

Aus der Klinik für Neurochirurgie  
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar  
Direktor: Prof. Dr. med. Joachim Oertel

**Antiapoptotische Wirkung von G-CSF im Rattenmodell nach Schädigung des  
Nervus cochlearis**

***Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin***  
**der Medizinischen Fakultät**  
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES  
2016

vorgelegt von: Julia Maria Lessing  
geb. am: 26.05.1991 in Weingarten

*Für Papa und Benni*

# Inhaltsverzeichnis

## Abkürzungsverzeichnis

### 1. Zusammenfassung

1.1 Zusammenfassung.....	1
1.2 Abstract.....	3

### 2. Einleitung

2.1 Bcl-2 Familie.....	5
2.2 Bax.....	6
2.3 Bcl-2.....	7
2.4 Apoptose.....	7
2.5 Rolle der Bcl-2 Familie in der Apoptose.....	9
2.6 Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor (G-CSF).....	11
2.7 Auswirkung der Nervenschädigung des N. cochlearis auf dessen Kerngebiet.....	13
2.8 Ziel der Studie.....	13

### 3. Material und Methodik

3.1 Vorprojekt und Gruppenaufteilung.....	15
3.2 Immunhistochemische Färbemethoden	
3.2.1 Färbemethode.....	16
3.2.2 Verdünnung und Zusammensetzung der Lösungen.....	20
3.3 Direkter Apoptosenachweis durch TUNEL	
3.3.1 Färbemethode.....	23
3.3.2 Verdünnung und Zusammensetzung der Lösungen.....	26
3.4 Histologische Auswertung	
3.4.1 Kerngebiet des N. cochlearis.....	29
3.4.2 Kriterien für eine Nervenzelle/ Auswertung der Antikörperfärbungen....	30
3.4.3 Auswertung der TUNEL-Methode.....	33
3.5 Statistische Auswertung.....	33

<b>4. Ergebnisse</b>	
4.1 Bax.....	34
4.2 Bcl-2.....	42
4.3 Apoptosenachweis durch TUNEL.....	50
<b>5. Diskussion</b>	
5.1 Diskussion der Methodik	
5.1.1 Kriterien einer Nervenzelle.....	56
5.1.2 Färbemethoden.....	57
5.1.3 Auswirkung der Nervenschädigung des N. cochlearis auf dessen Kerngebiet.....	58
5.2 Diskussion der Ergebnisse	
5.2.1 Bax.....	59
5.2.2 Bcl-2.....	60
5.2.3 TUNEL.....	61
5.3 Ausblick.....	63
<b>6. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>64</b>

Materialliste

Publikationen

Danksagungen

Lebenslauf

## Abkürzungsverzeichnis

AKN	Akustikusneurinom (e)
Akt-Kinase	Proteinkinase B
Apaf-1	apoptotic protease activating factor
ATP	Adenosintriphosphat
Bad	Bcl-2 associated agonist of cell death
Bak	Bcl-2 homologous antagonist/killer
Bax	Bcl-2 associated X protein
Bcl-2	B-cell lymphoma-2
Bcl-w	Bcl-2-like protein 2
Bcl-xL	B-cell lymphoma-extra large
BH	Bcl-2 homologe Domäne
BH3 only proteine	Proteine der Bcl-2 Familie die nur eine homologe Domäne mit Bcl-2 haben und zwar die 3.
Bid	BH3 interacting-domain death agonist
t-Bid	truncated Bid
Bik	Bcl-2-interacting killer
Bim	Bcl-2-like protein 11
BMF	Bcl-2-modifying factor
BNIP3	BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3
c-IAP-2	Cellular inhibitor of apoptosis protein-2
DAB	Diaminobenzidin
dADP	Desoxyadenosin-Diphosphat

dATP	Desoxy-Adenosintriphosphat
ERK	extrazellulär aktivierte Kinase
FADD	Fas associated death domain
Fas	CD95 (Cluster of differentiation 95)/ APO-1 (apoptosis antigen 1)
G-CSF	Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor
G-CSFR	Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor Rezeptor
HRK	Activator of apoptosis harakiri
IHC	Immunhistochemie
JAK	Januskinasen
JNK	c-Jun-N-terminale Kinase
kDa	Kilodalton
M.	Morbus
MAP-Kinase	mitogen-activated protein kinase
Mcl-1	myeloid cell leukemia Protein
MOMP	Mitochondrial outer membrane permeabilization
MPTP	1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin
N.	Nervus
Ncl.	Nucleus
Ncll.	Nuclei
NeuN	Hexaribonucleotide Binding Protein-3
NGF	Nerval Growth Factor
Noxa	Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1
P53	Tumorsupressor-Protein

PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
Puma	p53 upregulated modulator of apoptosis
SD	Standardabweichung
Src	Tyrosinkinase
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
TNF	Tumornekrosefaktor
TRADD	Tumor necrosis factor receptor type 1-associated DEATH domain protein
TRALI	TNF related apoptosis inducing ligand
TUNEL	TdT-mediated dUTP- biotin nick end labeling
ZNS	Zentrales Nervensystem

# 1. Zusammenfassung

## 1.1 Zusammenfassung

### **Titel:**

*Antiapoptotische Wirkung von G-CSF im Rattenmodell nach Schädigung des Nervus cochlearis*

### **Zusammenfassung:**

In dieser Studie wurde die antiapoptotische Wirkung von Granulozyten-Kolonie stimulierendem Faktor (G-CSF) nach Schädigung des Nervus cochlearis untersucht. Hierzu wurden die Antikörperfärbungen Bax und Bcl-2 verwendet. Ebenfalls wurde ein direkter Apoptosenachweis mit der TUNEL-Methode (TdT-mediated dUTP- biotin nick end labeling) durchgeführt.

Vorausgehende Studien zeigten bereits, dass G-CSF antiapoptotische, antiinflammatorische und neuroprotektive Eigenschaften besitzt.

So wurde in einer vorangehenden Studie unserer Arbeitsgruppe der Nervus cochlearis bei Ratten mit einem Wasserstrahldissektor im rechten Kleinhirnbrückenwinkels geschädigt. Diese Schädigung wirkte sich durch Deafferenzierungsprozesse auf das Kerngebiet des Nervus cochlearis aus. Die Ratten wurden randomisiert drei verschiedenen Gruppen zugeteilt. Der Kontrollgruppe wurde an Tag 1, 3 und 5 nach Schädigung NaCl subkutan gespritzt; der zweiten Gruppe (G-CSF post) wurde an diesen Tagen G-CSF verabreicht. Der letzten Gruppe, der G-CSF pre&post Gruppe, applizierte man zusätzlich zu den Tagen 1, 3 und 5 nach Operation auch einen Tag vor der Operation G-CSF. Nach einer Woche wurden die Ratten perfundiert, die Gehirne für eine Woche in Formalin eingelegt und danach in Paraffin fixiert. Anschließend wurden die Gehirne im Bereich des Hirnstamms in einem Abstand von 5 µm geschnitten und auf Objektträger aufgezogen.

Die Schnitte aus diesem Vorprojekt sind Gegenstand meiner immunhistochemischen Studie. Für die Antikörperfärbungen mit Bax und Bcl-2 wurden Gehirnschnitte auf



Höhe des Kerngebiets des Nervus cochlearis ausgewählt. Die Schnitte wurden entparaffiniert und immunhistochemisch gefärbt. Ebenfalls führte man an vergleichbaren Schnitten ein direkter Apoptosenachweis mit der TUNEL-Methode (TdT-mediated dUTP- biotin nick end labeling) durch.

Die gefärbten Schnitte wurden unter einem Lichtmikroskop (Olympus BX43) betrachtet. Mit Hilfe einer Mikroskopkamera (XC30 Olympus) wurden Bilder angefertigt, die mit der Olympus soft imaging Software (analySIS getIT) ausgewertet wurden.

Die Ergebnisse dieser Studie lassen vermuten, dass G-CSF antiapoptotische Eigenschaften besitzt. Die histologische Auswertung der Antikörperfärbung mit dem proapoptotischen Protein Bax ergaben, dass in der Kontrollgruppe die Zahl der Bax-positive Zellen signifikant höher ist, als in den Gruppen, denen man G-CSF verabreichte. Die Färbung mit antiapoptotischem Antikörper Bcl-2 zeigte, dass Bcl-2-positive Zellen in den Gruppen beider G-CSF Gruppen (G-CSF post und G-CSF pre&post) signifikant höher sind, als in der Kontrollgruppe. Der direkte Apoptosenachweis ergab, dass die Anzahl der TUNEL-positiven Zellen in der Kontrollgruppe signifikant höher ist, als in den beiden G-CSF Gruppen.

Hieraus lässt sich schließen, dass G-CSF in dieser Studie zu einer höheren Expressierung von Bcl-2 in Neuronen führte. Ebenso wurde das proapoptotische Protein Bax geringer exprimiert. Daraus resultiert eine verringerte Anzahl von apoptotischen Nervenzellen im Kerngebiet des Nervus cochlearis durch G-CSF.

Abschließend kann man sagen, dass G-CSF in dieser Studie antiapoptotisch wirkte und sich positiv auf den Erhalt der Nervenzellen im Kerngebiet nach Schädigung des Nervus cochlearis auswirkte. Die antiapoptotische Wirkung wird vermutlich durch die Regulation der Proteine Bax und Bcl-2 beeinflusst.

## 1.2 Abstract

### Title:

The antiapoptotic impact of Granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) in a rat model after cochlear nerve lesion

### Abstract:

In this study we analysed the antiapoptotic impact of Granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) after Nervus cochlearis lesion. For this reason the antibodies Bax and Bcl-2 and a direct proof of apoptosis by TUNEL-method (TdT-mediated dUTP- biotin nick end labeling) were used.

Previous studies showed that G-CSF has antiapoptotic, anti-inflammatory and neuroprotective effects.

In a prior study of our group the cochlear nerve of rats was damaged in the cerebellopontine angle by using a waterjet-dissector. The damage of the nucleus of the cochlear nerve occur by deafferentation. Rats were randomized into three groups. Sodium chloride was given to the control group on day 1, 3 and 5 after the operation. The second group (G-CSF post) received G-CSF at the same days. The last group (G-CSF pre&post) received G-CSF on day 1, 3 and 5 after the lesion and additionally one day before surgery.

The animals were perfused after one week; the brains were fixed in formalin for one week and after this fixed in paraffin. Histological sections of 5 µm were prepared and used for immunohistochemistry.

