der Zellen, die den Nukleinsäure-Interkalator Propidiumiodid (PI) aufgenommen hatten sowie die Intensität der GFAP-Expression, die mittels gegen GFAP gerichteter Antikörper dargestellt wurde. Abb. 5 zeigt beispielhaft die CA1-Region einer hippocampalen Gewebekultur mit Färbungen für NeuN und GFAP. Abb. 6 zeigt exemplarisch Aufnahmen aus einem Kulturtriplet, wie sie zur Auswertung verwendet wurden.

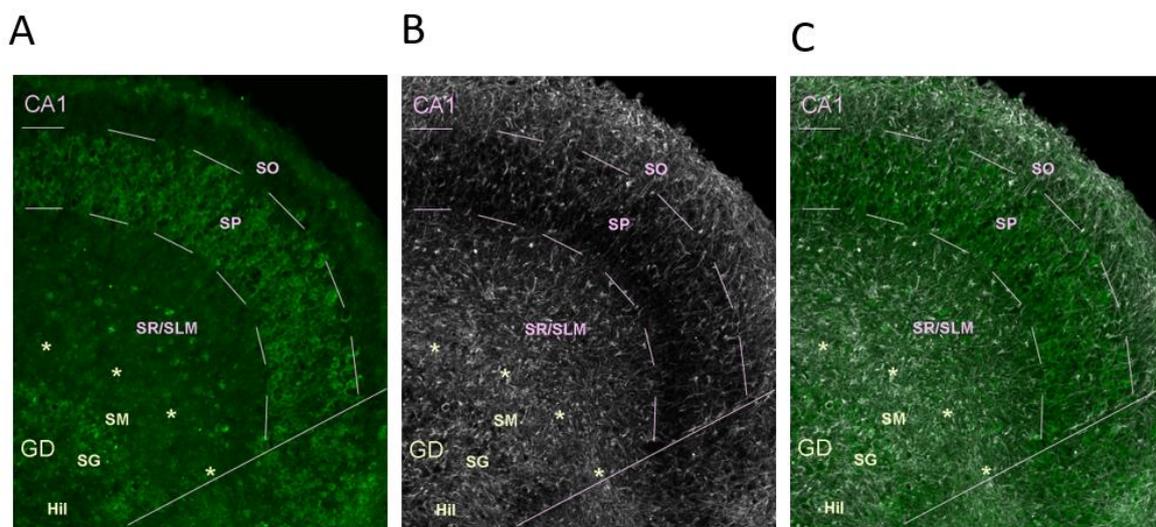


Abbildung 5: Ausschnitt aus einer hippocampalen Gewebekultur (P7/DIV15) mit der CA1-Region und dem Gyrus dentatus (GD). Dargestellt sind die Schichten in CA1 (rosa): SO = Stratum oriens, SP = Stratum pyramidale, SR/SLM = Stratum radiatum + Stratum lacunosum-moleculare, und im GD (gelb): SM = Stratum moleculare, SG = Stratum granulosum (Körnerzellschicht), Hil = Hilus. Erläuterung der Markierungen: *bezeichnen die hippocampale Fissur, die Trennlinie zwischen CA1 und GD. Die unterbrochenen Linien grenzen das SP vom darüber liegenden SO und den darunter liegenden Schichten SR und SLM ab. Die Auswertung erfolgte in der CA1-Region (nur SP und SR/SLM), welche definiert wurde als „die Region oberhalb des oberen (suprapyramidalen) Bandes der Körnerzellschicht“. Die durchgezogene Linie markiert die Grenzlinie zu CA2/CA3. A: NeuN; B: GFAP; C: GFAP+NeuN

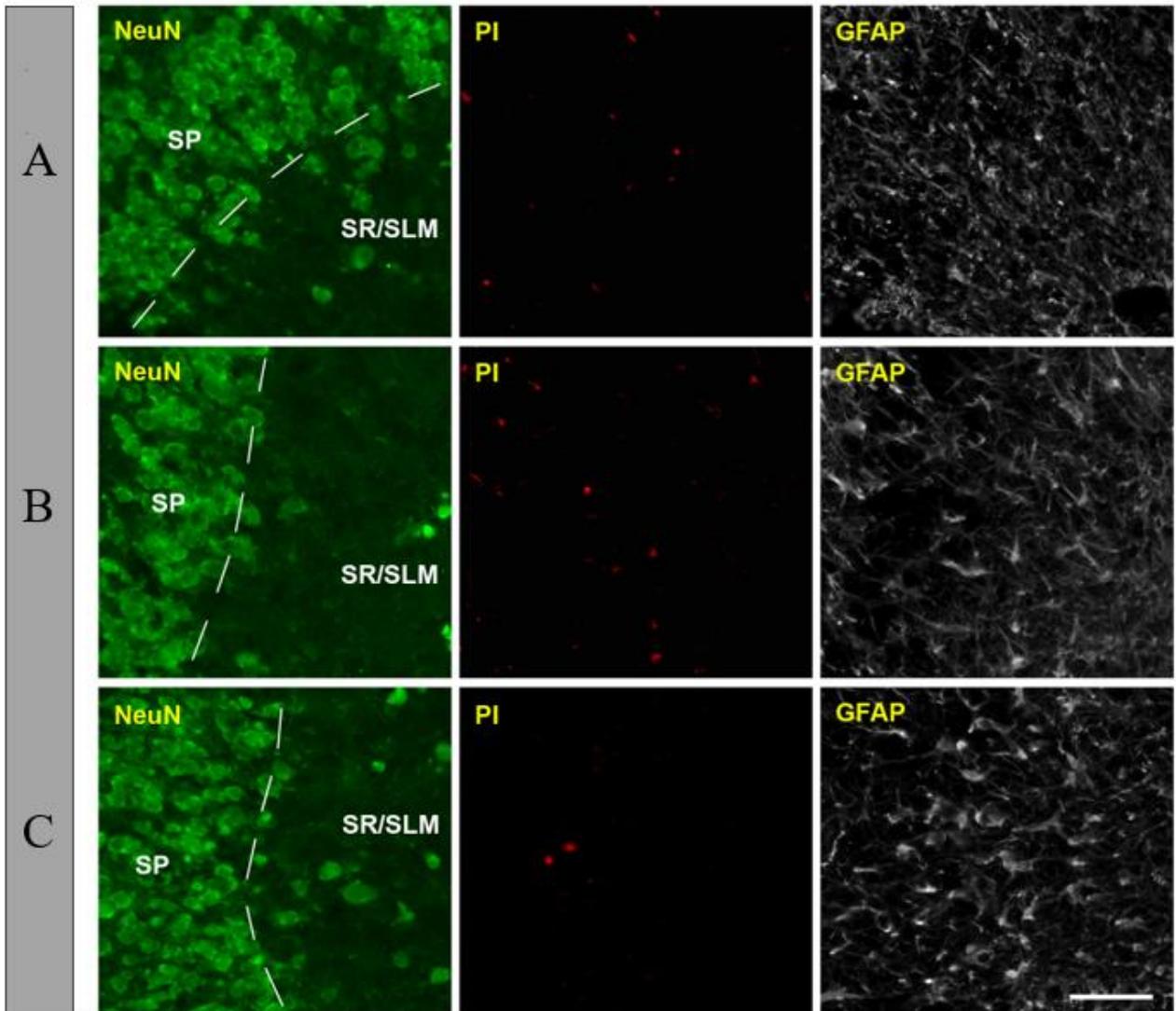


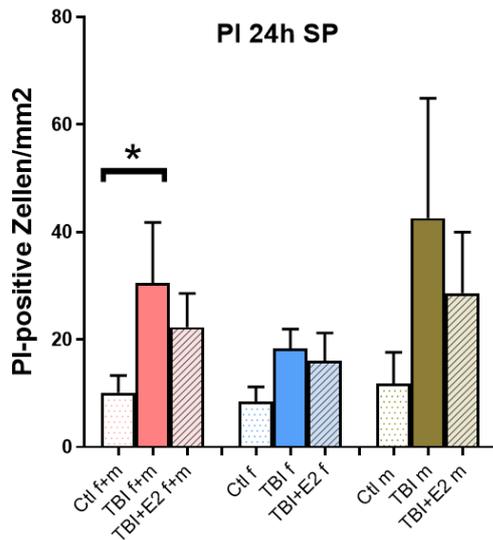
Abbildung 6: Detailaufnahmen aus Schnitten eines Kultur-Triplets. Dargestellt ist jeweils ein exemplarischer Ausschnitt aus dem Stratum pyramidale (SP; am Übergang zu den Strata radiatum/lacunosum-moleculare, SR/SLM) nach 495 nm Anregung (NeuN, links), 546 nm Anregung (PI, mittig) und 647 nm Anregung (GFAP, rechts) aus der Kontrollkultur (A), der TBI-behandelten Kultur (B) und der TBI-E2 Kultur C).

6.3. Bestimmung der Zell-Viabilität nach *in vitro*-TBI in der CA1 Region

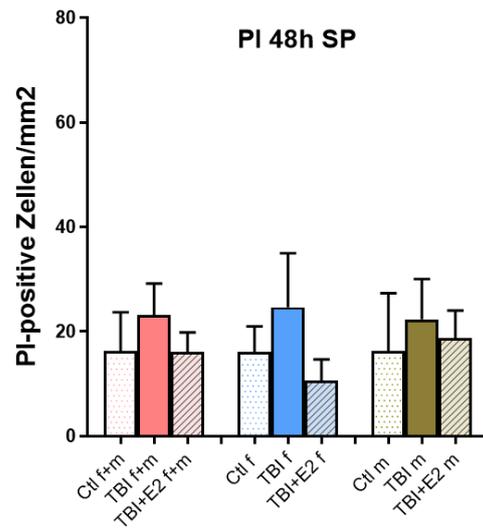
Zur Bestimmung der Zell-Viabilität wurde direkt im Anschluss an die *in vitro*-TBI Propidiumiodid (PI) dem Kulturmedium zugegeben. PI kann in Zellen nur eindringen, wenn die Zellmembran geschädigt ist. Es kann daher zur Bewertung des aus der mechanischen Schädigung resultierenden Zelltods eingesetzt werden. Die quantitative Ermittlung der Dichte PI-positiver Zellen (PI-Zellen/mm²) ergab tatsächlich eine signifikante Steigerung nach 24 h in der TBI-Gruppe, jedoch nur im Stratum pyramidale (SP) und nur wenn alle Kulturen (männliche und weibliche) gemeinsam betrachtet wurden (Abb. 7A). Wurden die Geschlechter getrennt betrachtet, schien die PI-Dichte in den männlichen Kulturen zwar etwas höher zu sein. Der Unterschied erreichte jedoch nicht das Signifikanzniveau (Abb. 7A). Auch in der TBI+E2-Gruppe war die PI-Dichte im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht, jedoch ebenfalls ohne Signifikanzniveau zu erreichen (Abb. 7A). 48 h nach *in vitro*-TBI war die PI-Dichte in keiner der experimentellen Gruppen mehr signifikant erhöht und die Werte in der TBI-Gruppe hatten nahezu das Kontrollniveau erreicht (Abb. 7B). Wurde dieselbe Bestimmung in den Strata radiatum und lacunosum-moleculare (SR/SLM) durchgeführt, so war weder nach 24 h (Abb. 8A), noch nach 48 h (Abb. 8B) ein Unterschied zwischen den experimentellen Gruppen festzustellen.

Auf Grundlage dieser Daten kann vermutet werden, dass 24 h nach *in vitro*-TBI ein Maximum der Zellschädigung erreicht wird. Dieser Befund entspricht auch den Ergebnissen von Hemmat (Hemmat, 2022). Diese Zellschädigung scheint bevorzugt im Stratum pyramidale und weniger in den Strata radiatum und lacunosum-moleculare aufzutreten, was jedoch auch damit zu tun haben könnte, dass die Zelldichte in diesen Strata wesentlich geringer ist und somit statistisch weniger Zellen betroffen sein können. Kein klares Ergebnis liegt bezüglich einer möglichen Wirkung von E2 vor. Zwar war die PI-Dichte in der TBI+E2-Gruppe jeweils etwas geringer als in der TBI-Gruppe. Jedoch waren die Daten weder im Vergleich zur TBI- noch im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant unterschiedlich.

