

**Neurodegeneration und Neurogenese in  
organotypischen hippocampalen Schnittkulturen  
nach fokalem Trauma**

vorgelegt von Diplombiologin Alexandra Laskowski

## Zusammenfassung

Schädelhirntraumata sind Verletzungen, die zum weitreichenden Absterben von Neuronen führen. Vor einigen Jahren wurden Stammzellen im Säugerhirn detektiert, die ihrerseits Anlass zu umfangreichen Regenerationsstudien gaben. Darin wurden die verletzungsinduzierte Proliferation und Neurogenese beschrieben. Darauf aufbauende Versuchsreihen zeigten, dass diese endogene Regeneration mit Hilfe von verschiedenen Faktoren wie z.B. Wachstumsfaktoren verstärkt werden kann.

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst ein fokales Traumamodell etabliert, an dem anschließend eine traumainduzierte Proliferation und Neurogenese untersucht wurde.

Dem Schädigungsmodell lagen organotypisch hippocampalen Schnittkulturen (OHC) zu Grunde. Diese wurden manuell mittels Skalpellschnitts in der CA2 Region geschädigt. Die Untersuchungen zur Proliferation und Differenzierung in juvenilen OHCs basierten auf immunhistochemischen Nachweisen unter Verwendung zellspezifischer neuronaler und glialer Antikörper. Sie lieferten Hinweise darauf, dass unter Kontrollbedingungen eine sowohl kontinuierliche Neuro- wie auch Gliogenese stattfindet. Obwohl durch die Läsion die Proliferation neuronalen Zellen in diesem *in vitro* Modell verstärkt induziert wird, nahm diese Anzahl im Laufe der Untersuchungen ab und demonstrierte das limitierte endogene Regenerationspotential. Kurzzeitstimulierung der endogenen Vorläuferzellen mit exogen applizierten Substanzen konnten einen Anstieg der Proliferation sowie der Neurogenese partiell in intaktem wie auch geschädigtem Gewebe auslösen. Dabei wurde der Effekt von basischem Fibroblastenwachstumsfaktor (bFGF), epidermalen Wachstumsfaktor (EGF), Nervenwachstumsfaktor (NGF) sowie der Serinprotease Thrombin untersucht. In diesem Zusammenhang konnte die Frage geklärt werden, wie weit exogenes bFGF und EGF an der läsionsinduzierten Proliferation und Neurogenese alleine oder aber auch in Kombination beteiligt ist. Am Beispiel von NGF wurde eine Dosiswirkungskurve erstellt, die zeigt, dass die Konzentration der applizierten Substanzen einen entscheidenden Einfluss auf Proliferation oder Neurogenese hat. Des Weiteren konnte in dem verwendeten System nachgewiesen werden, dass die Protease Thrombin bei Verletzungen die Proliferation steigern kann. Allerdings konnte keine Wirkung auf die Neurogenese gefunden werden. Stattdessen steigerte es bei höheren Konzentrationsgaben die Mikroglia-genese. Es scheint, dass diese Wirkungen zumindest partiell durch den Thrombinrezeptor 1 vermittelt wird, da der Effekt mit dem synthetischen Thrombinrezeptoragonisten TRag wiederholt werden konnte.

## **Abstract**

Traumatic brain injuries are insults causing an extensive loss of neurones. Stem cells were detected in the mammalian brain a few years ago giving reason to various regeneration studies themselves. These reports described lesion-induced proliferation and neurogenesis. Based on the later findings further studies showed this endogenous regeneration can be improved by different substances, such as growth factors.

In the present work firstly a model for an acute focal trauma was established which was subsequently used for the investigation of trauma-induced proliferation and neurogenesis.

Underlying the insult model were organotypic hippocampal slice cultures (OHC). They were damaged in the CA2 region employing a scalpel. The investigations on proliferation and differentiation in juvenile OHCs are based on immunohistochemical detection using cell-specific neuronal and glial antibodies. They delivered indications of a continuously occurring neuro- as well as gliogenesis under control conditions. Although the insult results in an amplified lesion-induced proliferation of neuronal cells in this *in vitro* model, the number of newly born neurones decreased over the time of the investigation and therefore demonstrates the limited potential of endogenous regeneration. Short term stimulation of the endogenous progenitor cells with exogenously applied substances could trigger a partially increase in proliferation and neurogenesis in intact as well as lesioned tissue. In this process basic fibroblast growth factor (bFGF), epidermal growth factor (EGF), nerve growth factor (NGF) as well as the serine protease thrombin was examined. In this regard, the influential extend of FGF and EGF alone or/ and in combination on lesion-induced proliferation and neurogenesis was clarified. NGF served as an example to compile a dose response curve which shows that the concentration of an applied substance has a decisive effect on proliferation or neurogenesis. Further, it could be shown that the protease thrombin can increase proliferation after lesion in the used system. However, no effect on neurogenesis could be detected. Instead it increased microgliogenesis when treated with higher concentrations. It appears that these effects are at least partially mediated by the thrombin receptor 1 as the effect can be mimicked using the synthetic thrombin receptor agonist TRag.