In the present investigation, histological sections at the level of the cochlear nucleus were used for antibody staining. These sections were dewaxed and used for immunohistochemical staining and direct evidence of apoptosis using the TUNEL-method.

Microscopic analysis was performed with an Olympus microscope (BX43) and a microscopic camera (XC30 Olympus). The pictures were evaluated using Olympus soft imaging Software (analySIS getIT).

The results of the immunohistochemical staining with Bax presented in a significantly higher number of Bax-positive-cells in the control group in comparison with the groups using G-CSF. The proapoptotic protein Bax decreased in the groups treated with G-CSF. The number of Bcl-2-positive-cells in the G-CSF post and G-CSF pre&post group was significantly higher than in the control group. Direct detection of apoptosis using TUNEL revealed a larger number of cells in the control group than in the groups treated with G-CSF. Furthermore results revealed that G-CSF have a positive impact on the Bcl-2-positive-cells. Moreover the count of apoptotic cells increased in the cochlear nuclear complex of the cochlear nerve.

G-CSF presented in this study an antiapoptotic effect preventing neurons of the cochlear nuclear complex after lesion of the cochlear nerve.

## **2. Einleitung**

Das in dieser Studie verwendete histologische Material stammt aus einem vorangehenden Projekt der Arbeitsgruppe Montibeller/ Schackmann/ Urbschat/ Oertel, der Klinik für Neurochirurgie Homburg.

Im Projekt dieser Arbeitsgruppe wurde analysiert, inwiefern sich G-CSF auf die Regenerationsfähigkeit des zuvor geschädigten Nervus cochlearis bei Ratten auswirkt. Nach lateraler suboccipitaler Kraniektomie und mikrochirurgischer Präparation an Sprague-Dawley-Ratten wurde eine Läsion des rechten Nervus cochlearis mit einem Wasserstrahldissektor bei einem Wasserdruck von 8 bar durchgeführt.

Die Tiere wurden willkürlich drei verschiedenen Gruppen zugeteilt. Der Kontrollgruppe wurde an den Tagen 1, 3 und 5 nach der Operation NaCl appliziert. Der zweiten Gruppe (G-CSF post) wurde an den gleichen Tagen G-CSF verabreicht. Die letzte Gruppe (G-CSF pre & post) erhielt G-CSF zusätzlich zu den Tagen 1, 3 und 5 auch einen Tag vor der Operation.

Die Tiere wurden eine Woche nach der Operation perfundiert und das Hirngewebe mit Formalin fixiert. Danach wurde das Gehirn in Formalin eingelegt und eine Woche später in Paraffin eingebettet. Der Hirnstamm wurde im Bereich der Ncll. cochleares in 5 µm dicke Scheiben geschnitten und in definiertem Abstand von jeweils 10 Schnitten mit der Nissl-Färbung (Kresylviolett) gefärbt.

Unter einem Lichtmikroskop wurden die Schnitte im Hinblick auf die Anzahl der Nervenzellen und die Größe des Kerngebiets ausgewertet.

Gegenstand dieser Arbeit ist es, durch Antikörperfärbungen und einen direkten Apoptosenachweis die signifikanten Ergebnisse des vorangegangenen Projekts zu validieren und die intrazelluläre Wirkungsweise von G-CSF immunhistochemisch genauer zu beleuchten.

### **2.1 Bcl-2 Familie**

Mitglieder der Bcl-2 Familie sind Proteine, welche an der Regulation der Apoptose beteiligt sind (68). Jedes Mitglied dieser Familie hat eine oder mehrere Bcl-2 homologe Domänen (BH). Allen gemeinsam ist die BH3 Domäne, welche aus 20 Aminosäuren besteht (61; 70). Die Bcl-2 Familienmitglieder werden in drei Gruppen eingeteilt; die

Gruppe der antiapoptotischen Proteine, die der proapoptotischen Proteine und die der Regulatoren (BH3-only-Proteine). Zur Gruppe der antiapoptotischen Proteine gehören Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1 und Bcl-w. Sie besitzen 4 BH Domänen. Bax und Bak sind Vertreter der proapoptotischen Gruppe, auch BH123-Proteine genannt und haben 3 BH Domänen. Die letzte Gruppe wird BH-3-only-Proteine genannt, weil sie mit Bcl-2 nur die BH 3 Domäne gemeinsam hat. Diese BH3 Domäne ist für den apoptotischen Weg und die dabei entstehende Mitochondrienpermeabilisation unerlässlich. Die BH3-only-Proteine sind vermutlich die entscheidenden Überträger der Todessignale (1; 10; 44). Sie fungieren als Regulatoren der anderen Bcl-2 Familienmitglieder. Zu ihnen gehören Bad, Bik, Bim, Puma, Noxa, Bid, BMF, HRK und BNIP3 (3; 30; 70). Das Gleichgewicht der proapoptotischen und antiapoptotischen Proteine ist wichtig für das Überleben der Zelle.

## **2.2 Bax (Bcl-2 associated X protein)**

Bax gehört zu den proapoptotischen Proteinen der Bcl-2 Familie (3; 65; 67; 88). Es hat ein Molekulargewicht von 21kDa und wird durch sechs Exons kodiert. Bax hat 7 amphiphile Alpha-Helices, welche um zwei zentrale, hydrophobe Alpha-Helices gewunden sind. Die Alpha-9-Helix verdeckt die hydrophoben Seitenketten, sodass Bax für die Interaktion mit antiapoptotischen Proteinen seine Konformation ändern muss. Durch das Entfernen der alpha-9-Helix von der hydrophoben Furche und das Rotieren der Alpha-2-Helix um seine Achse werden die Seitenketten von Bax frei und eine Interaktion mit anderen Proteinen wird möglich (67; 97). Bax ist über seinen C-Terminus in der Mitochondrienmembran verankert, welcher somit für die Lokalisation von Bax verantwortlich ist (88). Bax liegt meistens als Monomer vor, kann aber auch homodimerisieren oder bildet Heterodimere mit Bcl-2. Vor allem das N-terminale Ende von Bax ist für die Oligomerisierung und Apoptoseinitiation von großer Bedeutung (88). Bax ist ein Gegenspieler des antiapoptotischen Proteins Bcl-2. Durch den Anstieg von Bax in der Zelle kommt es vermehrt zu Apoptose, da Bax aus dem Zytosol in die Mitochondrienmembran gelangt und vor allem den intrinsischen Zelltod aktiviert (32; 45; 52; 54; 65; 88). Die proapoptotischen Regulatoren (BH3-only-Proteine) benötigen Bax für die Initiation der Apoptose (48; 106).

## 2.3 Bcl-2 (B-cell lymphoma-2)

Bcl-2 gehört zur Gruppe der antiapoptotischen Proteine (3; 30). Es ist ein integrales, innermitochondriales Membranprotein mit einem Molekulargewicht von 25kDa (37). Bcl-2 besteht aus acht Alpha-Helices und einer hydrophoben Furche an der Oberfläche. Es unterscheidet sich von den anderen antiapoptotischen Proteinen durch eine deutlich größere hydrophobe Furche, welche durch die Alpha-3-Helix gebildet wird (67). Die BH1/2 Domänen von Bcl-2 sind für dessen Funktion wichtig, da Bcl-2 über diese Domänen mit Bax interagieren kann. Durch Interaktion kommt es zur Heterodimerisation mit Bax und dadurch zur Verhinderung der Apoptose (10; 21; 104). Bcl-2 wirkt durch Interaktion und Blockierung von Caspasen antiapoptotisch und verhindert zudem die Bildung reaktiver Sauerstoffradikale (77). Bcl-2 ist ein Protoonkogen und schützt neurale Zellen vor Apoptose, welche durch Wachstumsfaktorentzug, Glukoseentzug, Membranperoxidation und Schäden durch freie Radikale normalerweise ausgelöst werden würde (105). Bcl-2 spielt eine wichtige Rolle in der Entwicklung des Nervensystems und der Regulation neuronales Überlebens (4). Bcl-2 schützt Neurone trotz Abwesenheit des nervalen Wachstumsfaktors (NGF) vor der Apoptose (31).

## 2.4 Apoptose

Als Apoptose wird der programmierte, physiologische Zelltod bezeichnet, welcher aus einem extrinsischen und einem intrinsischen Weg besteht (3; 41; 42; 55; 70; 74). Das Wort Apoptose kommt aus dem Griechischen und bedeutet „Herabfallen wie Blätter von den Bäumen“ (7). Die Apoptose wurde erstmals bei dem Nematoden *C. elegans* nachgewiesen. Dieser Wurm besteht anfangs aus 1090 Zellen und eliminiert davon während seiner Entwicklung 131 durch Apoptose (24). Ein wichtiger Bestandteil der Apoptose sind Caspasen. Caspasen sind Proteasen, die einen Cysteinrest in ihrem aktiven Zentrum haben und ihre Zielproteine spezifisch hinter einem Aspartatrest spalten (3; 74). Caspasen werden als inaktive Vorläufer, sogenannte Procaspasen, synthetisiert und durch proteolytische Spaltung aktiviert. Die Caspasen teilen sich in zwei Gruppen auf; die Gruppe der Initiatorcaspasen und die der Effektorcaspasen. Initiatorcaspasen haben lange Prodomänen und werden durch Dimerisation aktiviert. Zu den Initiatorcaspasen gehören die Caspasen 2,8 und 9. Effektorcaspasen sind Monomere mit kurzer Prodomäne. Unter normalen Umständen sind Effektorcaspasen

inaktiv und nicht durch Autoaktivierung aktivierbar. Sie werden nur durch Spaltung von Initiatorcaspasen aktiviert. Zu ihnen gehören die Caspasen 3,6 und 7 (3; 70).

Der extrinsische Apoptoseweg wird durch sogenannte Todesrezeptoren vermittelt. Zu diesen Rezeptoren zählen der TNF-, TRALI- und der Fas-Rezeptor. Todesrezeptoren sind Transmembranproteine, welche aus einer extrazellulär liegenden, Ligand bindenden Domäne, einer Transmembrandomäne und einer intrazellulären Todesdomäne bestehen (3; 41; 74). Extrazelluläre Proteine wie TNF führen zur Aktivierung des extrinsischen Weges. Auslöser dafür sind unter anderem ionisierende Strahlung, Temperaturerhöhung, Virusinfektionen, toxische Chemikalien und Chemotherapie. Nach Aktivierung bindet TNF an den TNF-Rezeptor und führt zu einer Konformationsänderung am Todesrezeptor. Es kommt zu einer Verbindung der zytoplasmatischen Adapterproteine TRADD, FADD und der Procaspase-8 zu einem Multimerkomplex in der inneren Plasmamembran. Die Procaspasen in diesem Komplex können sich nun gegenseitig spalten und die aktive Caspase-8 wird frei. Caspase-8 kann nun Effektorcaspasen spalten und Apoptose initiieren (41; 61).