A



B

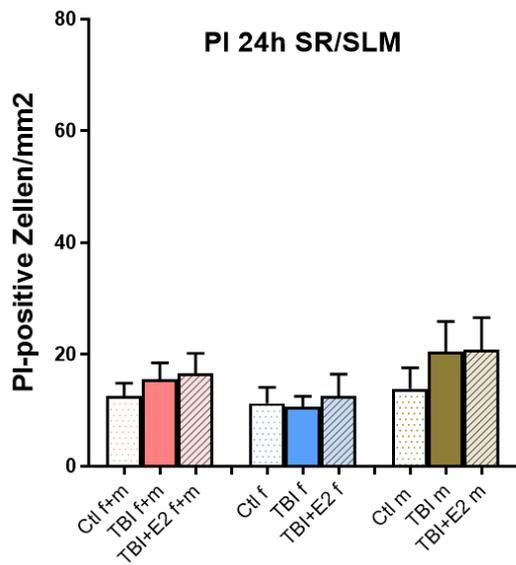


PI positive Zellen in SP, 24h	Ctf f+m	TBI f+m	TBI+ E2 f+m	Ctf f	TBI f	TBI+E2 f	Ctl m	TBI m	TBI+E2 m
N	26	26	26	13	13	13	13	13	13
Mittelwert	10,15	30,46	22,35	8,46	18,31	16,08	11,85	42,62	28,62
Standardabweichung	16,09	57,77	31,79	9,8	13,19	18,61	20,91	80,37	40,92
Standardfehler	3,16	11,33	6,23	2,72	3,66	5,16	5,8	22,29	11,35
<p>$f+m$: $p=0,0152/8,374$ (Friedman-Test) f: $p=0,1798$, $F=1,852$ (RM One-way ANOVA) m: $p=0,0533/5,864$ (Friedman-Test) post-hoc (Dunn's): 0,0205 (Ctl f+m vs. TBI f+m)</p>									

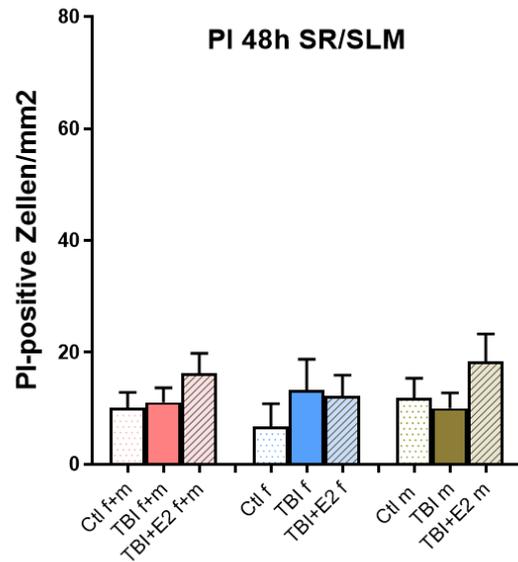
PI positive Zellen in SP, 48h	Ctf f+m	TBI f+m	TBI+ E2 f+m	Ctf f	TBI f	TBI+E2 f	Ctl m	TBI m	TBI+E2 m
N	27	27	27	9	9	9	18	18	18
Mittelwert	16,22	23,11	16	16	24,67	10,56	16,33	22,33	18,72
Standardabweichung	38,66	31,54	19,88	14,91	30,90	12,33	46,70	32,72	22,57
Standardfehler	7,44	6,07	3,83	4,97	10,3	4,11	11,01	7,71	5,32
<p>$f+m$: $p=0,3597/2,045$ (Friedman-Test) f: $p=0,8369/0,5000$ (Friedman-Test) m: $p=0,2523/ 2,754$ (Friedman-Test)</p>									

Abbildung 7: Grafische Darstellung und statistische Auswertung der PI positiven Zellen im Stratum pyramidale (SP) 24h (A) und 48h (B) nach in vitro TBI. Gezeigt sind Balkendiagramme, in denen die Kontrollgruppe jeweils hell gepunktet, die TBI-Gruppe farbig und die TBI+E2-Gruppe farbig gestreift hervorgehoben sind. Beide Geschlechter zusammen (f+m) sind mit roter, nur die weiblichen Kulturen (f) mit blauer und nur die männlichen (m) mit grüner Farbe unterlegt. Im Anschluss folgen die statistischen Daten.

A



B



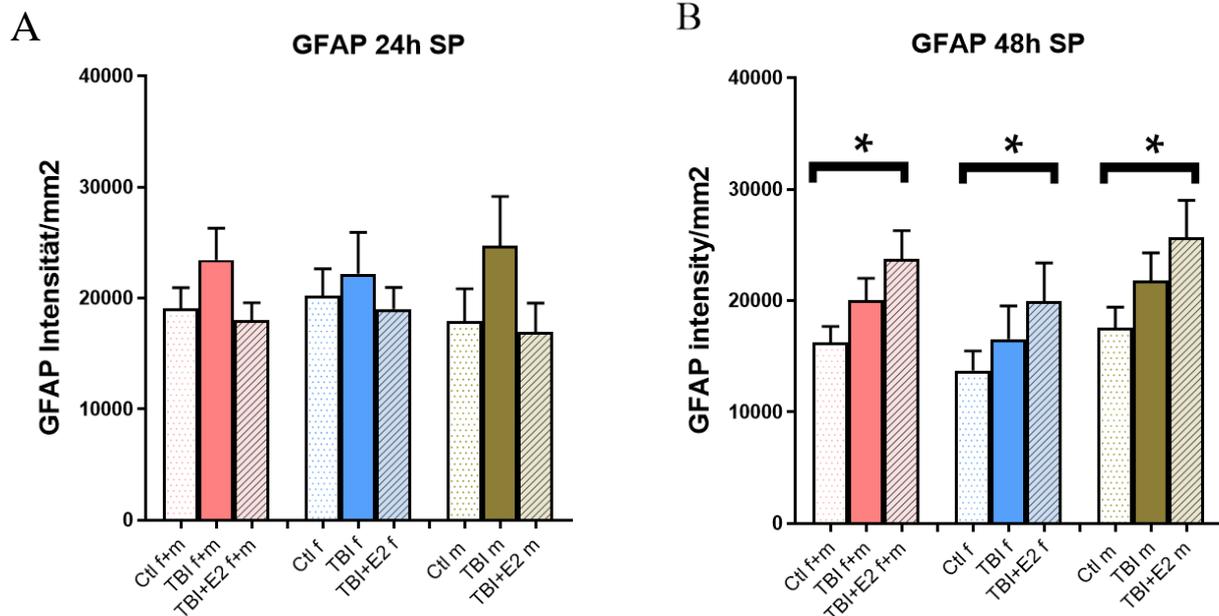
PI positive Zellen in SR/SLM, 24h	Ctf f+m	TBI f+m	TBI+ E2 f+m	Ctf f	TBI f	TBI+E2 f	Ctl m	TBI m	TBI+E2 m
N	26	26	26	13	13	13	13	13	13
Mittelwert	12,54	15,54	16,65	11,23	10,62	12,54	13,85	20,46	20,77
Standardabweichung	11,94	15,20	18,00	10,43	6,81	14,19	13,59	19,55	20,91
Standardfehler	2,34	2,98	3,53	2,89	1,89	3,94	3,77	5,42	5,8
<p>$f+m$: $p=0,7216/0,6526$ (Friedman-Test) f: $p=0,8954$, $F=0,09640$ (RM One-way ANOVA) m: $p=0,2381$, $F=1,528$ (Friedman-Test)</p>									

PI positive Zellen in SR/SLM, 48h	Ctf f+m	TBI f+m	TBI+ E2 f+m	Ctf f	TBI f	TBI+E2 f	Ctl m	TBI m	TBI+E2 m
N	27	27	27	9	9	9	18	18	18
Mittelwert	10,11	11,07	16,33	6,78	13,22	12,22	11,78	10	18,39
Standardabweichung	14,30	13,37	18,23	12,05	16,66	11,17	15,35	11,80	20,89
Standardfehler	2,75	2,57	3,51	4,02	5,55	3,72	3,62	2,78	4,92
<p>$f+m$: $p=0,0839/4,956$ (Friedman-Test) f: $p=0,1823/3,467$ (Friedman-Test) m: $p=0,3618/2,033$ (Friedman-Test)</p>									

Abbildung 8: Grafische Darstellung und statistische Auswertung der PI positiven Zellen in den Strata radiatum und lacunosum-moleculare (SR/SLM) 24h (A) und 48h (B) nach in vitro TBI. Gezeigt sind Balkendiagramme, in denen die Kontrollgruppe jeweils hell gepunktet, die TBI-Gruppe farbig und die TBI+E2-Gruppe farbig gestreift hervorgehoben sind. Beide Geschlechter zusammen (f+m) sind mit roter, nur die weiblichen Kulturen (f) mit blauer und nur die männlichen (m) mit grüner Farbe unterlegt. Im Anschluss folgen die statistischen Daten.

6.4. Bestimmung der GFAP-Intensität als Indikator für Astrozytenaktivierung

Die Auswirkung der *in vitro*-TBI auf die Astrozyten wurde anhand der Intensität der GFAP-Expression in der CA1-Region (spezifisch in SP und SR/SLM) bewertet. Dafür wurden die Folgen der TBI nach 24 h und 48 h beurteilt. Dabei wurde nach 24 h zwar eine etwas erhöhte GFAP-Intensität beobachtet, jedoch waren zu diesem Zeitpunkt die Unterschiede zwischen den experimentellen Gruppen weder im SP (Abb 9A) noch im SR/SLM (Abb. 10A) signifikant. Hingegen war nach 48 h eine Veränderung nachweisbar. Bemerkenswerterweise waren hier im SP die Werte der TBI+E2-Gruppe besonders erhöht und von den Kontrollwerten signifikant unterschiedlich (Abb. 9B). Auch die Werte in der TBI-Gruppe waren erhöht, ohne jedoch signifikant von den anderen Gruppen zu differieren. Im SR/SLM waren hingegen keine Unterschiede zwischen den experimentellen Gruppen zu erkennen (Abb. 10B).

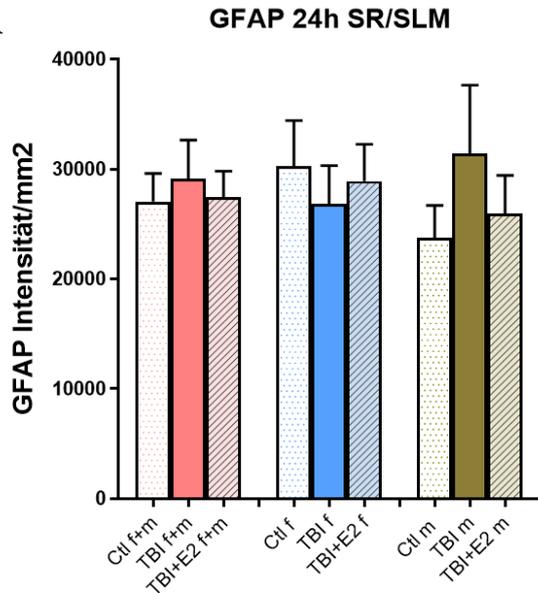


GFAP Intensität in SP, 24h	Ctf f+m	TBI f+m	TBI+ E2 f+m	Ctf f	TBI f	TBI+E2 f	Ctl m	TBI m	TBI+E2 m
N	26	26	26	13	13	13	13	13	13
Mittelwert	19086	23445	17974	20242	22186	19007	17929	24703	16942
Standardabweichung	9478	14555	8181	8628	13462	7045	10478	16022	9354
Standardfehler	1859	2855	1604	2393	3734	1954	2906	4444	2594
<p><i>f+m</i>: $p=0,0680$, $F=2,887$ (RM One-way ANOVA) <i>f</i>: $p=0,5404$, $F=0,5151$ (RM One-way ANOVA) <i>m</i>: $p=0,2319/2,923$ (Friedman-Test)</p>									

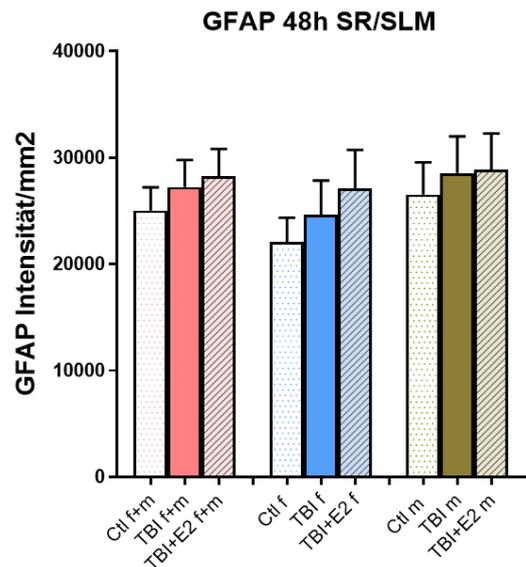
GFAP Intensität in SP, 48h	Ctf f+m	TBI f+m	TBI+ E2 f+m	Ctf f	TBI f	TBI+E2 f	Ctl m	TBI m	TBI+E2 m
N	27	27	27	9	9	9	18	18	18
Mittelwert	16272	20026	23767	13722	16536	19923	17548	21771	25689
Standardabweichung	7295	10283	13076	5265	8966	10371	7949	10688	14113
Standardfehler	1404	1979	2517	1755	2989	3457	1874	2519	3326
<p><i>f+m</i>: $p=0,0002/16,67$ (Friedman-Test) <i>f</i>: $p=0,0190/8,000$ (Friedman-Test) <i>m</i>: $p=0,0168$, $F=5,270$ (RM One-way ANOVA)</p> <p>post-hoc (Dunn's): $p=0,0001$ (Ctl f+m vs. TBI+E2 f+m); $p=0,0140$ (Ctl f vs. TBI+E2 f) post-hoc (Holm-Sidak): $p=0,0106$ (Ctl m vs. TBI+E2 m)</p>									

Abbildung 9: Grafische Darstellung und statistische Auswertung der GFAP-Intensität im Stratum pyramidale (SP) 24h (A) und 48h (B) nach in vitro TBI. Gezeigt sind Balkendiagramme, in denen die Kontrollgruppe jeweils hell gepunktet, die TBI-Gruppe farbig und die TBI+E2-Gruppe farbig gestreift hervorgehoben sind. Beide Geschlechter zusammen (f+m) sind mit roter, nur die weiblichen Kulturen (f) mit blauer und nur die männlichen (m) mit grüner Farbe unterlegt. Im Anschluss folgen die statistischen Daten.