Der intrinsische Apoptoseweg ist mitochondrienvermittelt. Er wird durch irreparable genetische Schäden, hohe Calciumkonzentrationen im Zytosol und fehlende Überlebenssignale ausgelöst (3; 41; 61). Hierbei wird Cytochrom c aus dem Intermembranraum der Mitochondrien ins Zytosol freigesetzt. Cytochrom c bindet nun an das im Zytosol gelegene Apaf-1. Das an Apaf-1 gebundene dATP wird zu dADP hydrolysiert und das dADP wird durch ATP oder dATP ersetzt. Dadurch bildet sich ein Multienzymkomplex, ein sogenanntes Apoptosom, welches sich aus der Procaspase-9, Apaf-1 und Cytochrom c zusammensetzt. Procaspase-9 wird in diesem Komplex durch Konformationsänderung aktiviert und es entsteht eine Caspase-9. Diese kann wiederum weitere Effektorcaspasen spalten und es kommt zur Apoptose (3; 41; 61; 85; 86).

Geht eine Zelle in Apoptose, ist sie durch charakteristische Veränderungen gekennzeichnet. Spezifische Kennzeichen sind Schrumpfen, Apoptose-Körperchen, im Kern kondensiertes Chromatin (pyknotischer Kern mit DNA-Segmenten von 150-180 Basenpaaren) und Karyohexis (42).

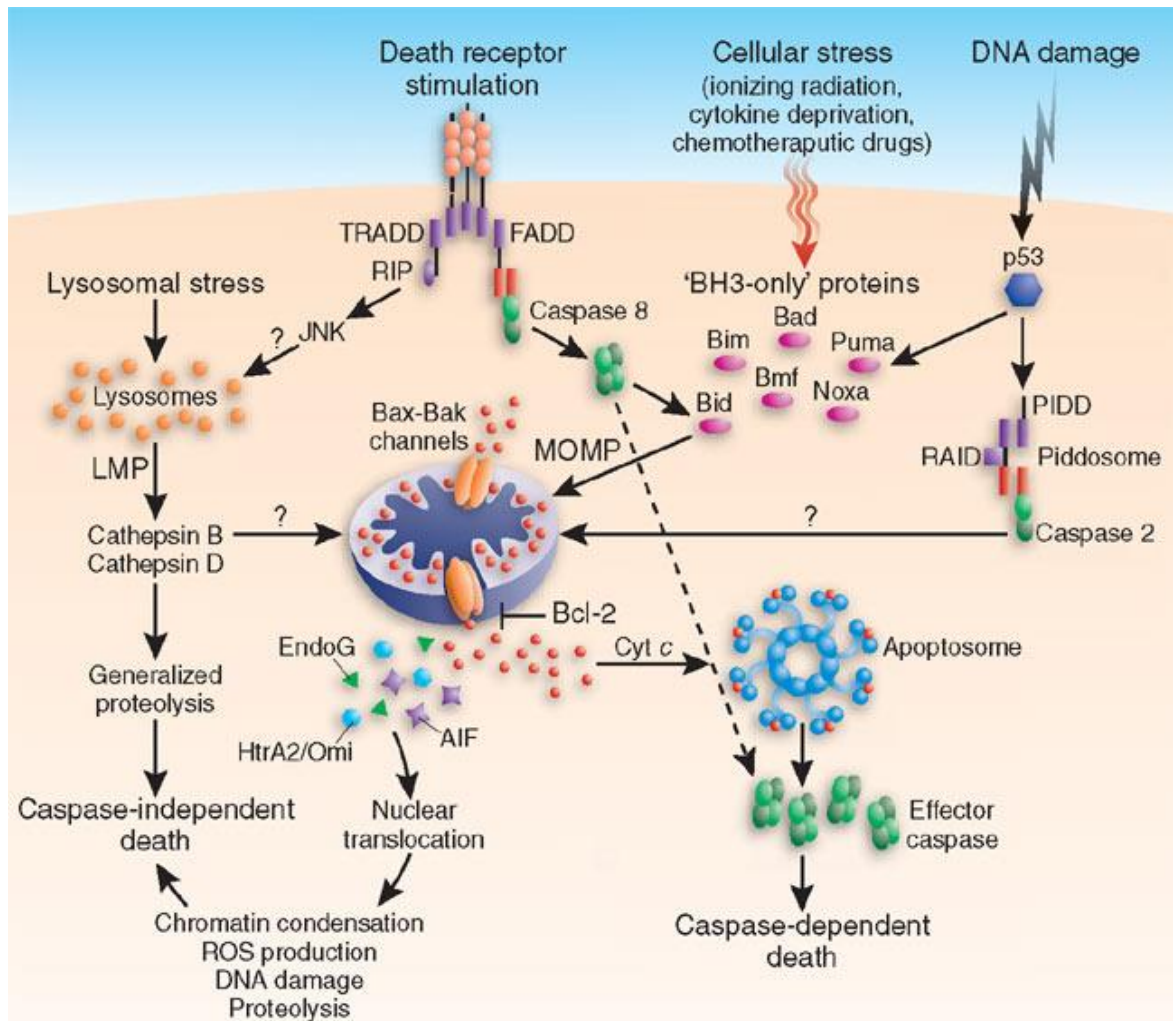


Abb. 2.1 Signalkaskade der Apoptose (47)

## 2.5 Rolle der Bcl-2 Familie in der Apoptose

Die Bcl-2 Familie spielt eine wichtige Rolle im intrinsischen Weg der Apoptose (3; 70; 85; 86). Das proapoptotische Bak ist in der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert, Bax im Zytoplasma. Durch einen proapoptotischen Stimulus werden beide Proteine in die äußere Mitochondrienmembran verlagert, sie oligomerisieren und bilden eine Pore in der Mitochondrienmembran, durch welche proapoptotische Faktoren, wie zum Beispiel Cytochrom c, ins Zytosol gelangen (30; 70). Die antiapoptotischen Proteine Bcl-2 und Bcl-xL befinden sich auf der zytosolischen Oberfläche der äußeren Mitochondrienmembran und helfen die Membranintegrität zu bewahren. Sie hemmen die Apoptose durch Bindung an die BH-3 Domäne proapoptotischer Proteine und



durch die Hemmung von Bax und Bak. Dadurch wird die Oligomerisierung und die Freisetzung von Cytochrom c verhindert (3; 16; 21; 74). Die BH3-only-Proteine werden durch Apoptosestimuli aktiviert und verstärkt gebildet. Sie hemmen die antiapoptotischen Proteine und führen so verstärkt zur Apoptose. Sie bilden das Bindeglied zwischen den Apoptosestimuli und der intrinsischen Apoptose. Ein Beispiel für diese Rolle als Bindeglied ist, dass das Fehlen von extrazellulären Überlebensfaktoren zur Aktivierung der MAP-Kinase JNK führt. Diese Aktivierung führt wiederum zur Transkription des Gens für Bim und leitet somit den intrinsischen Apoptoseweg ein. Des Weiteren wird durch nicht reparable DNA-Schäden das Tumorsuppressorgen p53 aktiviert. Dieses wiederum aktiviert die Transkription der Gene für Puma, Noxa und Bax und führt dadurch zur Aktivierung des intrinsischen Apoptoseweges (3; 74).

Auch der extrinsische Weg kann zur Aktivierung von BH3-only-Proteinen führen. Caspase-8 schneidet Bid, wodurch dieses zu t-Bid wird, welches zum Mitochondrium gelangt und dort antiapoptotische Proteine hemmt und somit über die Aktivierung von Bax und Bak zur Apoptose führt (3; 16; 44; 54; 74; 96). Die Proteine Bim, Bid und Puma können alle antiapoptotischen Bcl-2 Mitglieder hemmen (3; 14; 44; 98). Bad wird durch die Phosphorylierung durch die Akt-Kinase inaktiviert. Dies führt zur Bindung an Protein 14-3-3 und einer Entfernung von Bad aus der Mitochondrienmembran. Es kann somit nicht mehr an Bak oder Bax binden und das Gleichgewicht in der Mitochondrienmembran wird zu Gunsten der antiapoptotischen Proteine verschoben (74). Ebenso besitzt Akt eine antiapoptotische Aktivität in Neuronen (25). Bcl-2 inaktiviert die BH3-only-Proteine tBid, Bim und PUMA und führt dadurch zur Verhinderung der Apoptose (44). Um die Apoptose durch MOMP einzuleiten muss neben der Blockierung antiapoptotischer Proteine zudem immer ein direkter Aktivator von Bax oder Bak anwesend sein (10; 48; 106).