A



B



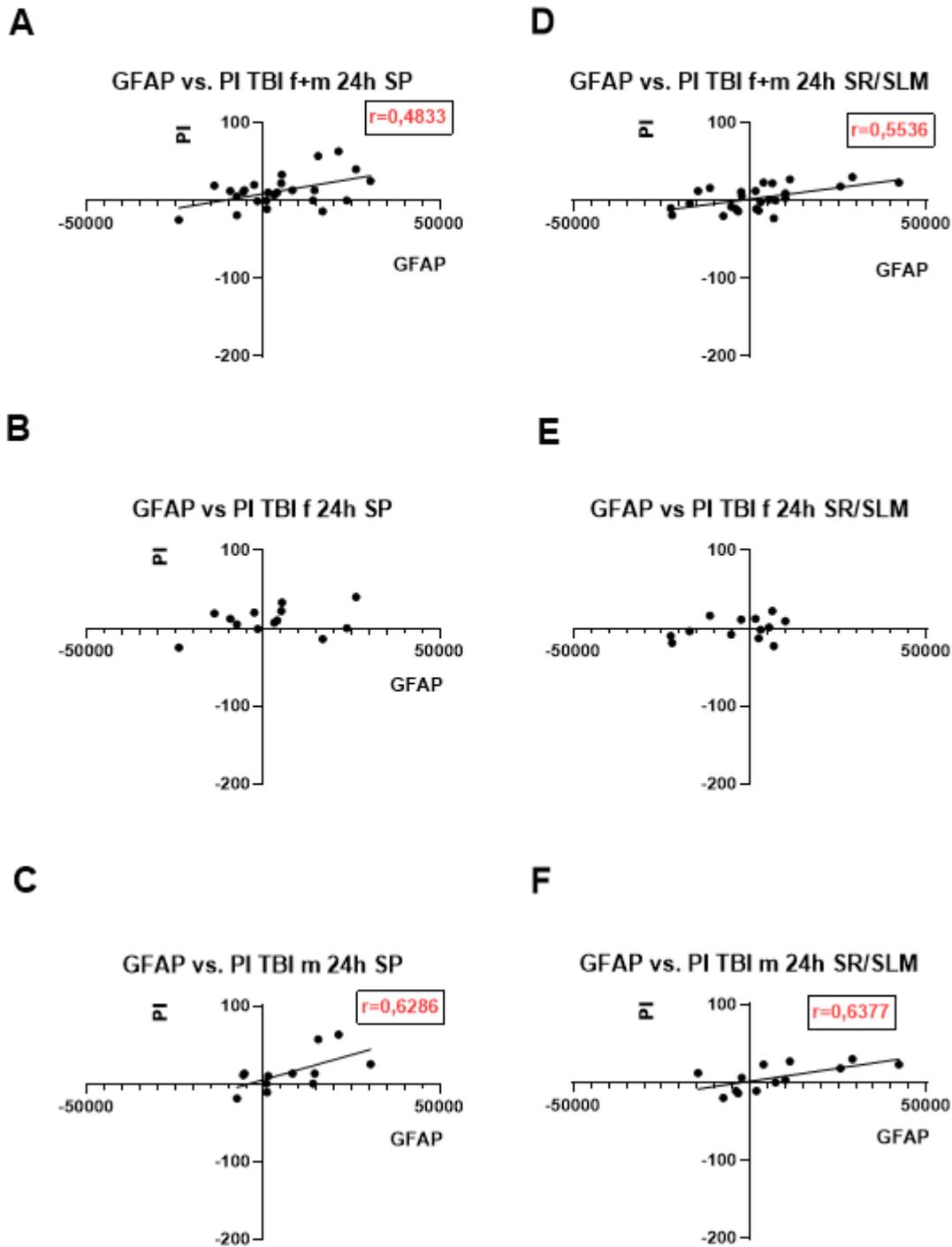
GFAP Intensität in SR/SLM, 24h	Ctf f+m	TBI f+m	TBI+ E2 f+m	Ctf f	TBI f	TBI+E2 f	Ctl m	TBI m	TBI+E2 m
N	26	26	26	13	13	13	13	13	13
Mittelwert	27029	29125	27410	30295	26841	28893	23762	31409	25927
Standardabweichung	13079	17993	12269	14864	12530	12186	10597	22498	12661
Standardfehler	2565	3529	2406	4123	3475	3380	2939	6240	3512
<p><i>f+m</i>: $p=0,7640/0,5385$ (Friedman-Test) <i>f</i>: $p=0,5836/1,077$ (Friedman-Test) <i>m</i>: $p=0,5270, F=0,6021$ (RM One-way ANOVA)</p>									

GFAP Intensität in SR/SLM, 48h	Ctf f+m	TBI f+m	TBI+ E2 f+m	Ctf f	TBI f	TBI+E2 f	Ctl m	TBI m	TBI+E2 m
N	27	27	27	9	9	9	18	18	18
Mittelwert	25036	27235	28262	22066	24644	27124	26522	28531	28832
Standardabweichung	11270	13129	13227	6849	9604	10809	12852	14659	14545
Standardfehler	2169	2527	2545	2283	3201	3603	3029	3455	3428
<p><i>f+m</i>: $p=0,2554, F=1,403$ (RM One-way ANOVA) <i>f</i>: $p=0,3134; F=1,239$ (RM One-way ANOVA) <i>m</i>: $p=0,5982, F=0,4950$ (RM One-way ANOVA)</p>									

Abbildung 10: Grafische Darstellung und statistische Auswertung der GFAP-Intensität in den Strata radiatum und lacunosum-moleculare (SR/SLM) 24h (A) und 48h (B) nach *in vitro* TBI. Gezeigt sind Balkendiagramme, in denen die Kontrollgruppe jeweils hell gepunktet, die TBI-Gruppe farbig und die TBI+E2-Gruppe farbig gestreift hervorgehoben sind. Beide Geschlechter zusammen (f+m) sind mit roter, nur die weiblichen Kulturen (f) mit blauer und nur die männlichen (m) mit grüner Farbe unterlegt. Im Anschluss folgen die statistischen Daten.

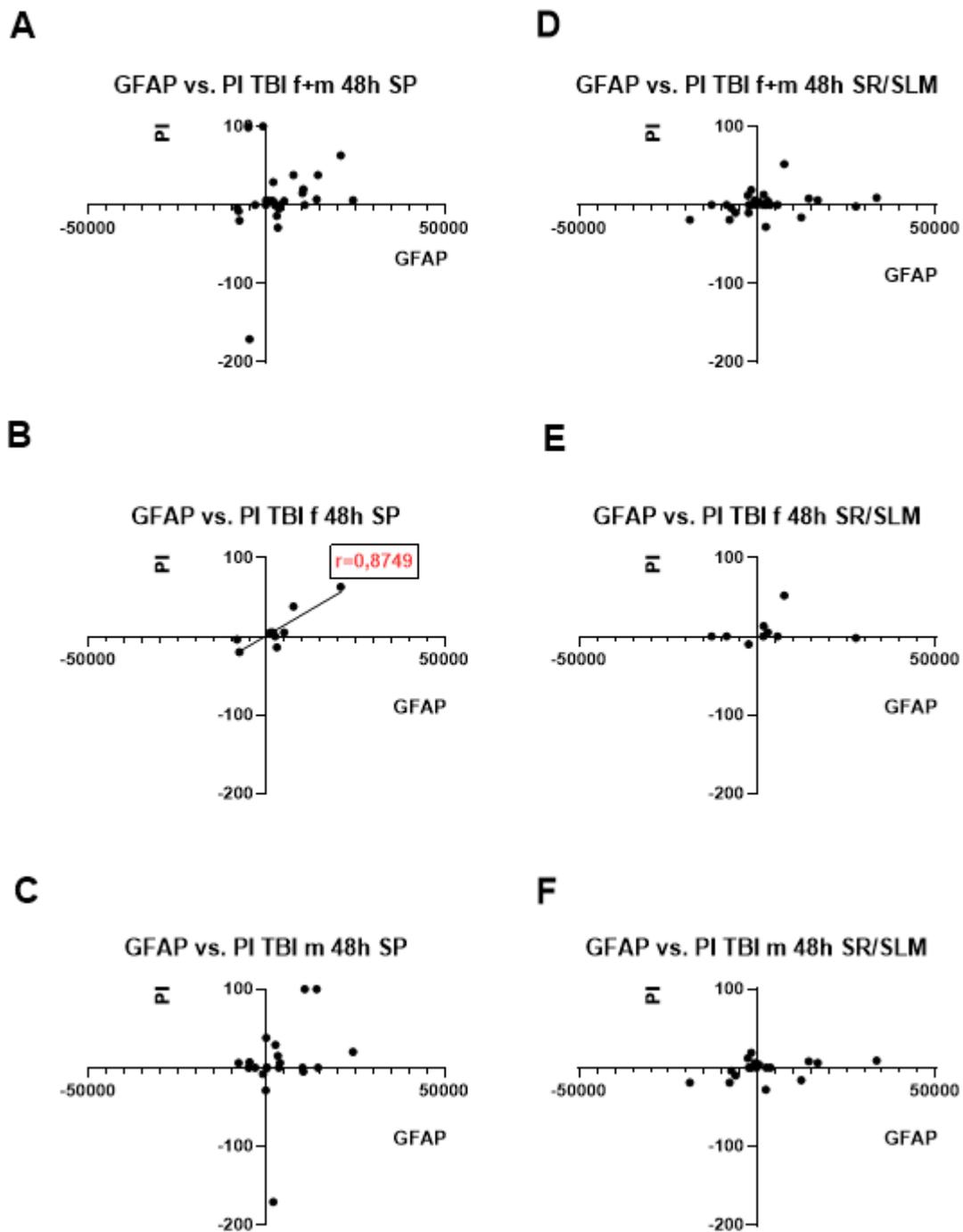
6.5. Korrelieren die GFAP-Intensität und die PI-Aufnahme nach *in vitro*-TBI in der CA1 Region?

Die bisherigen Resultate lassen auf einen eher geringfügigen Effekt der *in vitro*-TBI auf die Astrozyten schließen, da nur im SP nach 48 h eine signifikante Erhöhung der GFAP-Expression nachweisbar war und dies auch nur in der TBI+E2-Gruppe. Zwar waren auch in der TBI-Gruppe die Werte im Vergleich zu den Kontrollen erhöht, die Unterschiede erreichten hier jedoch nicht das Signifikanzniveau. An dieser Stelle stellte sich jedoch die Frage, ob eine Astrozytenreaktion mit erhöhter GFAP-Expression möglicherweise nur lokal in der Umgebung absterbender Zellen auftritt und diese Änderung bei einer Gesamtbetrachtung der Region nicht stark ins Gewicht fällt. Um dieser Hypothese nachzugehen, wurde der Korrelationskoeffizient zwischen PI-Aufnahme und GFAP-Intensität bestimmt. D. h. es wurde untersucht, inwieweit eine erhöhte PI-Aufnahme in den Kulturen nach *in vitro*-TBI mit einer verstärkten GFAP-Intensität korreliert. Dazu wurde in jedem Triplet für die PI-Aufnahme und die GFAP-Intensität der Unterschied zwischen der TBI- bzw. der TBI+E2-Kultur und der Kontrollkultur errechnet und die PI- bzw. GFAP-Werte in einer Korrelationsmatrix (GraphPad) gegenübergestellt. Diese Vorgehensweise erbrachte deutliche Hinweise auf eine Korrelation beider Prozesse (PI-Aufnahme, Astrozytenaktivierung). So zeigte bereits die graphische Darstellung der Ergebnisse eine visuell erkennbare Häufung der Datenpunkte im oberen rechten Quadranten (Abb. 11-14), was man bei einer positiven Korrelation von GFAP-Intensität und PI-Aufnahme erwarten würde. Die statistische Auswertung ergab weiterhin, dass die GFAP-Intensität 24 h nach *in vitro*-TBI sowohl im SP als auch in den SR/SLM signifikant mit der PI-Aufnahme korreliert, wenn die männlichen (m; Abb. 11C und F) und die Gesamtkulturen (f+m; Abb. 11A und D) betrachtet wurden. Bei den weiblichen Kulturen war nach 24 h keine Korrelation zu erkennen (Abb. 11C). Jedoch war bei den weiblichen Kulturen eine deutliche Korrelation im SP nach 48 h zu beobachten (Abb. 12B).



24h						
GFAP vs. PI	SP f+m	SR/SLM f+m	SP f	SR/SLM F	SP m	SR/SLM m
r-Wert	0,4833	0,5536	0,3411	0,3077	0,6286	0,6377
p-Wert	0,0144	0,0033	0,2541	0,3064	0,0286	0,0190

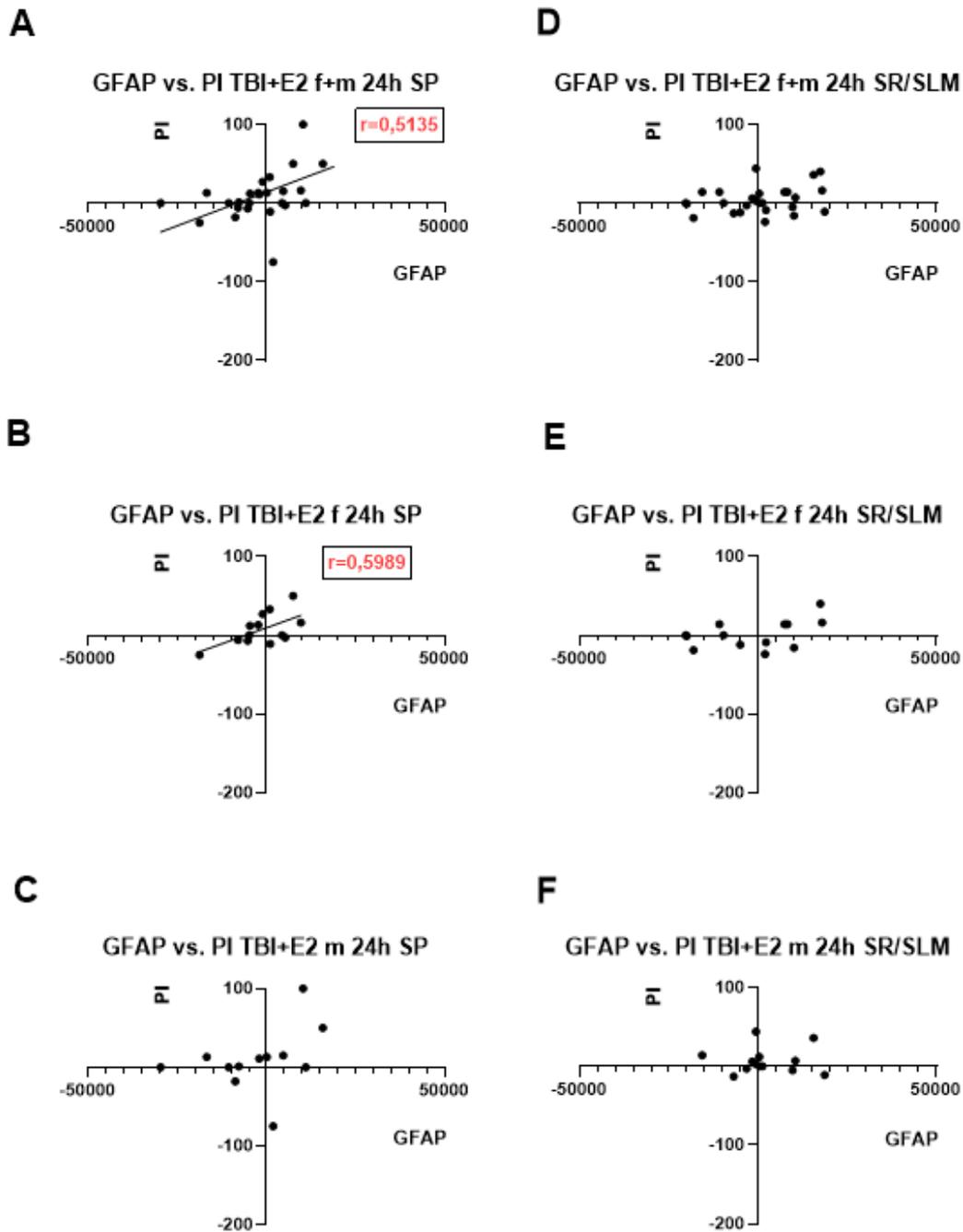
Abbildung 11: Grafische Darstellung und statistische Auswertung der Korrelation zwischen GFAP-Intensität und PI positiven Zellen in der CA1 Region für die TBI-Gruppe 24h nach in vitro TBI. A, B: Kulturen gesamt (f+m); C, D: weibliche Kulturen (f), E, F: männliche Kulturen (m). A, C und E: SP; B, D und F: SR/SLM. Im Anschluss folgen die statistischen Daten. Signifikant korrelierende Daten sind in den Graphiken durch Einfügung einer Regressionsgerade und Benennung des Pearson-Koeffizienten r optisch hervorgehoben.



48h						
GFAP vs. PI	SP f+m	SR/SLM f+m	SP f	SR/SLM f	SP m	SR/SLM m
r-Wert	0,2422	0,2623	0,8749	0,1500	0,2843	0,3542
p-Wert	0,2235	0,1863	0,0020	0,7000	0,2245	0,1493

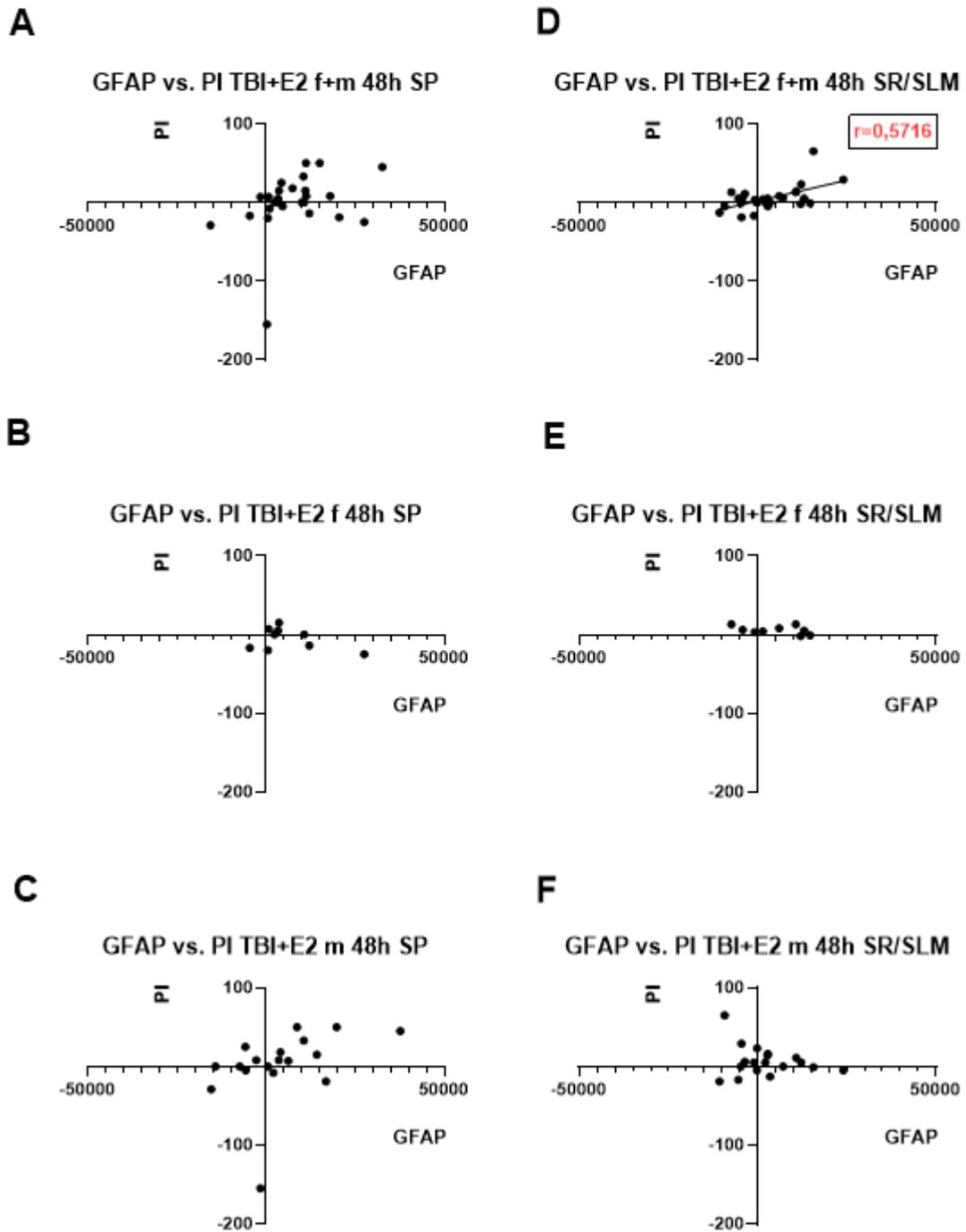
Abbildung 12: Grafische Darstellung und statistische Auswertung der Korrelation zwischen GFAP-Intensität und PI positiven Zellen in der CA1 Region für die TBI-Gruppe 48h nach in vitro TBI. A, B: Kulturen gesamt (f+m); C, D: weibliche Kulturen (f), E, F: männliche Kulturen (m). A, C und E: SP; B, D und F: SR/SLM. Im Anschluss folgen die statistischen Daten. Signifikant korrelierende Daten sind in den Graphiken durch Einfügung einer Regressionsgerade und Benennung des Pearson-Koeffizienten r optisch hervorgehoben.

Auch in den TBI+E2-Kulturen waren Korrelationen zwischen PI-Aufnahme und GFAP-Intensität statistisch nachweisbar: Im SP nach 24 h bei den Gesamtkulturen (Abb. 13A) und in der weiblichen Gruppe (Abb. 13B) sowie in den SR/SLM nach 48 h (Gesamtgruppe; Abb. 14D).



24h						
GFAP vs. PI	SP f+m	SR/SLM f+m	SP f	SR/SLM f	SP M	SR/SLM m
r-Wert	0,5135	0,2890	0,5989	0,4375	0,5000	0,01718
p-Wert	0,0073	0,1522	0,0306	0,1349	0,0819	0,9556

Abbildung 13: Grafische Darstellung und statistische Auswertung der Korrelation zwischen GFAP Intensität und PI positiven Zellen in der CA1 Region für die TBI+E2-Gruppe 24h nach in vitro TBI. A, B: Kulturen gesamt (f+m); C, D: weibliche Kulturen (f), E, F: männliche Kulturen (m). A, C und E: SP; B, D und F: SR/SLM. Im Anschluss folgen die statistischen Daten. Signifikant korrelierende Daten sind in den Graphiken durch Einfügung einer Regressionsgerade und Benennung des Pearson-Koeffizienten r optisch hervorgehoben.



48h						
GFAP vs. PI	SP f+m	SR/SLM f+m	SP f	SR/SLM f	SP M	SR/SLM m
r-Wert	0,3207	0,5716	-0,3879	-0,4388	0,3905	-0,2191
p-Wert	0,1029	0,0018	0,3023	0,2374	0,1091	0,3824

Abbildung 14: Grafische Darstellung und statistische Auswertung der Korrelation zwischen GFAP-Intensität und PI positiven Zellen in der CA1 Region für die TBI+E2-Gruppe 48h nach in vitro TBI. A, B: Kulturen gesamt (f+m); C, D: weibliche Kulturen (f), E, F: männliche Kulturen (m). A, C und E: SP; B, D und F: SR/SLM. Im Anschluss folgen die statistischen Daten. Signifikant korrelierende Daten sind in den Graphiken durch Einfügung einer Regressionsgerade und Benennung des Pearson-Koeffizienten r optisch hervorgehoben.