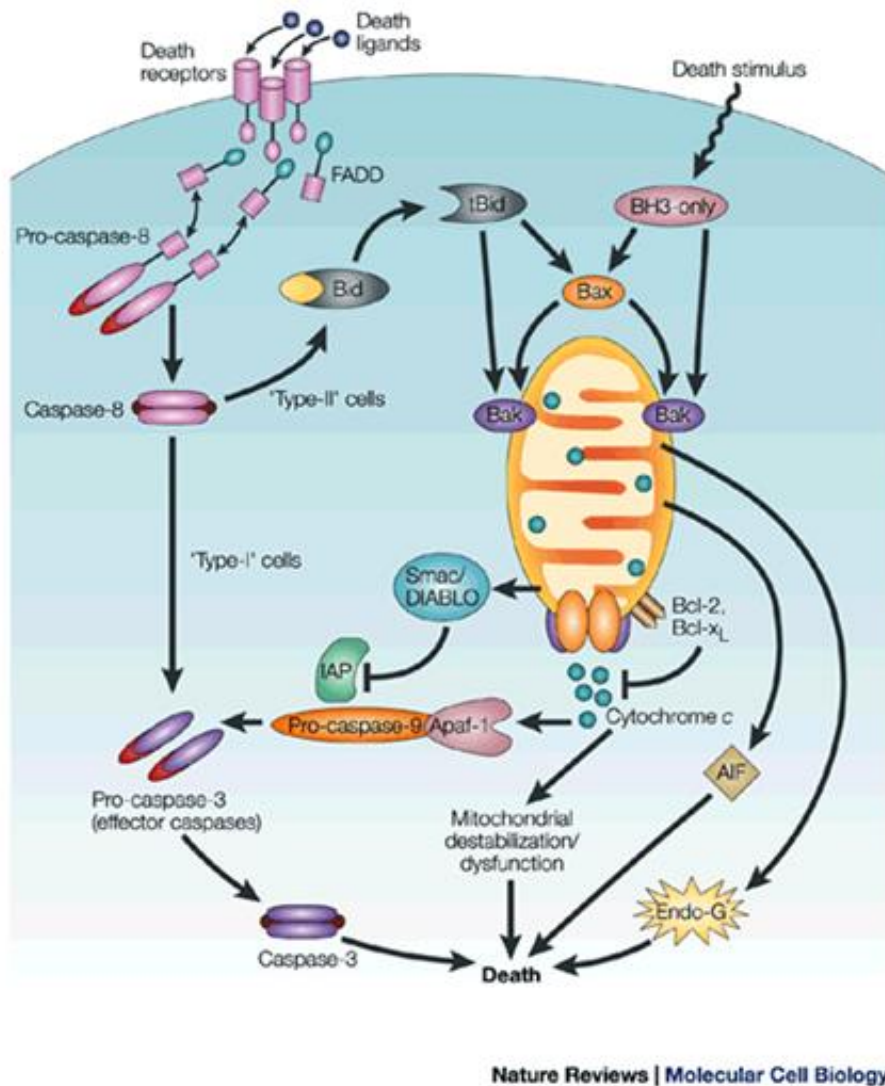


Abb. 2.2 Die Bcl-2 Familie innerhalb der Apoptose (90)

## 2.6 Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor (G-CSF)

G-CSF ist ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 19,6 kDa (29; 62). Es wird durch ein Gen auf Chromosom 17 kodiert und besteht aus 207 Aminosäuren, von welchen 177 für das reife G-CSF kodieren (29; 62). Es fungiert als Wachstumsfaktor, der die Produktion und Freisetzung von neutrophilen Granulozyten aus dem Knochenmark reguliert (19; 20; 23; 40). G-CSF kommt in Zellen des Knochenmarks, Stoma-Zellen, Endothelzellen, Makrophagen und Fibroblasten vor. Ebenfalls wurden G-CSF und sein Rezeptor in Neuronen und Gliazellen nachgewiesen, was durch die Fähigkeit von G-CSF, die Blut-Hirnschranke zu überwinden, erklärt werden kann (19;

75; 84). In einem gesunden Organismus ist die Menge an G-CSF im Körper unter der Nachweisgrenze ( $\leq 100\text{pg/ml}$ ) (19). In vorhergehenden Studien wurde gezeigt, dass je nach Krankheit dieser G-CSF-Spiegel im menschlichen Körper variiert und nachweisbar werden kann (95). G-CSF wird heutzutage schon als Medikament bei Patienten eingesetzt, die auf Grund von malignen Erkrankungen mit myelotoxischen Chemotherapeutika behandelt werden müssen. Durch Chemotherapeutika induzierte Neutropenien besteht ein höheres Infektrisiko für die Patienten (2; 29; 40). G-CSF wird auch nach Chemotherapie und Knochenmarktransplantation verabreicht, da es zur Wiederherstellung von Granulozyten, Thrombozyten und Makrophagen führt. Dies geschieht durch die Mobilisierung von Progenitorzellen, welche zur Differenzierung und Reifung der geschädigten Zellen führen (7; 12; 64). Darüber hinaus stimuliert G-CSF die Src-Familien-Kinasen, welche wiederum PI3/Akt aktiviert. Durch diese PI3/Akt Aktivierung führt G-CSF zur Stimulation hämatopoietischer Zellen und wirkt antiapoptotisch (15; 23; 76; 94). Ebenso hat G-CSF starken Einfluss auf das zentrale Nervensystem. G-CSF wirkt durch seine antiapoptotischen Effekte und durch die Stimulierung und Differenzierung von Zellen neuroprotektiv. G-CSF aktiviert im zentralen Nervensystem zum einen STAT3 durch Phosphorylierung und zum anderen den Akt Weg (46; 49; 50; 63; 72; 75; 76; 84; 93; 103). Der antiapoptotische Akt Weg wirkt dem Untergang von Neuronen entgegen, was die neuroprotektive Wirkung von G-CSF unterstreicht (75). G-CSF senkt im Tiermodell nach Rückenmarksverletzungen die Apoptoserate von Nervenzellen, erhöht die funktionelle Integrität von Neuronen nach Schädigung und verbessert das motorische Ergebnis (15; 34; 35; 69). In tierexperimentellen Studien zum Thema Schlaganfall konnte G-CSF das Gehirn durch die Blockade der Apoptose und Entzündung schützen. Einerseits wird ein reduziertes Infarkt volumen und bessere neurologische Testergebnisse beschrieben, andererseits konnte ein Abfall der inflammatorischen Zytokine TNF-alpha und NeuN beobachtet werden (83). Dieses Ergebnis führt zu der Annahme, dass G-CSF die Zytokin- und Chemokinproduktion reguliert (33; 101). In einer nachfolgenden, randomisierten kontrollierten Patientenstudie zum Thema Schlaganfall konnten bessere neurologische Ergebnisse nach 12 Monaten durch die Therapie mit G-CSF erzielt werden (82). Nach Schädigung des N. opticus mit darauffolgender Neurodegeneration wirkt G-CSF antiapoptotisch, neuroprotektiv und antiinflammatorisch (11; 93; 94). G-CSF wirkt bei Ratten mit zerebraler fokaler Ischämie ebenfalls antiapoptotisch, neuroprotektiv und antiinflammatorisch (46; 72; 84). Die Bax-Translokation und

dadurch die Cytochrom c Freisetzung wird durch G-CSF vermindert (49; 84). Ebenfalls erhöht die Applikation von G-CSF die Bcl-2-Spiegel (46; 49; 50; 84). Auch nach Ischämie durch Hypoxie führt G-CSF zu einem geringeren Neuronenverlust durch Erhöhung der Bcl-2 und Senkung der Bax-Spiegel (13; 103). Im Alzheimermodell reduziert G-CSF den Gedächtnisverlust und verbessert die neurologischen Funktionen (92). Auch in einem Versuchsmodell bezüglich M. Parkinson wirkt G-CSF neuroprotektiv, da es ERK aktiviert und somit durch Phosphorylation von Bad, Verringerung von Bax und Erhöhung des antiapoptotischen Bcl-xL und Bcl-2 die Neurone in der Substantia Nigra schützt (9; 38; 58).

## **2.7 Auswirkung der Nervenschädigung des N. cochlearis auf dessen Kerngebiet**

Eine Schädigung des Hörnervens durch Deafferenzierungsprozesse und reaktive Gliosen dehnt sich bis in die Kerngebiete des N. cochlearis aus (78-80). Sekiya et al. stellten fest, dass Traumata des N. cochlearis zu einer Degeneration der Neurone in den Kerngebieten führen (57; 78; 79). Als Ursache der Degeneration der Neurone im Kerngebiet vermuten die Autoren einen Verlust der Balance zwischen exzitatorischen und inhibitorischen synaptischen Transmissionen nach Deafferenzierung (78). Ebenfalls führt eine mechanische Läsion des N. cochlearis zu einem Haarzellverlust im Corti-Organ, welcher mit einer Degeneration der Axone in den Kerngebieten der Nuclei cochleares einhergeht (59). Auf Grund dieser Studienlage liefert eine Auswertung der Kerngebiete des N. cochlearis nach dessen Schädigung aussagekräftig.

## **2.8 Ziel der Studie**

Das Ziel dieser Studie ist es, die antiapoptotische Wirkung von G-CSF an den Nuclei cochleares nach Schädigung des N. cochlearis am Kleinhirnbrückenwinkel zu untersuchen. Durch die Antikörperfärbungen und den direkten Apoptosenachweis sollen die signifikanten Ergebnisse der Arbeitsgruppe Montibeller/ Schackmann/ Urbschat/ Oertel validiert und die intrazelluläre Wirkungsweise von G-CSF genauer beleuchtet werden. Hierzu dient der Nachweis des antiapoptotischen Proteins Bcl-2,

des proapoptotischen Proteins Bax und des direkten Nachweises der Apoptose durch die TUNEL-Methode. In der Einleitung wurde bereits beschrieben, dass Bcl-2 und Bax eine wichtige Rolle in der Apoptose spielen und durch G-CSF beeinflusst werden. Bei Operation im Kleinhirnbrückenwinkel, insbesondere bei AKN Operationen, kann es zur Schädigung des N. cochlearis kommen, was im schlimmsten Fall einen permanenten Hörverlust zur Folge hat (5; 24; 26; 57; 60; 102). Da G-CSF in diversen Studien seine neuroprotektive Fähigkeit gezeigt hat, sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, inwieweit G-CSF zum Schutz der Zellen in den Nuclei cochleares beitragen kann (5; 24; 26; 57; 60; 102).

In dieser Studie sollen folgende Fragestellungen beantwortet werden:

1. Wirkt sich G-CSF auf die Anzahl der Bax-positiven Nervenzellen im Kerngebiet des N. cochlearis aus?
2. Wirkt sich G-CSF auf die Anzahl der Bcl-2-positiven Nervenzellen im Kerngebiet des N. cochlearis aus?
3. Wirkt sich G-CSF auf die Anzahl der apoptotischen Nervenzellen im Kerngebiet des N. cochlearis aus?

### 3. Material und Methodik

Im folgenden Kapitel wird die Methodik dieser Studie genauer erläutert. Im ersten Abschnitt wird das vorherige Projekt unserer Arbeitsgruppe vorgestellt, aus welchem das histologische Material dieser Studie stammt. Danach werden die immunhistochemischen Färbemethoden mit Bcl-2 und Bax Antikörpern, sowie der direkte Apoptosenachweis mittels TUNEL-Methode erklärt. Im Anschluss werden die Auswertungskriterien der histologischen Schnitte und die Methoden der statistischen Auswertung beschrieben.