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass eine Astrozytenaktivierung nach mechanischer Schädigung ein eher lokaler Prozess ist, der in der unmittelbaren Umgebung geschädigter Zellen abläuft. Die Aktivierung erfolgt nicht flächendeckend und tritt folglich in auf die Breite ausgerichteten Bestimmungen, wie der von Gesamt-GFAP im Hippocampus per Western Blot oder einer immunhistochemischen Intensitätsbestimmung über eine größere Fläche hinweg, nur bedingt statistisch signifikant in Erscheinung.

6.6. Vergleich männlicher und weiblicher Kulturen

In den vorangehend vorgestellten Daten für die PI-Aufnahme (Abb. 7 + 8) und die GFAP-Intensität (Abb. 9 + 10) sind Geschlechtsunterschiede nicht unmittelbar auffällig. Um jedoch auch für den Geschlechtervergleich belastbare statistische Daten zu erhalten, wurden die Ergebnisse von männlichen und weiblichen Kulturen zusätzlich noch mit Hilfe von *Two-Way*-ANOVA-Statistiken verglichen (Details: siehe 5.7). Dabei zeigte sich in keiner der durchgeführten Analysen ein Effekt von „Sex“, während ein Effekt von „Treatment“ für die GFAP-Intensität nach 48 Stunden bestätigt wurde (Abb. 15).

A

24h				
	GFAP		PI	
	SP f vs. m	SR/SLM f vs. m	SP f vs. m	SR/SLM f vs. m
Treatment	0,0680	0,7042	0,1506	0,4112
Sex	0,8572	0,7404	0,1796	0,1502

B

48h				
	GFAP		PI	
	SP f vs. m	SR/SLM f vs. m	SP f vs. m	SR/SLM f vs. m
Treatment	* 0,0037	0,2239	0,5352	0,2047
Sex	0,1667	0,4707	0,1084	0,6034

Abbildung 15: Tabellarische Darstellung der *Two-Way* ANOVA für den Vergleich männlicher und weiblicher Kulturen. A) 24h nach *in-vitro* TBI; B) 48h nach *in-vitro* TBI. *-Markierung bei Signifikanz

7. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, auf Grundlage eines etablierten *in vitro*-TBI Verfahrens die Auswirkung einer mechanischen Schädigung auf die Astrozyten im Nervengewebe des Hippocampus – speziell in der CA1-Region – zu bestimmen. Zusätzlich wurde durch Substitution von 17 β -Estradiol (E2) dessen Einfluss auf die Astrozytenaktivierung und die Neurodegeneration nach mechanischer Schädigung in der CA1-Region untersucht. Dabei wurde speziell folgenden Fragen nachgegangen:

1. Ist die GFAP-Expression in organotypischen Gewebekulturen nach *in vitro*-TBI verändert:
 - a) im gesamten Hippocampus (Untersuchung mit dem Western Blot-Verfahren)
 - b) in der CA1-Region (speziell in den Strata pyramidale und radiatum/lacunosum-moleculare, über immunhistochemische Analysen)?
2. Besteht eine Korrelation zwischen Astrozytenaktivierung und erhöhter PI-Aufnahme nach *in vitro*-TBI?
3. Beeinflusst die Zugabe von 17 β -Estradiol (E2) nach *in vitro*-TBI die Astrozytenaktivierung und/oder PI-Aufnahme?
4. Gibt es Geschlechtsunterschiede?

Als wesentliche Ergebnisse können festgehalten werden:

Zu1) Die GFAP-Expression ist bei Betrachtung des gesamten Hippocampus (Western Blot) nicht erkennbar und bei großflächiger Betrachtung der CA1-Region (Immunhistochemie) nur geringfügig nach *in vitro*-TBI erhöht.

Zu 2) Die Korrelationsanalysen (Abb. 11-14) zeigten in der TBI- und TBI-E2-Gruppe mehrfach eine Korrelation von erhöhter GFAP-Intensität und erhöhter PI-Aufnahme auf. Dies könnte bedeuten, dass Astrozytenaktivierung nur in unmittelbarer Umgebung einer

Zellschädigung auftritt und somit als eher lokaler statt als großflächiger Effekt in Erscheinung tritt.

Zu 3) Die Anzahl PI-positiver Zellen war in der TBI+E2-Gruppe nach 24 und 48 h etwas geringer als in der TBI-Gruppe und die GFAP-Intensität im SP war nach 48 h – im Gegensatz zur TBI-Gruppe – im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht. Statistische Vergleiche zwischen der TBI- und der TBI+E2-Gruppe ergaben jedoch keine signifikanten Unterschiede, so dass auf eine Wirkung von E2 auf die Prozesse nicht zwingend geschlossen werden kann.

Zu 4) Die Studie ergab keine statistisch validen Hinweise auf Geschlechtsunterschiede (Abb. 15).

Diese Schlussfolgerungen werden nachfolgend diskutiert.

7.1. GFAP-Expression nach *in vitro*-TBI als Indikator der Astrozytenaktivierung

In der vorgelegten Arbeit wurde davon ausgegangen, dass GFAP als Indikator für eine Astrozytenaktivierung verwendet werden kann. Tatsächlich wurde in einer Genexpressionsanalyse gezeigt, dass eine nach traumatischer Schädigung des ZNS eintretende reaktive Gliose mit einer Steigerung der Expression von GFAP einhergeht (Zamanian et al., 2012). Eine erhöhte GFAP-Expression kann jedoch verschiedene Ursachen haben. Sie kann die Folge einer Vermehrung der Astrozyten (Astrozytenproliferation) sein, wie sie typischerweise nach einem fokalen („offenen“) SHT auftritt, bei dem eine offene Wunde entsteht. Die proliferierenden Astrozyten versuchen hier die Wunde durch Bildung einer Astrozytennarbe zu verschließen (Munoz-Ballester und Robel, 2023). Bei traumatischen ZNS-Schädigungen ohne offene Wunde („gedecktes SHT“) wird jedoch seltener eine Astrozytenproliferation beobachtet. Die einzelnen Astrozyten gehen hier stattdessen in ein reaktives Stadium über, in dem die Zellkörper hypertrophieren und die Morphologie ihrer Fortsätze verändern (Escartin et al., 2021). Damit einher gehen funktionelle Änderungen, deren genaue Funktion noch nicht geklärt ist, die möglicherweise jedoch den Zweck verfolgen, die Homöostase in der Umgebung geschädigter Neurone zu stabilisieren und diese zu retten. In solchen „reaktiven“ Astrozyten ist die GFAP-Expression um das ca. 3-fache erhöht (Munoz-Ballester und Robel, 2023). Die hier vorliegenden Ergebnisse legen eher die zweite Variante nahe. Zwar wurde eine Bestimmung der Astrozytenzahl hier nicht vorgenommen, weil sich die GFAP-Immunfärbung für eine

verlässliche Darstellung der Astrozytenzellkörper als unzuverlässig erwies. Eine deutliche Zunahme der Astrozyten nach *in vitro*-TBI wäre in den Schnitten jedoch optisch aufgefallen, wurde jedoch nicht beobachtet. Umgekehrt spricht die Korrelation von GFAP-Intensität und PI-positiven Zellen dafür, dass die GFAP-Expression insbesondere in der Umgebung geschädigter Zellen erhöht war, was mit einer lokalen Einflussnahme reaktiver Astrozyten auf die Homöostase in der Umgebung geschädigter Neurone in Einklang stünde. Allerdings wird die Funktion von reaktiven Astrozyten auch kontrovers diskutiert. Einerseits haben verschiedene Studien gezeigt, dass das Vorkommen reaktiver Astrozyten unter anderem die Regeneration von Axonen nach traumatischen Verletzungen des ZNS anregt sowie generell die Regeneration des ZNS fördert (McKeon et al., 1991; Fitch und Silver, 2008). Andererseits können reaktive Astrozyten auch einen neurotoxischen Phänotyp annehmen, der vermutlich dazu dient, zu stark geschädigte Zellen im ZNS zu eliminieren, (Bush et al., 1999; Liddel et al., 2017). Um diese Frage mit Hilfe des *in vitro*-TBI Modells weiter zu untersuchen, müssten Stellen in den Kulturen identifiziert werden, an denen eine Astrozytenaktivierung in der Nachbarschaft geschädigter Neurone stattfindet. An solchen Stellen könnten spezifischere Untersuchungen (siehe 7.5) durchgeführt werden.

7.2. Die Wirkung von E2 auf Astrozyten nach *in vitro*-TBI

In der vorliegenden Studie wurde weiterhin untersucht, ob die Zugabe von E2 nach *in vitro*-TBI einen Einfluss auf die Astrozytenaktivierung hat. Wissenschaftliche Grundlage dafür sind Befunde, dass der Einfluss von E2 die Regeneration des neuronalen Gewebes nach traumatischer Schädigung anregt (Arevalo et al., 2015; Brotfein et al., 2016) und dabei auch Einfluss auf die Aktivität der Astrozyten ausübt (Gölz et al., 2019). E2 aktiviert beispielsweise in Astrozyten die Expression von Glutamat-Transportern, die Glutamat aus dem Extrazellulärraum aufnehmen (Pawlak et al., 2005) sowie des Enzyms Glutamin-Synthetase, das Glutamat zu Glutamin umwandelt (Brotfein et al., 2016). Die erhöhten, toxischen, extrazellulären Glutamatwerte nach TBI werden so in die nicht toxische Form Glutamin umgesetzt, welche dann von Neuronen wieder in Glutamat umgewandelt werden kann (Azcoitia et al., 2018).

Bemerkenswerterweise beginnen Astrozyten in geschädigtem Nervengewebe auch selbst E2 zu produzieren, indem sie das Enzym Aromatase exprimieren. Unter physiologisch normalen Umständen findet in Astrozyten jedoch keine Aromatase-Synthese statt (Azcoitia et al., 2018).

Das lokal von Astrozyten ausgeschüttete E2 könnte damit auf parakrine Weise neuronale Regenerationsprozesse fördern z. B. durch Stimulierung der Expression anti-apoptotischer Gene oder der Induktion von Neuritenwachstum (Arevalo et al., 2015). Tatsächlich ist eine stimulierende Wirkung von E2 auf die Ausdehnung von Dendriten gut etabliert (Plamondon et al., 2006, Taxier et al., 2020).

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie unterstützen die Hypothese einer verstärkten Astrozytenaktivierung durch E2 nur bedingt. So wurde zwar in der TBI+E2-Gruppe ein signifikanter Unterschied der GFAP-Intensität im Vergleich zu den Kontrollkulturen detektiert, was prinzipiell für eine die GFAP-Expression fördernde Wirkung von E2 spricht. Allerdings war der Unterschied zu den TBI-Kulturen (ohne E2) nicht signifikant, weshalb nicht sicher davon ausgegangen werden kann, dass die erhöhte GFAP-Expression in der TBI+E2-Gruppe auf die Wirkung von E2 zurückzuführen ist. Ebenso war die Anzahl PI-positiver Zellen nach TBI+E2 etwas geringer als nach TBI allein, aber auch hier waren die Unterschiede nicht signifikant. Es kann daher abschließend festgehalten werden, dass eine stimulierende Wirkung von E2 auf die GFAP-Expression nach den vorliegenden Ergebnissen zwar vermutet werden kann, dass aber weitere Untersuchungen nötig sind, um diesen Zusammenhang zu sichern. Weiterhin auffällig war, dass der Höhepunkt der Astrozytenaktivierung (GFAP-Intensität) nach 48 h beobachtet wurde, während der Höhepunkt der PI-Aufnahme bereits nach 24 h erreicht war. Daraus könnte geschlossen werden, dass die Astrozytenaktivierung der Zellschädigung folgt, d. h. durch diese möglicherweise induziert wird.

7.3. Geschlechtsunterschiede bei der Astrozytenaktivierung

In einer kürzlich durchgeführten Studie zu den Folgen eines SHT *in vivo* wurde beobachtet, dass nach systemischer Hemmung der Aromatase durch Gabe des Inhibitors Letrozol die durch SHT im geschädigten Gewebe induzierte GFAP-Expression in weiblichen Mäusen erhöht war, nicht jedoch in männlichen Mäusen (Gölz et al., 2019). Aus diesem Grunde wurden in der vorliegenden Studie die Gewebekulturen von männlichen und weiblichen Mäusen strikt getrennt behandelt und die Ergebnisse auf Geschlechtsunterschiede untersucht (Abb. 15). Solche waren bei der Astrozytenaktivierung jedoch nicht zu beobachten, da sowohl in weiblichen als auch in männlichen Kulturen nach *in vitro*-TBI und E2-Gabe eine signifikante Hochregulation der GFAP-Expression gefunden wurde. Die GFAP-induzierende Signalkaskade scheint daher im Kulturmodell nicht geschlechtsspezifisch zu sein. Auch bei der

PI-Aufnahme wurden keine Geschlechtsunterschiede beobachtet. Zwar schien 24 h nach *in vitro*-TBI die PI-Aufnahme in den männlichen Kulturen etwas stärker zu sein als in den weiblichen, jedoch war bei beiden Geschlechtern der Unterschied zu den Kontrollen nicht signifikant. Nur wenn die Kulturen unabhängig vom Geschlecht (f+m) zusammengefasst wurden, wurde hier ein Effekt der *in vitro*-TBI deutlich. Es muss hier jedoch einschränkend benannt werden, dass organotypische Gewebekulturen aus immaturren Mäusen gewonnen werden, bei denen die Weibchen noch keinen Sexualzyklus durchlaufen. Es ist somit denkbar, dass sich geschlechtsspezifische Signalwege für GFAP erst im Laufe der Pubertät herausbilden. Tatsächlich werden im Hippocampus adulter Nager zahlreiche Geschlechtsunterschiede in Bezug auf die Wirkung von Sexualhormonen beobachtet (Brandt et al., 2020; Gall et al., 2023), die sich im immaturren Gehirn noch nicht nachweisen lassen (Schulz und Sisk, 2016).

Altersbedingt sind vermutlich auch die Reaktionen auf Schädigung im Nervengewebe. So wird in einem Übersichtsartikel von Arambula et al. (2019) aufgezeigt, dass Schädel-Hirn-Traumata bei Kindern andere Folgen haben als SHTs bei Erwachsenen. Insbesondere war auch das Geschlechtsverhältnis bei Kindern in einigen Studien umgekehrt als bei Erwachsenen. So benötigen Mädchen im Kinder- oder Pubertätsalter häufig längere Hospitalaufenthalte und Reha-Zeiten als Jungen, um sich von einem SHT zu erholen (Arambula et al., 2019). Bei Erwachsenen ist – wie eingangs ausgeführt – das Verhältnis umgekehrt. Dies könnte u. a. durch die unterschiedlichen Sexualhormonspiegel in der Kindheit und Pubertät möglicherweise aber auch durch unterschiedliche Wirkungen von E2 im sich entwickelnden Nervensystem (McCarthy, 2009) bedingt sein.

7.4. Nutzen und Grenzen des *in vitro*-TBI Modells

Die Modellierung eines SHT *in vitro* unter Verwendung organotypischer Gewebekulturen bringt den Vorteil einer guten experimentellen Zugänglichkeit eines bestehenden neuronalen Gewebeverbandes (z. B. für die Zugabe von Substanzen). Sie besitzt aber auch Nachteile, die die Interpretation der Ergebnisse deutlich einschränken. Ein wesentlicher Nachteil besteht in der eingeschränkten Altersverwendbarkeit. Organotypische Gewebekulturen des Hippocampus können nur von früh-postnatalen Tieren (ca. bis P14) gewonnen werden und sie können nur für eine begrenzte Dauer in Kultur gehalten werden (ca. 3-4 Wochen). Danach sinkt die Überlebensfähigkeit der Kulturen und sie verändern ihre ursprüngliche Gewebeorganisation z. B. durch neuronale Sprossungsprozesse (Stoppini et al., 1991; Bender et al., 1998; DelTurco & Deller, 2007). In der vorliegenden Studie wurden die Kulturen an P7 oder P8 angelegt und danach für 14 Tage zur Regeneration von der Präparation ungestört belassen. Danach erst wurde die *in vitro*-TBI durchgeführt und die Folgen wurden 24 bzw. 48 h später analysiert. Es handelte sich zu diesem Zeitpunkt jedoch immer noch um unreifes Nervengewebe. Die Interpretation der Ergebnisse ist daher streng genommen nur für das sich entwickelnde ZNS anwendbar. Schädel-Hirn-Traumata treten jedoch am häufigsten bei Erwachsenen auf (72%) und nur zu ca. 28% bei Kindern unter 16 Jahren (Rickels et al., 2022).

Noch schwerwiegender fällt die zweite Einschränkung ins Gewicht. Für die Herstellung der Gewebekulturen müssen sie aus dem Gehirn entnommen und vom Restorganismus getrennt werden. Dadurch entfällt auch ein kritisches Element beim SHT: Die Eröffnung der Blut-Hirn-Schranke und das Eindringen von Blut und Immunzellen in das zuvor „immungeschützte“ ZNS (Barzo et al., 1997; Loane et al., 2014). Durch das dadurch entstehende metabolische Ungleichgewicht wird die primäre Schädigung meist noch deutlich verstärkt und diese Situation kann das *in vitro*-TBI Modell nicht abbilden. Sein Nutzen ist daher auf die Untersuchung intrinsischer Prozesse beschränkt, deren Eintreten nach SHT im Nervengewebe bekannt ist. Dazu zählen neben neurodegenerativen Prozessen die hier untersuchte Astrozytenaktivierung, sowie die in einer früheren Studie untersuchte Aktivierung von Mikroglia (Hemmat, 2022).

7.5. Fazit

Wie die vorliegende Studie – ebenso wie die Studie von Hemmat (2022) – belegt, kann das verwendete *in vitro*-TBI Modell zur Untersuchung eng umrissener Fragen zu den Folgen einer Schädigung von Nervengewebe eingesetzt werden. Insbesondere lassen sich mit diesem Modell die Einflüsse von Faktoren – hier E2 – auf durch mechanische Schädigung im Nervengewebe induzierte Abläufe untersuchen. Das Modell kann somit nützliche Beiträge zur Erforschung der Folgen eines SHT leisten, indem z. B. mit seiner Hilfe die Wirkungen von therapeutischen Substanzen vorab eingeschätzt werden können, bevor sie in weit aufwendigeren Tierversuchen getestet werden. Dieser Nutzen erfordert jedoch methodische Erweiterungen, da die in den bisherigen Untersuchungen identifizierten Effekte eher subtil als offensichtlich sind. So waren sowohl in der vorliegenden als auch in der Studie von Hemmat (2022) PI-positive Zellen vorwiegend im SP lokalisiert und die erhobenen Daten lassen vermuten, dass in ihrer Umgebung Veränderungen der Astrozyten und Mikrogliazellen relativ lokal induziert werden. Um diese Abläufe detaillierter untersuchen zu können, wird es nötig sein, solche Orte im Gewebe gezielt aufzusuchen und die Untersuchungen darauf zu fokussieren. Dafür wären Studien am lebenden Gewebe wünschenswert, die etwa mit Hilfe Fluoreszenz-markierter Proteine – z. B. GFAP-GFP – an *Live-Cell-Imaging*-Mikroskopen durchgeführt werden könnten. Auch diese Experimente sind jedoch aufwendig und ihre Durchführung muss sorgfältig und in Abhängigkeit von der Aufgabenstellung (z. B. einer zu testenden Substanz) erwogen werden.

8. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, wie eine *in vitro* durchgeführte mechanische Schädigung von Nervengewebe (*in vitro*-TBI) die Astrozyten beeinflusst und ob eine Astrozytenaktivierung mit Zellschädigung korreliert. Zusätzlich wurde der Einfluss des Sexualhormons 17β -Estradiol (E2) auf diese Prozesse untersucht. Dafür wurden organotypische Kulturen des Hippocampus aus weiblichen und männlichen C57BL/6J_2019 Mäusen angelegt und unter Verwendung der *rolling cylinder*-Technik traumatisch geschädigt. Danach wurden über den Nachweis der GFAP-Expression die Astrozyten dargestellt und durch die Gabe von Propidiumiodid (PI) geschädigte Zellen detektiert. Die GFAP-Expression wurde sowohl im ganzen Hippocampus (per Western Blot) als auch immunhistochemisch mit Fokus auf die Strata pyramidale (SP) und radiatum/lacunosum moleculare (SR/SLM) in der CA1-Region untersucht.

Die Ergebnisse der Western Blot Analyse zeigen keine signifikanten Unterschiede zwischen den TBI- und TBI+E2-Gruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe (Ctl), wenn die GFAP-Expression im gesamten Hippocampus betrachtet wird. Bei separater Betrachtung der CA1-Region wurde jedoch 24h nach TBI im SP eine signifikant erhöhte PI-Aufnahme und 48h nach TBI+E2 eine signifikant erhöhte GFAP-Intensität festgestellt. Weiterhin wurde festgestellt, dass PI-Aufnahme und GFAP-Intensität nach TBI positiv korrelieren, was auf eine lokale Aktivierung der GFAP-Expression in der Umgebung geschädigter Zellen rückschließen lässt. Somit kann vermutet werden, dass die *in vitro*-TBI in Astrozyten eine Reaktion hervorgerufen hat, die jedoch insgesamt eher subtil ist. Hinsichtlich der Einflussnahme von E2 ergaben die Untersuchungen keine eindeutigen Ergebnisse, da die Resultate aus den Kulturen nach E2-Gabe (TBI+E2) sich nicht signifikant von den Resultaten aus der reinen TBI-Gruppe unterschieden. Auch signifikante Unterschiede zwischen den Geschlechtern wurden nicht festgestellt.

Insgesamt deuten die Ergebnisse daraufhin, dass nach *in vitro*-TBI eine lokal erhöhte Astrozytenaktivität auftritt, die möglicherweise durch Zellschädigung oder Zelltod induziert wird. Es könnte zum Verständnis neurogenerativer Abläufe nach Schädel-Hirn-Trauma lohnend sein, diesen Prozess detaillierter zu untersuchen.

8.1 Summary

In the present study, we investigated how *in vitro* mechanical damage (*in vitro*-TBI) to nerve tissue affects astrocytes and whether astrocyte activation correlates with cell damage. Furthermore, the influence of the sex hormone 17 β - estradiol (E2) on these processes was examined. Organotypic cultures of the hippocampus from female and male C57BL/6J_2019 mice were investigated, and traumatic damage was induced using the rolling cylinder technique. Afterwards, astrocytes were studied through the detection of GFAP expression, and damaged cells were identified by the induction of propidium iodid (PI). GFAP expression was studied both in the whole hippocampus (via Western blot) and immunohistochemically with a focus on the Strata pyramidale (SP) and radiatum/lacunosum moleculare (SR/SLM) in the CA1 region.

The results of the Western blot analysis showed no significant differences between the TBI and TBI+E2 groups compared to the control group (Ctl) when the GFAP expression was examined in the whole hippocampus. Nevertheless, a significant increase in PI uptake was observed 24h after TBI in the SP of the CA1 region and a significant increase in GFAP intensity was observed 48h after TBI+E2. Moreover, it was found that PI admission and GFAP intensity positively correlated after TBI, indicating a local activation of GFAP expression in the surrounding area of damaged cells. Thus, it can be suspected that *in vitro*-TBI induced a reaction in astrocytes, but one that is overall more subtle. In terms of the influence of E2, the investigations yielded inconclusive results, as the results from cultures after the administration of E2 (TBI+E2) did not significantly differ from the results of the pure TBI group. Neither were significant differences noted between genders.

Altogether, the results suggest that in order of *in vitro*-TBI a localized increase of astrocyte activity occurs, possibly induced by cell damage or cell death. It may be worthwhile to further explore this process for a better understanding of neurogenerative processes following traumatic brain injury.