#### 3.1 Vorprojekt und Gruppeneinteilung

Die in dieser Studie verwendeten Schnitte stammen aus einem Projekt der Arbeitsgruppe Montibeller/Schackmann/Urbschat/Oertel der Neurochirurgischen Klinik der Universität des Saarlandes. In deren Projekt wurden männliche Sprague-Dawley-Ratten verwendet. Die Ratten wurden randomisiert drei verschiedenen Gruppen zugeteilt. Jede Gruppe bestand aus 6 Tieren:

1. Kontrollgruppe	An Tag 1,3 und 5 nach der Operation wurde NaCl verabreicht.
2. G-CSF post-Gruppe	An Tag 1,3 und 5 nach der Operation wurde G-CSF verabreicht.
3. G-CSF pre&post-Gruppe	Einen Tag vor der Operation und an den Tagen 1,3 und 5 nach der Operation wurde G-CSF verabreicht.

Im Kleinhirnbrückenwinkel wurde der N. cochlearis mit einem Wasserstrahldissektor auf der rechten Seite geschädigt. Sieben Tage nach der Operation wurden die Tiere perfundiert, die Gehirne für eine Woche in Formalin fixiert und danach in Paraffin eingebettet. Anschließend untersuchte man die Wirkung von G-CSF auf die Anzahl

der Neurone und die Größe des Kerngebiets des N. cochlearis mit Hilfe der Nissl-Färbung.

In dieser Studie wird die antiapoptotische Wirkung von G-CSF in den Nuclei cochleares immunhistochemisch untersucht. Dieses Projekt stellt somit ein Folgeprojekt der Arbeitsgruppe Montibeller/ Schackmann/ Urbschat/ Oertel dar.

## **3.2 Immunhistochemische Färbemethoden**

### **3.2.1 Färbemethoden**

Die immunhistochemischen Färbungen der Antikörper Bax und Bcl-2 wurden nach der Biotin-Streptavidin-Peroxidase-Methode gefärbt. Bei dieser Methode bindet ein unkonjugierter Primärantikörper an ein Antigenepitop. An den Primärantikörper bindet ein biotinylierter Sekundärantikörper, welcher mit dem enzymmarkierten ABC-Komplex reagiert. Am Farbstoff DAB kommt es zu einer Oxidation des an den Marker Biotin gebundenen Enzyms Peroxidase. Dadurch wird der lösliche Farbstoff DAB wasserunlöslich und es kommt zu einem braunen Farbumschlag, welcher histologisch ausgewertet werden kann.

#### Auswahl der Schnitte:

Für die Färbung wurden Gehirnschnitte auf Höhe der Ncll. cochleares im Abstand von 5 µm ausgewählt. Ventral und dorsal der Mitte des Kerngebiets wurde jeder 2. Schnitt mit Bcl-2 und jeder 3. mit Bax als Primärantikörper gefärbt. Bezüglich Bcl-2 wurden bei jedem Tier auf beiden Seiten jeweils 6 Schnitte ausgewertet. Es wurden insgesamt 216 Schnitte mit dem Primärantikörper Bcl-2 gefärbt. Mit Bax als Primärantikörper wurden insgesamt 144 Schnitte gefärbt. Diese wurden nach dem gleichen Prinzip wie die Schnitte aus der Färbung mit Bcl-2 ausgewählt und aufgeteilt. Bei dieser Färbung wurden 4 Schnitte pro Tier pro Gruppe und pro Seite des Kerngebiets des N. cochlearis ausgewertet.

#### Entparaffinierung:

Der erste Schritt der Antikörperfärbung war die Entparaffinierung der Schnitte. Dazu wurden sie für 30 min bei 58°C senkrecht in einen Wärmeschrank gestellt.

Anschließend wurden die Schnitte unter dem Abzug jeweils für 5 min dreimal in Xylol gestellt. Danach legte man sie für je 3 min in eine absteigende Ethanolreihe mit 100% Ethanol, 96% Ethanol und 70% Ethanol. Im nächsten Schritt wurden die Schnitte mit destilliertem Wasser abgespült.

#### Demaskierung der Proteinstruktur:

Als nächstes wurden die Schnitte in eine, mit Citratpuffer gefüllte, Küvette in einen zuvor aufgeheizten Dampfgerar gestellt und für 20 min gekocht. Dieser Schritt verbesserte die immunhistochemischen Färbeergebnisse, da die durch die Paraffineinbettung maskierten Proteinstrukturen der Gehirnschnitte durch die Hitze und den Citratpuffer wieder demaskiert wurden. In diesem Schritt kam es zu einer Wiederherstellung der ursprünglichen Tertiärstruktur der Proteine. Nach dem Kochen wurde die Küvette mit den Schnitten zum Abkühlen für 20 min aus dem Dampfgerar genommen. Anschließend wurden die Schnitte zweimal für je 5 min mit Tris-Puffer gespült, um Rückstände vorheriger Schritte zu entfernen.

#### Blockierung der endogenen Peroxidase:

Im nächsten Schritt wurde die endogene Peroxidase blockiert. In der Zelle, vor allem in Hämproteinen, kommt natürlicherweise eine endogene Peroxidase vor. Diese könnte am Ende den durch die Färbung zugegebenen Farbstoff umsetzen und eine falsch positive Färbung oder eine starke Hintergrundfärbung verursachen. Durch die durchgeführte Blockierung wurde somit gewährleistet, dass der Farbstoff nur durch extern zugefügte Peroxidase umgesetzt wird. Hierfür wurden die Schnitte für 20 min in 0,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und Methanol gestellt. Nach diesem Schritt wurden die Schnitte wieder zweimal für je 5 min mit Tris-Puffer gespült.

Jeder Objektträger wurde vorsichtig abgetrocknet und der Gehirnschnitt mit einem Immupen umfahren. Der so entstandene wachsartige Kreis um den Gehirnschnitt diente als Flüssigkeitsbarriere, so dass für die Antikörperfärbung nur eine geringe Menge der Substanzen benötigt wurde. Im Folgenden wurden jeweils 50 µl der verschiedenen Substanzen auf einen Schnitt gegeben.

#### Inkubation mit dem Primärantikörper:

Vor der Inkubation mit dem Primärantikörper wurden 50 µl goat-Normalserum, in der Verdünnung 1:20, für 30 min auf jeden Schnitt gegeben. Das Normalserum stammt



immer von der Tierspezies, aus welcher auch der Sekundärantikörper gewonnen wurde. Dieser Schritt führte zu einer Glättung der Oberfläche. Dadurch wurden Strukturen des Gehirnschnittes, die nicht spezifisch für den Antikörper sind, durch diesen nicht mehr erkannt und somit nicht mehr gebunden. Ohne das Normalserum würde der konstante Teil des Antikörpers an Proteine des Schnittes binden und somit zu einem falsch positiven Ergebnis führen. Durch Hinzugeben des Normalserum wird die Hintergrundfärbung also minimiert. Die Schnitte wurden für die Inkubation mit dem Normalserum in eine feuchte Kammer gelegt, um ein Austrocknen zu verhindern.

Nachdem der Schnitt vorbereitet war, wurde er in einer feuchten Kammer mit dem Primärantikörper (Bax oder Bcl-2) bei 4°C über Nacht inkubiert. Hierzu wurden polyklonale rabbit IgG Primärantikörper (Firma Santa Cruz Biotechnology) verwendet. (Abb. 1, Bild 2) Der polyklonale Antikörper ist aus einem Plasmazellpool und hat verschiedene Klonalitäten, das heißt, er richtet sich gegen verschiedene Epitope des gleichen Antigens.

#### Inkubation mit dem Sekundärantikörper:

Am nächsten Morgen wurden die Schnitte zweimal für je 5 min mit Tris-Puffer gespült, um alle Primärantikörper, die nicht an ein Antigen gebunden haben, zu entfernen. Anschließend wurde der polyklonale goat-anti-rabbit Sekundärantikörper für 30 min auf die Schnitte gegeben. (Abb. 1 Bild 3) Im Anschluss spülte man die Schnitte wieder zweimal für je 5 min mit Tris-Puffer, um überflüssige Sekundärantikörper zu entfernen.

#### Zugabe des ABC-Komplexes:

Nun wurden die Schnitte mit einem, 30 min zuvor angesetzten, ABC-Reagenz (Avidin-Biotin-Enzym-Komplex) für 20 min bedeckt. (Abb. 1 Bild 4) Avidin, welches im ABC-Komplex enthalten ist, ist ein aus Hühnereiweiß isoliertes Glykoprotein mit 4 Bindungsstellen für Biotin. Biotin ist ein wasserlösliches Vitamin, welches für Avidin eine sehr hohe Affinität hat. Die Bindung zwischen Avidin und Biotin ist die stärkste nonkovalente Bindung, die wir kennen. Bei dem ABC-Komplex ist Avidin nur an 3 Bindungsstellen mit Biotin gesättigt, so dass eine Bindungsstelle frei ist. Dies führt dazu, dass Avidin noch ein Biotin binden muss, um die energetisch beste Konformation zu erreichen. Dieses Biotin findet sich an dem Sekundärantikörper, da dieser biotinyliert ist. Die so entstandene Avidin-Streptavidin-Brücke bindet das biotinylierte Enzym irreversibel an den sekundären Antikörper. Die Schnitte wurden danach

zweimal für je 5 min mit Tris-Puffer gespült. Dadurch wurden die ABC-Komplexe, die nicht an einen Sekundärantikörper gebunden haben, abgewaschen.

#### Zugabe des DAB-Reagenz:

Nun wurde das DAB-Reagenz für 5 min auf die Schnitte gegeben. Es entstand ein braunes wasserunlösliches Präzipitat, welches als brauner Farbumschlag im Zytoplasma der Neurone zu sehen ist. Danach wurden die Schnitte mit destilliertem Wasser gespült. Abschließend wurden die Schnitte für 1 min mit Kernechtrot gegengefärbt. Kernechtrot ist ein saurer Farbstoff aus Aluminiumsulfat, welcher die Kerne rot anfärbt.

Zur Fixierung der Schnitte wurden sie unter dem Abzug jeweils für eine Minute in einer aufsteigenden Ethanolreihe mit 70%, 96% und zweimal 100% und anschließend für je 2 min zweimal in Xylol entwässert.

Es wurde ein Tropfen Roti-Histokit auf die Schnitte gegeben und mit einem Deckglas befestigt. Danach wurden die Schnitte eine Nacht an der Luft getrocknet und am nächsten Morgen ausgewertet.

Bei jedem Färbedurchgang wurde eine Negativkontrolle mitgeführt, um die Färbung zu validieren.