9. Literaturverzeichnis

- ARAMBULA, S. E., REINL, E. L., EL DEMERDASH, N., MCCARTHY, M. M. & ROBERTSON, C. L. 2019. Sex differences in pediatric traumatic brain injury. *Experimental neurology*, 317, 168-179.
- AREVALO, M.-A., AZCOITIA, I. & GARCIA-SEGURA, L. M. 2015. The neuroprotective actions of oestradiol and oestrogen receptors. *Nature Reviews Neuroscience*, 16, 17-29.
- ARNDT-JOVIN, D. J. & JOVIN, T. M. 1989. Chapter 16 Fluorescence Labeling and Microscopy of DNA. In: TAYLOR, D. L. & WANG, Y.-L. (eds.) *Methods in Cell Biology*. Academic Press.
- BARDEHLE, S., KRUEGER, M., BUGGENTHIN, F., SCHWAUSCH, J., NINKOVIC, J., CLEVERS, H., SNIPPERT, H. J., THEIS, F. J., MEYER-LUEHMANN, M., BECHERMANN, I., DIMOU, L., & GOETZ M. (2013). Live imaging of astrocyte responses to acute injury reveals selective juxtavascular proliferation. *Nature Neuroscience*, 16(5), 580–586.
- BARZÓ, P., MARMAROU, A., FATOUROS, P., HAYASAKI, K. & CORWIN, F. 1997. Contribution of vasogenic and cellular edema to traumatic brain swelling measured by diffusion-weighted imaging. *Journal of neurosurgery*, 87, 900-907.
- BAO, Y. J., LI, L. Z., LI, X. G. & WANG, Y. J. 2011. 17Beta-estradiol differentially protects cortical pericontusional zone from programmed cell death after traumatic cerebral contusion at distinct stages via non-genomic and genomic pathways. *Mol Cell Neurosci*, 48, 185-94.
- BENDER, R., HEIMRICH, B., MEYER, M. & FROTSCHER, M. 1998. Hippocampal mossy fiber sprouting is not impaired in brain-derived neurotrophic factor-deficient mice. *Exp Brain Res*, 120, 399-402.
- BERRY, C., LEY, E. J., TILLOU, A., CRYER, G., MARGULIES, D. R. & SALIM, A. 2009. The effect of gender on patients with moderate to severe head injuries. *J Trauma*, 67, 950-3.
- 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.
- BUSTAMANTE-BARRIENTOS, F. A., MÉNDEZ-RUETTE, M., ORTLOFF, A., LUZ-CRAWFORD, P., RIVERA, F. J., FIGUEROA, C. D., MOLINA, L. & BÁTIZ, L. F. 2021. The Impact of Estrogen and Estrogen-Like Molecules in Neurogenesis and Neurodegeneration: Beneficial or Harmful? *Front Cell Neurosci*, 15, 636176.
- BRANDT, N., VIERK, R., FESTER, L., ANSTÖTZ, M., ZHOU, L., HEILMANN, L. F., KIND, S., STEFFEN, P. & RUNE, G. M. 2020. Sex-specific difference of hippocampal synaptic plasticity in response to sex neurosteroids. *Cerebral Cortex*, 30, 2627-2641.
- BROTFAIN, E., GRUENBAUM, S. E., BOYKO, M., KUTZ, R., ZLOTNIK, A. & KLEIN, M. 2016. Neuroprotection by Estrogen and Progesterone in Traumatic Brain Injury and Spinal Cord Injury. *Curr Neuropharmacol*, 14, 641-53.
- CEYZÉRIAT, K., BEN HAIM, L., DENIZOT, A., POMMIER, D., MATOS, M., GUILLEMAUD, O., PALOMARES, M. A., ABJEAN, L., PETIT, F., GIPCHTEIN, P., GAILLARD, M. C., GUILLERMIER, M., BERNIER, S., GAUDIN, M., AURÉGAN, G., JOSÉPHINE, C., DÉCHAMPS, N., VERAN, J., LANGLAIS, V., CAMBON, K., BEMELMANS, A. P., BAIJER, J., BONVENTO, G., DHENAIN, M., DELEUZE, J. F., OLIET, S. H. R., BROUILLET, E., HANTRAYE, P., CARRILLO-DE SAUVAGE, M. A., OLASO, R., PANATIER, A. & ESCARTIN, C. 2018.

- Modulation of astrocyte reactivity improves functional deficits in mouse models of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol Commun*, 6, 104.
- CAMBIASSO, M. J., CISTERNAS, C. D., RUIZ-PALMERO, I., SCERBO, M. J., AREVALO, M. A., AZCOITIA, I. & GARCIA-SEGURA, L. M. 2017. Interaction of sex chromosome complement, gonadal hormones and neuronal steroid synthesis on the sexual differentiation of mammalian neurons. *J Neurogenet*, 31, 300-306.
- CROWLEY, L. C., SCOTT, A. P., MARFELL, B. J., BOUGHABA, J. A., CHOJNOWSKI, G. & WATERHOUSE, N. J. 2016. Measuring Cell Death by Propidium Iodide Uptake and Flow Cytometry. *Cold Spring Harb Protoc*, 2016.
- DAY, N. L., FLOYD, C. L., D'ALESSANDRO, T. L., HUBBARD, W. J. & CHAUDRY, I. H. 2013. 17 β -estradiol confers protection after traumatic brain injury in the rat and involves activation of G protein-coupled estrogen receptor 1. *J Neurotrauma*, 30, 1531-41.
- EMSLEY, J. G. & MACKLIS, J. D. 2006. Astroglial heterogeneity closely reflects the neuronal-defined anatomy of the adult murine CNS. *Neuron glia biology*, 2, 175-186.
- ENG, L. F., GHIRNIKAR, R. S. & LEE, Y. L. 2000. Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). *Neurochem Res*, 25, 1439-51.
- ESCARTIN, C., GUILLEMAUD, O. & CARRILLO-DE SAUVAGE, M. A. 2019. Questions and (some) answers on reactive astrocytes. *Glia*, 67, 2221-2247.
- ESCARTIN, C., GALEA, E., LAKATOS, A., O'CALLAGHAN, J.P. 2021. Reactive astrocyte nomenclature, definitions, and future directions. *Nat Neurosci*, 24, 312-325.
- FITCH, M. T. & SILVER, J. 2008. CNS injury, glial scars, and inflammation: Inhibitory extracellular matrices and regeneration failure. *Experimental neurology*, 209, 294-301.
- FLEMINGER, S. 2008. Long-term psychiatric disorders after traumatic brain injury. *Eur J Anaesthesiol Suppl*, 42, 123-30.
- GERICS, B., SZALAY, F. & HAJÓS, F. 2006. Glial fibrillary acidic protein immunoreactivity in the rat suprachiasmatic nucleus: circadian changes and their seasonal dependence. *J Anat*, 209, 231-7.
- GALL, C. M., LE, A. A. & LYNCH, G. 2023. Sex differences in synaptic plasticity underlying learning. *J Neurosci Res*, 101, 764-782.
- GÖLZ, C., KIRCHHOFF, F. P., WESTERHORSTMANN, J., SCHMIDT, M., HIRNET, T., RUNE, G. M., BENDER, R. A. & SCHÄFER, M. K. 2019. Sex hormones modulate pathogenic processes in experimental traumatic brain injury. *Journal of neurochemistry*, 150, 173-187.
- GRAUER, M. 2009. *Funktionelle und molekulare Untersuchungen zur Expression von GABA A- und P2 X-Rezeptoren in Gliazellen des Hippocampus*. Universitäts- und Landesbibliothek Bonn.
- HAGEBUSCH, P., PINGEL, A., KANDZIORA, F., HOFFMANN, R. & SCHWEIGKOFLE, U. 2020. Das Schädel-Hirn-Trauma im Erwachsenenalter. *Notfallmedizin up2date*, 15, 59-74.
- HÜTTMANN, K., SADGROVE, M., WALLRAFF, A., HINTERKEUSER, S., KIRCHHOFF, F., STEINHÄUSER, C. & GRAY, W. P. 2003. Seizures preferentially stimulate proliferation of radial glia-like astrocytes in the adult dentate gyrus: functional and immunocytochemical analysis. *European Journal of Neuroscience*, 18, 2769-2778.
- KEMPERMANN, G. 2002. Aktivitätsabhängige Regulation von Neurogenese im erwachsenen Hippocampus.
- KIPP, M. & RADLANSKI, K. 2020. *Neuroanatomie : Nachschlagen | Lernen | Verstehen*, Berlin, GERMANY, KVM – Der Medizinverlag.
- KLINGE, C. M. 2001. Estrogen receptor interaction with estrogen response elements. *Nucleic acids research*, 29, 2905-2919.

- LANGE CANHOS, L., CHEN, M., FALK, S., POPPER, B., STRAUB, T., GOETZ, M., & SIRKO, S. (2021). Repetitive injury and absence of monocytes promote astrocyte self-renewal and neurological recovery. *Glia*, 69(1), 165–181.
- LENHOSSÉK, M. 1895. *Der Feinere Bau Des Nervensystems Im Lichte Neuester Forschung*.
- LEY, E. J., SHORT, S. S., LIOU, D. Z., SINGER, M. B., MIROCHA, J., MELO, N., BUKUR, M. & SALIM, A. 2013. Gender impacts mortality after traumatic brain injury in teenagers. *J Trauma Acute Care Surg*, 75, 682-6.
- LIDDELOW, S. A., GUTTENPLAN, K. A., CLARKE, L. E., BENNETT, F. C., BOHLEN, C. J., SCHIRMER, L., BENNETT, M. L., MÜNCH, A. E., CHUNG, W. S., PETERSON, T. C., WILTON, D. K., FROUIN, A., NAPIER, B. A., PANICKER, N., KUMAR, M., BUCKWALTER, M. S., ROWITCH, D. H., DAWSON, V. L., DAWSON, T. M., STEVENS, B. & BARRES, B. A. 2017. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature*, 541, 481-487.
- LOANE, D. J., KUMAR, A., STOICA, B. A., CABATBAT, R. & FADEN, A. I. 2014. Progressive neurodegeneration after experimental brain trauma: association with chronic microglial activation. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 73, 14-29.
- LU, H., MA, K., JIN, L., ZHU, H. & CAO, R. 2018. 17 β -estradiol rescues damages following traumatic brain injury from molecule to behavior in mice. *J Cell Physiol*, 233, 1712-1722.
- MACKLIS, J. D. & MADISON, R. D. 1990. Progressive incorporation of propidium iodide in cultured mouse neurons correlates with declining electrophysiological status: a fluorescence scale of membrane integrity. *J Neurosci Methods*, 31, 43-6.
- MAMBER, C., KOZAREVA, D. A., KAMPHUIS, W. & HOL, E. M. 2013. Shades of gray: The delineation of marker expression within the adult rodent subventricular zone. *Progress in Neurobiology*, 111, 1-16.
- MATYASH, V. & KETTENMANN, H. 2010. Heterogeneity in astrocyte morphology and physiology. *Brain Research Reviews*, 63, 2-10.
- MCCARTHY, M. M. 2009. The two faces of estradiol: effects on the developing brain. *The Neuroscientist*, 15, 599-610.
- MCCONEGHY, K. W., HATTON, J., HUGHES, L. & COOK, A. M. 2012. A review of neuroprotection pharmacology and therapies in patients with acute traumatic brain injury. *CNS Drugs*, 26, 613-36.
- MCGINN, M. J. & POVLISHOCK, J. T. 2016. Pathophysiology of traumatic brain injury. *Neurosurgery Clinics*, 27, 397-407.
- MCKEON, R. J., SCHREIBER, R. C., RUDGE, J. S. & SILVER, J. 1991. Reduction of neurite outgrowth in a model of glial scarring following CNS injury is correlated with the expression of inhibitory molecules on reactive astrocytes. *Journal of Neuroscience*, 11, 3398-3411.
- MCINTOSH, T. K., JUHLER, M. & WIELOCH, T. 1998. Novel pharmacologic strategies in the treatment of experimental traumatic brain injury: 1998. *Journal of neurotrauma*, 15, 731-769.
- MESEKE, M., NEUMÜLLER, F., BRUNNE, B., LI, X., ANSTÖTZ, M., POHLKAMP, T., ROGALLA, M. M., HERZ, J., RUNE, G. M. & BENDER, R. A. 2018. Distal Dendritic Enrichment of HCN1 Channels in Hippocampal CA1 Is Promoted by Estrogen, but Does Not Require Reelin. *eNeuro*, 5.
- MICEVYCH, P., SOMA, K. K. & SINCHAK, K. 2008. Neuroprogesterone: key to estrogen positive feedback? *Brain Res Rev*, 57, 470-80.
- MIYAMOTO, D., HIRAI, D. & MURAYAMA, M. 2017. The roles of cortical slow waves in synaptic plasticity and memory consolidation. *Frontiers in neural circuits*, 11, 92.

- MOLLAYEVA, T., CASSIDY, J. D., SHAPIRO, C. M., MOLLAYEVA, S. & COLANTONIO, A. 2017. Concussion/mild traumatic brain injury-related chronic pain in males and females: A diagnostic modelling study. *Medicine (Baltimore)*, 96, e5917.
- MUÑOZ-BALLESTER, C. & ROBEL, S. 2023. Astrocyte-mediated mechanisms contribute to traumatic brain injury pathology. *WIREs Mechanisms of Disease*, e1622.
- MURAKAMI, G., HOJO, Y., KATO, A., KOMATSUZAKI, Y., HORIE, S., SOMA, M., KIM, J. & KAWATO, S. 2018. Rapid nongenomic modulation by neurosteroids of dendritic spines in the hippocampus: Androgen, oestrogen and corticosteroid. *J Neuroendocrinol*, 30.
- O'CALLAGHAN, J. P., BRINTON, R. E. & MCEWEN, B. S. 1991. Glucocorticoids regulate the synthesis of glial fibrillary acidic protein in intact and adrenalectomized rats but do not affect its expression following brain injury. *J Neurochem*, 57, 860-9.
- OSIER, N. & DIXON, C. E. 2017. Mini review of controlled cortical impact: a well-suited device for concussion research. *Brain sciences*, 7, 88.
- PARSANA, A. J. & BROWN, T. H. 2010. Temporal Lobe and Object Recognition. In: KOOB, G. F., MOAL, M. L. & THOMPSON, R. F. (eds.) *Encyclopedia of Behavioral Neuroscience*. Oxford: Academic Press.
- PAWLAK, J., BRITO, V., KÜPPERS, E. & BEYER, C. 2005. Regulation of glutamate transporter GLAST and GLT-1 expression in astrocytes by estrogen. *Brain Res Mol Brain Res*, 138, 1-7.
- PEKNY, M. & PEKNA, M. 2004. Astrocyte intermediate filaments in CNS pathologies and regeneration. *J Pathol*, 204, 428-37.
- PFORTE, C. 2008. *Funktionelle und morphologische Analyse der Läsionsplastizität nach transienter zerebraler Ischämie*. Magdeburg, Univ., Diss., 2008.
- PHELAN, H. A., SHAFI, S., PARKS, J., MAXSON, R. T., AHMAD, N., MURPHY, J. T. & MINEI, J. P. 2007. Use of a pediatric cohort to examine gender and sex hormone influences on outcome after trauma. *J Trauma*, 63, 1127-31.
- RICKELS, E., VON WILD, K. & WENZLAFF, P. 2010. Das Schädel-Hirn-Trauma-Epidemiologie und Versorgung.
- PLAMONDON, H., MORIN, A. & CHARRON, C. 2006. Chronic 17beta-estradiol pretreatment and ischemia-induced hippocampal degeneration and memory impairments: a 6-month survival study. *Horm Behav*, 50, 361-9.
- POLLACK, A. & CIANCIO, G. 1990. Cell cycle phase-specific analysis of cell viability using Hoechst 33342 and propidium iodide after ethanol preservation. *Methods in cell biology*. Elsevier.
- REICHENBACH, A. & WOLBURG, H. 2005. Astrocytes and ependymal glia. *Neuroglia*, 2, 19-35.
- RODRÍGUEZ, J. J., TERZIEVA, S., OLABARRIA, M., LANZA, R. G. & VERKHRATSKY, A. 2013. Enriched environment and physical activity reverse astroglial degeneration in the hippocampus of AD transgenic mice. *Cell Death Dis*, 4, e678.
- SANDÉN, C., BROSELID, S., CORNMARK, L., ANDERSSON, K., DASZKIEWICZ-NILSSON, J., MÅRTENSSON, U. E., OLDE, B. & LEEB-LUNDBERG, L. M. 2011. G protein-coupled estrogen receptor 1/G protein-coupled receptor 30 localizes in the plasma membrane and traffics intracellularly on cytokeratin intermediate filaments. *Mol Pharmacol*, 79, 400-10.
- SCHULZ, K. M. & SISK, C. L. 2016. The organizing actions of adolescent gonadal steroid hormones on brain and behavioral development. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 70, 148-158.
- SCOVILLE, W. B. & MILNER, B. 2000. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. 1957. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*, 12, 103-13.

- SERI, B., GARCIA-VERDUGO, J. M., MCEWEN, B. S. & ALVAREZ-BUYLLA, A. 2001. Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. *Journal of Neuroscience*, 21, 7153-7160.
- SOFRONIEW, M. V. 2009. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci*, 32, 638-47.
- SOUSTIEL, J. F., PALZUR, E., NEVO, O., THALER, I. & VLODAVSKY, E. 2005. Neuroprotective anti-apoptosis effect of estrogens in traumatic brain injury. *J Neurotrauma*, 22, 345-52.
- SRIVASTAVA, D. P., WOOLFREY, K. M. & PENZES, P. 2013. Insights into rapid modulation of neuroplasticity by brain estrogens. *Pharmacol Rev*, 65, 1318-50.
- STOPPINI, L., BUCHS, P.-A. & MULLER, D. 1991. A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *Journal of neuroscience methods*, 37, 173-182.
- TAXIER, L. R., GROSS, K. S. & FRICK, K. M. 2020. Oestradiol as a neuromodulator of learning and memory. *Nat Rev Neurosci*, 21, 535-550.
- VERKHRATSKY, A., ZOREC, R. & PARPURA, V. 2017. Stratification of astrocytes in healthy and diseased brain. *Brain Pathol*, 27, 629-644.
- WANG, K. K., YANG, Z., ZHU, T., SHI, Y., RUBENSTEIN, R., TYNDALL, J. A. & MANLEY, G. T. 2018. An update on diagnostic and prognostic biomarkers for traumatic brain injury. *Expert Rev Mol Diagn*, 18, 165-180.
- ZAMANIAN, J. L., XU, L., FOO, L. C., NOURI, N., ZHOU, L., GIFFARD, R. G. & BARRES, B. A. 2012. Genomic analysis of reactive astrogliosis. *J Neurosci*, 32, 6391-410.
- ZWIRNER, J., LIER, J., FRANKE, H., HAMMER, N., MATSCHKE, J., TRAUTZ, F., TSE, R. & ONDRUSCHKA, B. 2021. GFAP positivity in neurons following traumatic brain injuries. *International Journal of Legal Medicine*, 135, 2323-2333.

10. Erklärung des Eigenanteils

Hiermit erkläre ich folgende Schritte der Dissertation selbstständig durchgeführt zu haben:

- Fixierung, Einfrieren und Schneiden der Gewebekulturen
- Immunhistochemie
- Auswertung der photographischen Aufnahmen in ImageJ
- Statistische Analyse

Die Präparation und Pflege der Kulturen wurde von Prof. Bender bzw. medizinisch-technischen Assistentinnen des Instituts für Neuroanatomie übernommen.

Die Aufnahmen wurden – zwecks Verblindung der Studie- von Mitarbeitern des Instituts für Neuroanatomie durchgeführt.

Die Western Blots wurden in Zusammenarbeit mit einer medizinisch-technischen Assistentin des Instituts für Neuroanatomie durchgeführt.

Unterschrift:

11. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Roland Bender, danken, der mich bei dieser Studie und der Anfertigung und Bearbeitung meiner Dissertation mit Geduld und Verständnis unterstützt hat. Seine durchgehende Betreuung und Mitarbeit schätze ich sehr und hätte mir keine bessere Zusammenarbeit vorstellen können.

Ich danke im Weiteren der ehemaligen Leiterin des Instituts für Neuroanatomie, Frau Prof. Dr. Gabriele Rune, dass ich meine Experimente im Institut durchführen durfte und Frau Herdis Hamann für die technische und wissenschaftlich Unterstützung im Labor.

Ein besonderer Dank gilt meinen Freunden, meiner Familie und meinem Ehemann Paul Bongarts für den emotionalen Rückhalt während der gesamten Dauer des Studiums und der Dissertation.

Mein außerordentlicher Dank gilt Paula Meiringer für die vielen Stunden emotionaler und liebevoller Unterstützung.

12. Lebenslauf

13. Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift:

Ergänzungen nach Abschluss des Prüfungsverfahrens

Korrekturen der Zitate

Fehlerhafte Angaben des Jahrgangs; Rechtschreibfehler

1. (Rickels et al., 2010)
 - Seite: 9, 62
2. (Muñoz-Ballester and Robel, 2023)
 - Seite: 10,14
3. (Meseke et al., 2018)
 - Seite 11, 39
4. (Miyamoto, 2017)
 - Seite 12
5. (Brotfain et al., 2016)
 - Seite 59

Korrektur der Abbildung 1 und dessen Quellenangabe

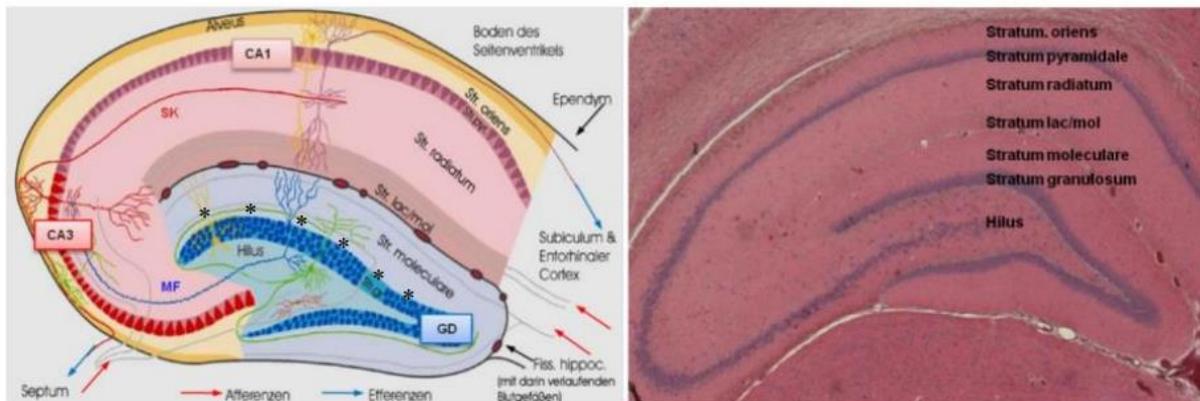


Abbildung 16 Transversaler Querschnitt durch den Hippocampus (Maus) mit Darstellung der Schichtengliederung und Aufzeichnung wichtiger axonaler Verbindungswege: A) Schematische Darstellung B) Histologische Färbung mit Cresylviolett). Abkürzungen: Cornu ammonis Region 1-3 (CA1-3), Gyrus dentatus (GD), Fissura hippocampalis (Fiss.hippoc.), Moosfasern (MF), Stratum granulosum (Str. Gr.), Stratum lacunosum moleculare (Str. lac./mol.), Schaffer Kollaterale (SK). Quellen: Schema links: J. Kacza, Universität Leipzig; Abbildung rechts: Pforte, 2008

Ergänzung des Literaturverzeichnisses

1. (Werner and Engelhard, 2007)
2. (Kettenmann et al., 2011)
3. (Adamchik et al., 2000)
4. (Del Turco and Deller, 2007)
5. (Li et al., 2016)
6. (Knierim, 2015)
7. (Bliss and Lomo, 1973)
8. (Hemmat, 2022)
9. (Azcoitia et al., 2019)

- ADAMCHIK, Y., FRANTSEVA, M. V., WEISSPAPIR, M., CARLEN, P. L. & PEREZ VELAZQUEZ, J. L. 2000. Methods to induce primary and secondary traumatic damage in organotypic hippocampal slice cultures. *Brain Res Brain Res Protoc*, 5, 153-8.
- AZCOITIA, I., BARRETO, G. E. & GARCIA-SEGURA, L. M. 2019. Molecular mechanisms and cellular events involved in the neuroprotective actions of estradiol. Analysis of sex differences. *Front Neuroendocrinol*, 55, 100787.
- BLISS, T. V. & LOMO, T. 1973. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol*, 232, 331-56.
- DEL TURCO, D. & DELLER, T. 2007. Organotypic entorhino-hippocampal slice cultures--a tool to study the molecular and cellular regulation of axonal regeneration and collateral sprouting in vitro. *Methods Mol Biol*, 399, 55-66.
- HEMMAT, H. 2022. *Einfluss von Östrogen auf neurodegenerative Prozesse in einem in vitro-Modell für traumatische Hirnschädigung*. Staats-und Universitätsbibliothek Hamburg Carl von Ossietzky.
- KETTENMANN, H., HANISCH, U. K., NODA, M. & VERKHRATSKY, A. 2011. Physiology of microglia. *Physiol Rev*, 91, 461-553.
- KNIERIM, J. J. 2015. The hippocampus. *Current Biology*, 25, R1116-R1121.
- LI, Q., HAN, X. & WANG, J. 2016. Organotypic Hippocampal Slices as Models for Stroke and Traumatic Brain Injury. *Mol Neurobiol*, 53, 4226-4237.
- WERNER, C. & ENGELHARD, K. 2007. Pathophysiology of traumatic brain injury. *Br J Anaesth*, 99, 4-9.