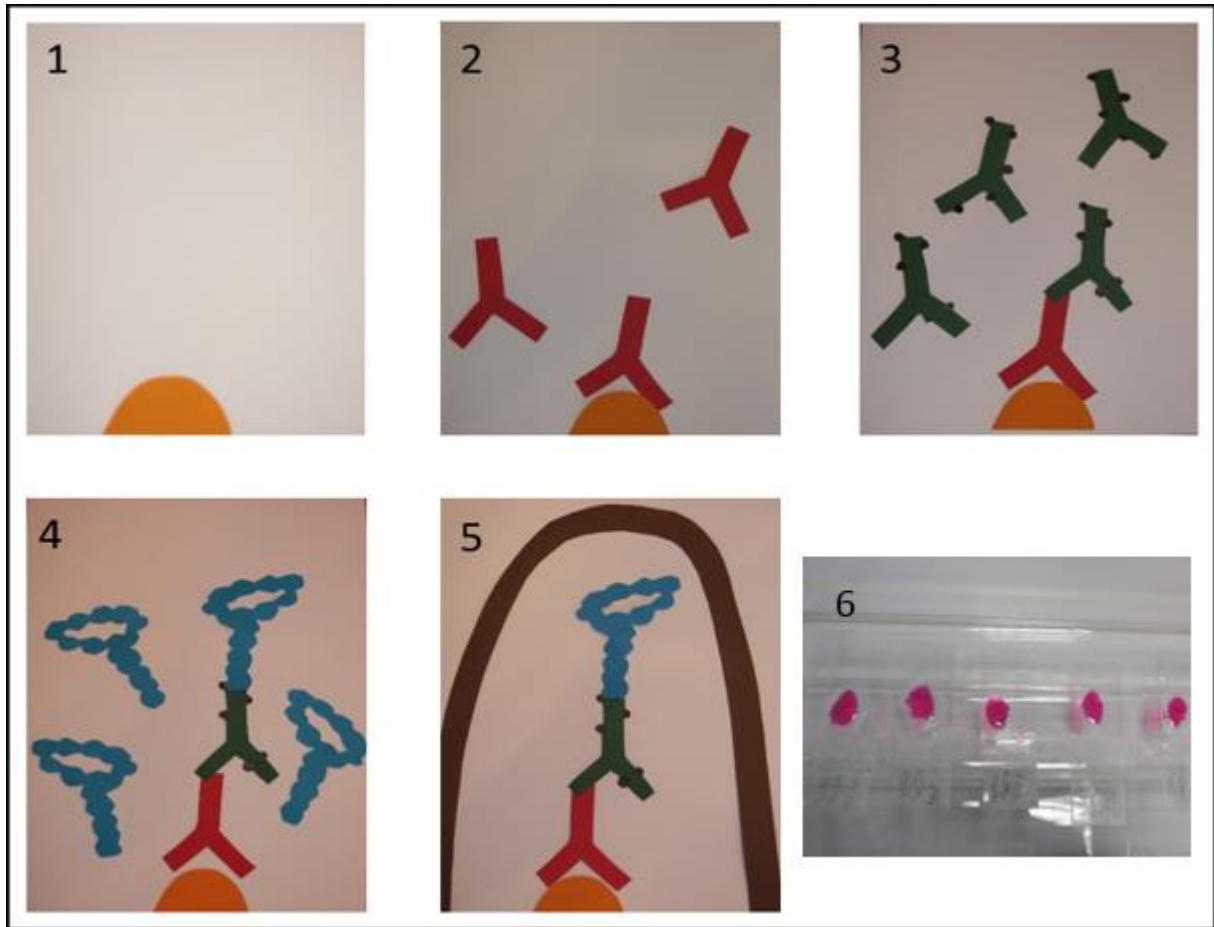


Abb. 3.1 Schritte der immunhistochemischen Antikörperfärbung mit Bax und Bcl-2. Das erste Bild stellt das nachzuweisende Antigen in Gelb dar. Das zweite Bild zeigt die Zugabe der polyklonalen-IgG-rabbit Primärantikörper in Rot. Auf dem dritten Bild ist die Zugabe des biotinylierten goat-anti-rabbit-IgG Sekundärantikörpers in grün dargestellt. Das vierte Bild bildet die Zugabe des ABC-Komplexes in blau ab. Bild Nummer fünf dokumentiert den durch DAB entstandenen braunen Farbumschlag. Das letzte Bild zeigt die Gegenfärbung mit Kernechtrot.

### 3.2.2 Verdünnung und Zusammensetzung der Lösungen

#### Tris-Puffer:

Die Stammlösung wurde 0,5 molar angesetzt. Es wurden 63,5 g Tris-Säure und 11,8 g Tris-Base in einem Liter destilliertem Wasser gelöst. Zur Herstellung der Gebrauchslösung (0,05 molar) wurden 100 ml Stammlösung mit 15 g NaCl gemischt und mit destilliertem Wasser auf 1 Liter aufgefüllt. Zur späteren

Verdünnung der Antikörper wurde ein Becherglas dieser Lösung abgefüllt und beiseite gestellt. Der restliche Teil der Lösung wurde mit 1 ml Tween20 versetzt und als Spül-Puffer verwendet (im Kapitel 3.2.1 als Tris-Puffer bezeichnet).

#### Citrat-Puffer:

Für die 0,1 molare Stammlösung wurden 29,4 g Tri-Natriumcitrat-Dihydrat in 900 ml destilliertem Wasser gelöst und der pH-Wert wurde auf 6,0 eingestellt. Anschließend wurde die Stammlösung auf 1 Liter aufgefüllt. Die 0,01 molare Gebrauchslösung wurde 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt.

#### Blockieren der endogenen Peroxidase:

1ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 99 ml Methanol

#### Normalserum:

10 µl goat-Normalserum + 200 µl Tris-Lösung + 1 Tropfen Avidin

#### Primärantikörper Bcl-2:

Verdünnung 1:200 (ein Tropfen Biotin entsprechen 50 µl)

1 µl polyklonaler rabbit-IgG-Primärantikörper Bcl-2 + 150 µl Tris + 1 Tropfen Biotin

#### Primärantikörper Bax:

Verdünnung 1:100 (ein Tropfen Biotin entsprechen 50 µl)

1 µl polyklonaler rabbit-IgG-Primärantikörper Bax + 49 µl Tris + 1 Tropfen Biotin

#### Sekundärantikörper:

1 µl polyklonaler goat anti-rabbit IgG + 200 µl Tris + 60 µl Normalserum

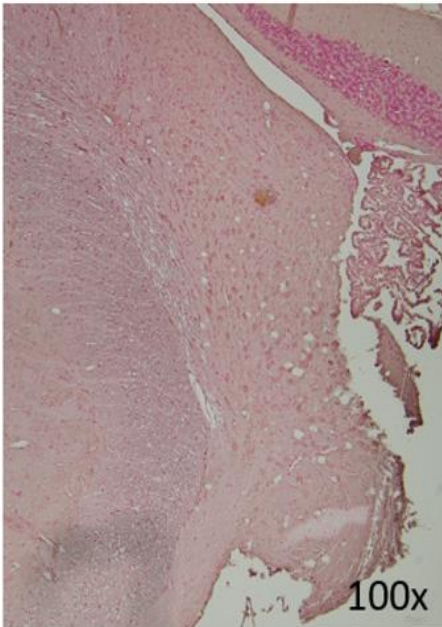
#### ABC-Reagenz:

250 µl Tris + 5 µl Reagenz A + 5 µl Reagenz B

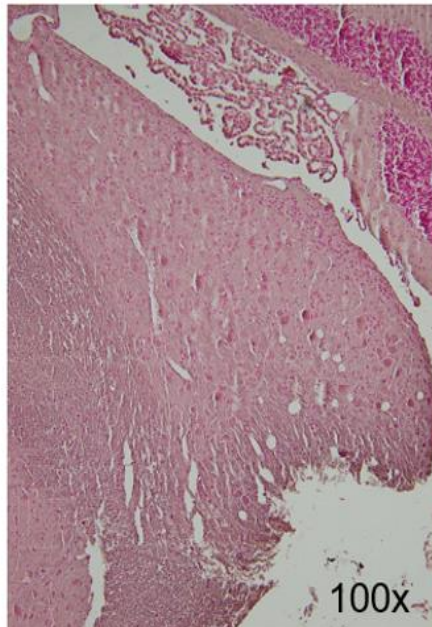
#### DAB (Diaminobenzidin):

2,5 ml destilliertes Wasser + 1Tropfen Puffer-Stammlösung + 2 Tropfen DAB-Stammlösung + 1 Tropfen Hydrogen-Peroxid-Lösung + 1Tropfen Nickel-Lösung

### Kontrollgruppe



### G-CSF post Gruppe



### G-CSF pre&post Gruppe

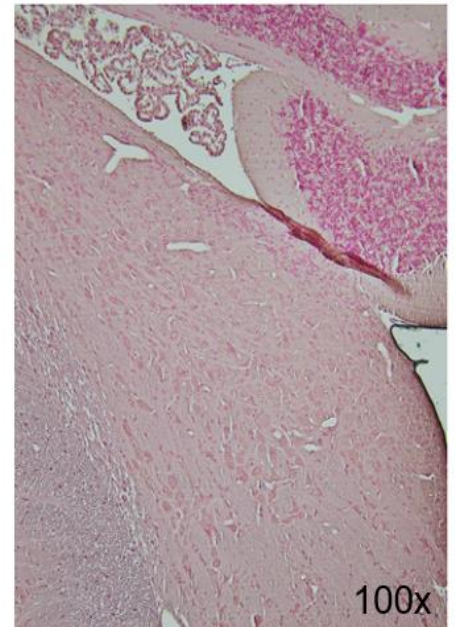
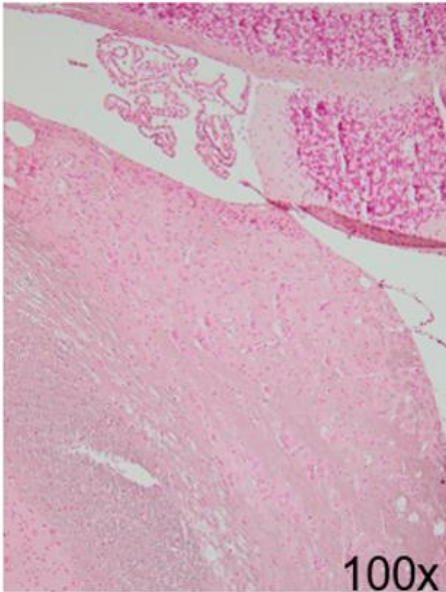


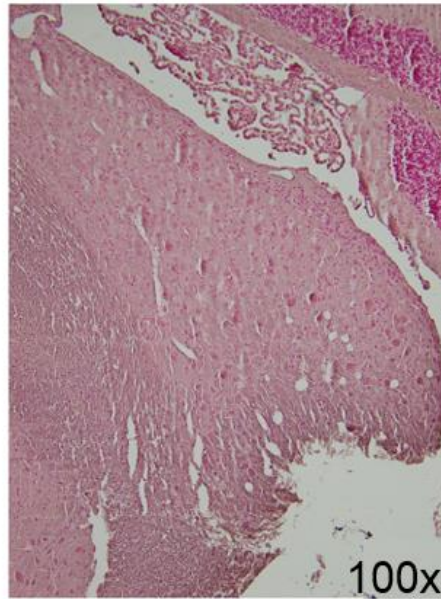
Abb. 3.2 Diese Abbildung zeigt die Bax Antikörperfärbung in den drei verschiedenen Gruppen dieser Studie. Jedes Bild ist eine 100-fache Vergrößerung des Kerngebietes des N. cochlearis. Das erste Bild zeigt einen histologischen Schnitt der Kontrollgruppe. Das zweite Bild dokumentiert einen histologischen Schnitt der G-CSF post Gruppe. Das dritte Bild bildet einen histologischen Schnitt der G-CSF pre&post Gruppe ab.



Kontrollgruppe



G-CSF post Gruppe



G-CSF pre&post Gruppe

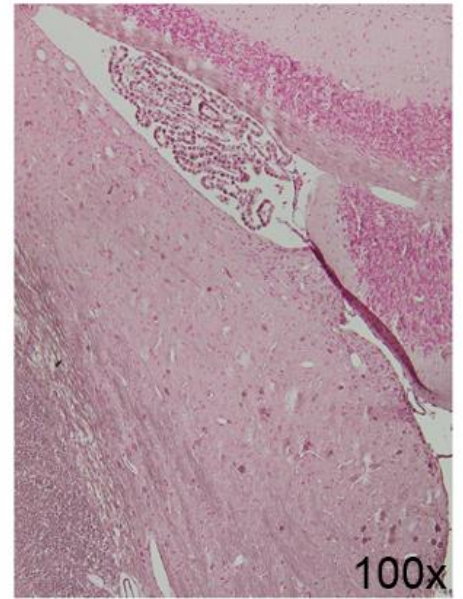


Abb. 3.3 Diese Abbildung zeigt die Bcl-2 Antikörperfärbung in den drei verschiedenen Gruppen dieser Studie. Jedes Bild ist eine 100-fache Vergrößerung des Kerngebietes des N. cochlearis. Das erste Bild zeigt einen histologischen Schnitt der Kontrollgruppe. Das zweite Bild dokumentiert einen histologischen Schnitt der G-CSF post Gruppe. Das dritte Bild bildet einen histologischen Schnitt der G-CSF pre&post Gruppe ab.

### **3.3 Direkter Apoptosenachweis durch TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL)**

#### **3.3.1 Färbemethode**

TUNEL ist eine Methode zum direkten Apoptosenachweis. Bei der Apoptose wird die DNA im Zellkern fragmentiert und es entstehen freie 3'-OH-Enden. Die TUNEL-Methode verwendet diese Enden, um durch verschiedene Färbeschritte am Ende in der Zelle einen Farbumschlag zu bewirken. Mit Hilfe des braunen Farbumschlags wird die, sich in Apoptose befindende, Zelle sichtbar und kann histologisch erfasst werden. Bei der TUNEL-Methode wurden zwei Kits NeuroTACS-II verwendet, welche zusammen für genau 60 Schnitte ausgelegt waren. Es wurden 30 Schnitte pro Seite und 10 Schnitte pro Gruppe gefärbt. Die verwendeten Gehirnschnitte wurden so nah wie möglich an der Mitte der Kerngebiete des N. cochlearis gewählt.

Im ersten Schritt wurden die Schnitte entparaffiniert. Dafür wurden sie für 30 min bei 58°C in den Wärmeschrank gestellt, um das Paraffin zu schmelzen. Anschließend gab man die Schnitte 3-mal für jeweils für 5 min in Xylol und danach für je 3 min in die absteigende Ethanolreihe. Die Ethanolreihe bestand aus 100%-, 96%- und 70%-Ethanol.

Als nächstes folgte der In-Situ-labeling-Prozess. Hierfür wurden die Schnitte nach der Rehydratation für 10 min in 1XPBS gestellt. Danach wurden sie für 20 min in einer Küvette mit Citratpuffer in einen aufgeheizten Dampfgarer eingetaucht. Nach dem Kochen wurde die Küvette zum Auskühlen für 10 min aus dem Dampfgarer genommen. Das Dampfgaren in Citratpuffer brach die zuvor durch Paraffineinbettung bedingten veränderten Tertiärstrukturen wieder auf, was ein besseres Färbeergebnis zur Folge hatte. Die Schnitte wurden nun vorsichtig abgetrocknet und das Gehirn wurde mit dem Immun-Pen umrandet. Es wurden für 30 min je 50 µl Neuropore in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur auf die Schnitte gegeben. Neuropore ist ein Permeabilisations-Reagenz, welches gleichzeitig die morphologischen Strukturen der Zellen erhält. Danach wurden die Schnitte 2-mal für je 2 min in 1XPBS gewaschen um überflüssige Reagenzien zu entfernen und die Färbung nicht zu verfälschen.

Im nächsten Schritt gab man die Schnitte für 5 min in eine Quenching-Solution. Diese blockierte die natürlich in Zellen vorkommende endogene Peroxidase, da bei der hier verwendeten TUNEL-Methode der spätere Farbumschlag durch eine Peroxidasereaktion erfolgt. Durch diese Blockierung stellt man sicher, dass nur durch exogen zugefügte Peroxidase der Farbumschlag entstehen kann und es keine falsch positiven Ergebnisse gibt. Danach wurden die Schnitte wieder für 1 Minute in 1XPBS gewaschen.

Als Vorbereitung für die nachfolgende Reaktion mit dem Labeling-Reaktions-Mix wurden die Schnitte für 5 min in einen TdT-Labeling-Puffer gestellt. Danach folgte die Inkubation der Schnitte mit je 50 µl Labeling-Reaktions-Mix bei 37°C im Wärmeschrank für 60 min. Anschließend wurden die Schnitte in einen 1XTdT Stop-Puffer gelegt um die Markierung der freien 3'-OH-Enden zu beenden. Danach wurden die Schnitte wieder in 1XPBS gewaschen.

Um den Farbumschlag durch die Peroxidasereaktion zu ermöglichen, wurden die Schnitte für 10 min mit je 50 µl Strep-HRP-Lösung (horseradish peroxidase) bei

Raumtemperatur in der feuchten Kammer inkubiert. Sie wurden danach für je 2 min 2-mal in 1XPBS gewaschen.

Um die apoptotischen Zellen sichtbar zu machen brachte man die Schnitte für 7 min in die DAB-Lösung. Anschließend wurden die Schnitte 4-mal für je 2 min in destilliertem Wasser gespült und anschließend mit Kernechtrot für 30 sec gegengefärbt.

Die Schnitte wurden anschließend jeweils 20-mal in destilliertes Wasser und 70%-, 96%-, 100%-Ethanol sowie in Xylol getaucht. Um die Schnitte haltbar zu machen wurden sie mit einem Tropfen RotiHistokitt bedeckt und es wurde darauf ein Deckglas gelegt. Die Schnitte trockneten über Nacht und wurden anschließend ausgewertet.

Bei jedem Färbedurchgang wurde eine Positivkontrolle und eine Negativkontrolle mitgeführt. Bei der Negativkontrolle wurde bei der Inkubation mit dem Labeling-Reaktions-Mix das TdT-Enzym weggelassen, um sicherzustellen, dass Strep-HRP spezifisch bindet und keine Hintergrundfärbung besteht. Somit war garantiert, dass es nur einen Farbumschlag gab, wenn freie 3'-OH-Enden nachgewiesen werden konnten. Wenn das Enzym, wie in der Negativkontrolle, fehlt, gibt es diesen Nachweis nicht. Bei diesen Negativkontrollen haben sich auf Grund des fehlenden Enzyms keine Nervenzellen braun angefärbt. Die Positivkontrolle wurde benutzt, um freie 3'-OH-Enden im Gewebe zu finden und, durch die TUNEL-Methode und den dadurch entstehenden braunen Farbumschlag, nachzuweisen. Sie ist also eine Kontrolle dafür, dass die hier angewendete Permeabilisation und das Labeling funktionieren. Durch diese zwei Kontrollen wurde die Färbemethode validiert.



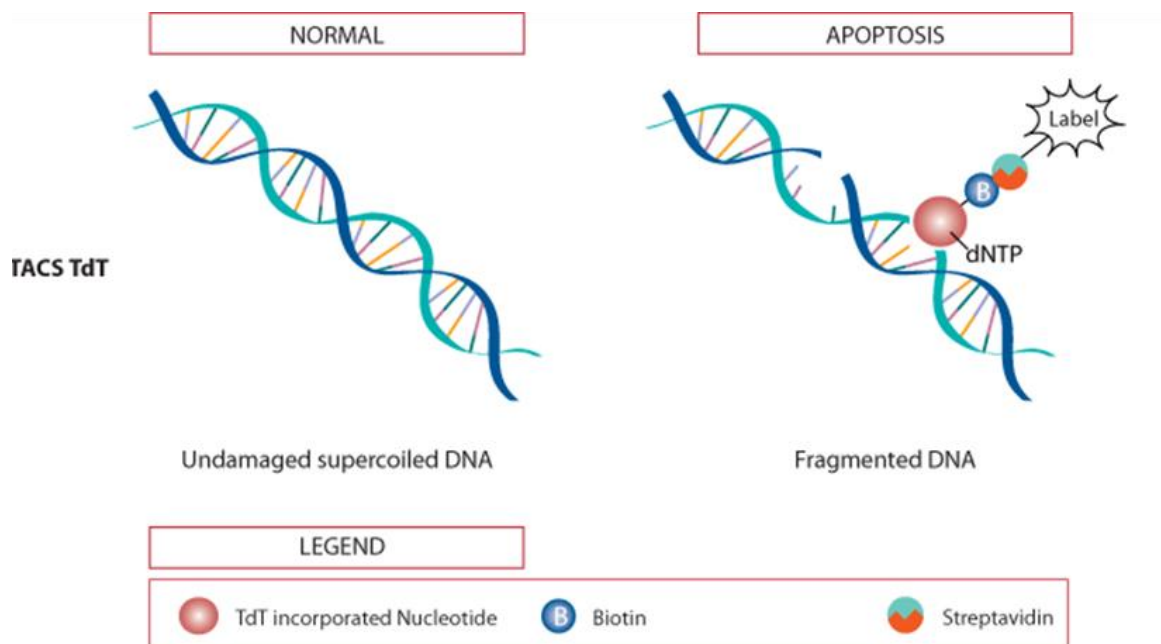


Abb. 3.4 Schritte der TUNEL-Methode in schematischer Darstellung. Das linke Bild zeigt einen intakten DNA-Strang. Auf der rechten Seite ist der DNA-Strang einer apoptotischen Zelle dargestellt. An die freien 3'-OH-Enden des fragmentierten DNA-Strangs lagert sich dNTP an. An dieses binden wiederum Biotin und Streptavidin, wodurch eine Enzymreaktion mit anschließendem Farbumschlag ausgelöst wird (71).

### 3.3.2 Verdünnung und Zusammensetzung der Lösungen

#### PBS:

Waschpuffer für die TUNEL-Methode

10XPBS wird angesetzt aus 13,35g Dinatriumhydrogensulfat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), 3,45g Natriumdihydrogensulfat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) und 84,74g Natriumchlorid ( $\text{NaCl}$ ), welche mit einem Liter destilliertem Wasser aufgefüllt werden. Anschließend wurde ein pH-Wert von 7,4 eingestellt.

1XPBS wird aus 10XPBS durch verdünnen mit destilliertem Wasser im Verhältnis 1:10 hergestellt.

#### NeuroPore:

NeuroPore ist ein proprietäres Permeabilisierungs- und Blockierungsmittel und ist in dem NeuroTacs-II-Kit bereits fertig enthalten.

- Quenching-Solution: Sie besteht aus 45 ml Methanol und 5 ml 3% Hydrogenperoxid und darf erst kurz vor Gebrauch angesetzt werden.
- TdT-Labeling-Puffer: Er wird aus dem schon fertig gelieferten 10XTdT-Labeling-Puffer mit destilliertem Wasser im Verhältnis 1:10 verdünnt.
- Labeling-Reaktions-Mix: Beispiel für einen Schnitt:  
1 µl TdT dNTP Mix + 1 µl TdT-Enzym + 50 µl TdT-Labeling-Puffer + 1 µl Mangan-Kationen  
Für die Positivkontrolle wurde zusätzlich 1 µl TACS Nuclease (eine proprietäre Endonuklease) hinzugefügt.  
Für die Negativkontrolle wurde das TdT-Enzym weggelassen.
- TdT-Stop-Puffer: Dieser Puffer wurde aus dem schon fertig gelieferten 10XTdT-Stop-Puffer im Verhältnis 1:10 mit destilliertem Wasser für den Gebrauch verdünnt.
- Strep-HRP-Lösung: Diese wurde direkt vor Gebrauch angesetzt und besteht aus 50 µl 1XPBS und 1 µl Strep-HRP je Schnitt.
- DAB-Lösung: Für das DAB-Reagenz wurden 50 ml 1XPBS + 250 µl DAB + 50 µl DAB-Enhancer + 50 µl 30% Hydrogenperoxid gemischt.

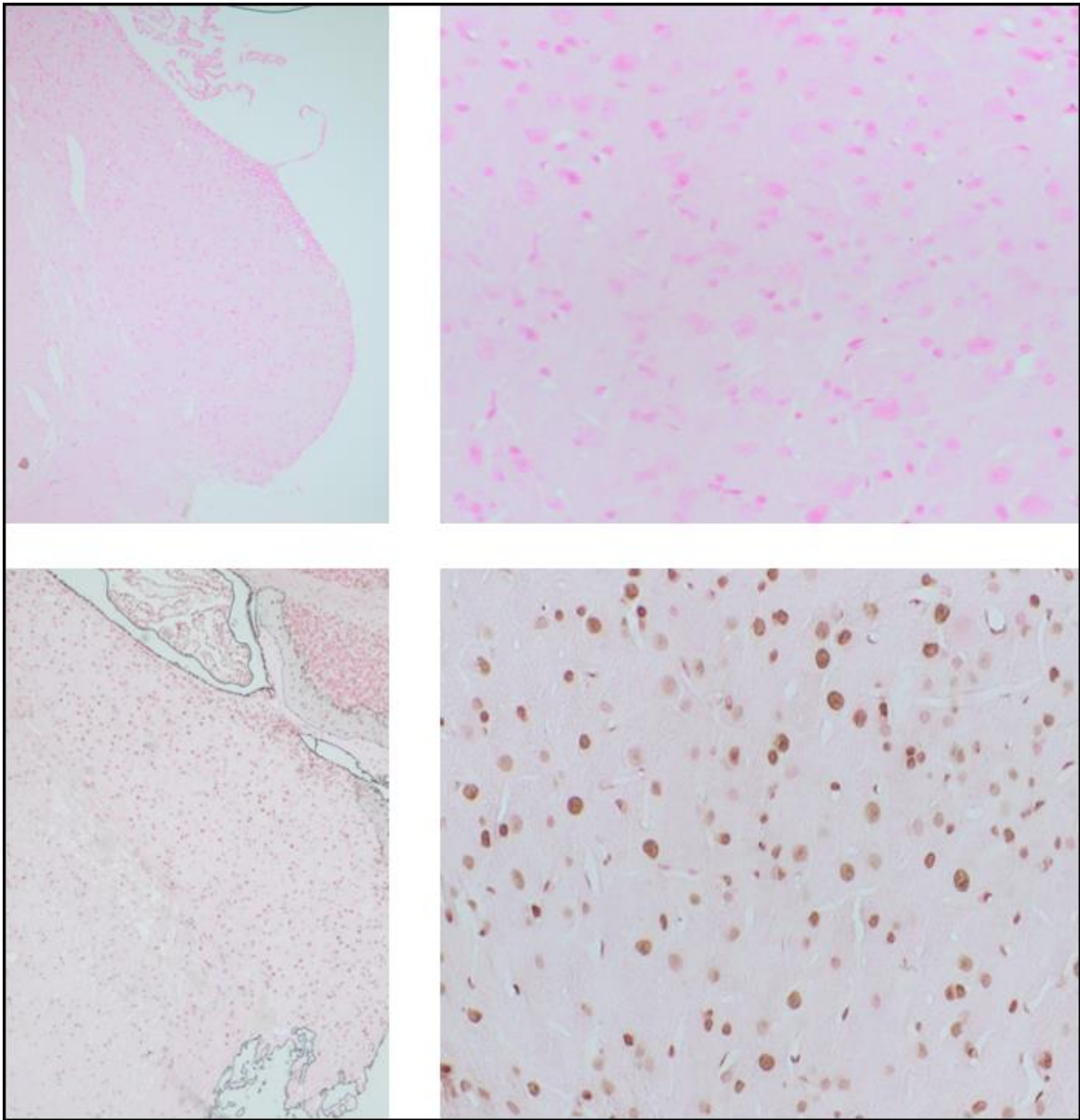


Abb. 3.5 Ausschnitt aus dem Kerngebiet des N. cochlearis. Oben sind die Negativkontrollen, unten die Positivkontrollen der TUNEL-Methode dargestellt. Links ist jeweils ein Schnitt in der 40-fachen Vergrößerung und rechts in der 200-fachen Vergrößerung dargestellt. In der Positivkontrolle stellen alle braun angefärbten Nervenzellen apoptotische Zellen dar.

## 3.4 Histologische Auswertung

### 3.4.1 Kerngebiet des N. cochlearis

In dieser Arbeit wurde die Anzahl der Nervenzellen im Kerngebiet des N. cochlearis untersucht. Es wurden nur Nervenzellen innerhalb dieses genau definierten Bereichs gewertet.



Abb. 3.6 Kerngebiet des N. cochlearis. In dieser Abbildung wird das ausgewertete Kerngebiet des N. cochlearis rot umrandet dargestellt. Auf der linken Seite sieht man die schematische Zeichnung aus dem Atlas ( Swanson L.W., Brain Maps: Structure of the Rat Brain 107) und auf der rechten Seite sieht man ein immunhistochemisches Präparat.

### 3.4.2 Kriterien für eine Nervenzelle

Damit eine Nervenzelle als solche gewertet wurde, musste sie bestimmte Kriterien erfüllen. Diese Kriterien waren für beide Antikörperfärbungen dieselben. Eine Nervenzelle musste fünf Kriterien erfüllen um in die histologische Auswertung einzugehen (90; 91):

1. Es musste eine intakte Zellmembran sichtbar sein.
2. Es musste eine intakte Kernmembran sichtbar sein.
3. Es musste ein einzelner, dunkler Nukleolus sichtbar sein.
4. Es musste das Zytoplasma klar erkennbar sein.
5. Der Farbumschlag des Zytoplasmas musste eine von drei Intensitätsstärken aufweisen (27; 51; 68):
  - a. Das Zytoplasma zeigte einen sehr starken braunen Farbumschlag wie bei der in Abb. 3.6 mit einem schwarzen Kreis dargestellten Nervenzelle. Diese Nervenzellen wurden als zweifach positiv gewertet.
  - b. Das Zytoplasma zeigte einen schwächer braunen Farbumschlag wie bei der in Abb. 3.6 mit einem grünen Kreis dargestellten Nervenzelle. Diese Nervenzellen wurden als einfach positiv gewertet.
  - c. Das Zytoplasma zeigte keinen braunen Farbumschlag wie bei der in Abb. 3.6 mit einem blauen Kreis dargestellten Nervenzelle. Diese wurden als nicht mit dem Antikörper angefärbte Nervenzellen gewertet.





Abb. 3.7 Ausschnitt aus dem Kerngebiet des N. cochlearis. Schwarz umrandet eine zweifach positive mit dem Antikörper angefärbte Nervenzelle, grün umrandet eine einfach positive Nervenzelle und blau umrandet eine nicht mit dem Antikörper angefärbte Nervenzelle.

Alle 3 Färbemethoden wurden lichtmikroskopisch mit dem Mikroskop Olympus BX43 mit der 100-fachen Vergrößerung ausgewertet. Die Bilder wurden mit der Mikroskopkamera (XC30 von Olympus) erstellt und mit der Olympus soft imaging Software (analySIS getIT) ausgewertet.



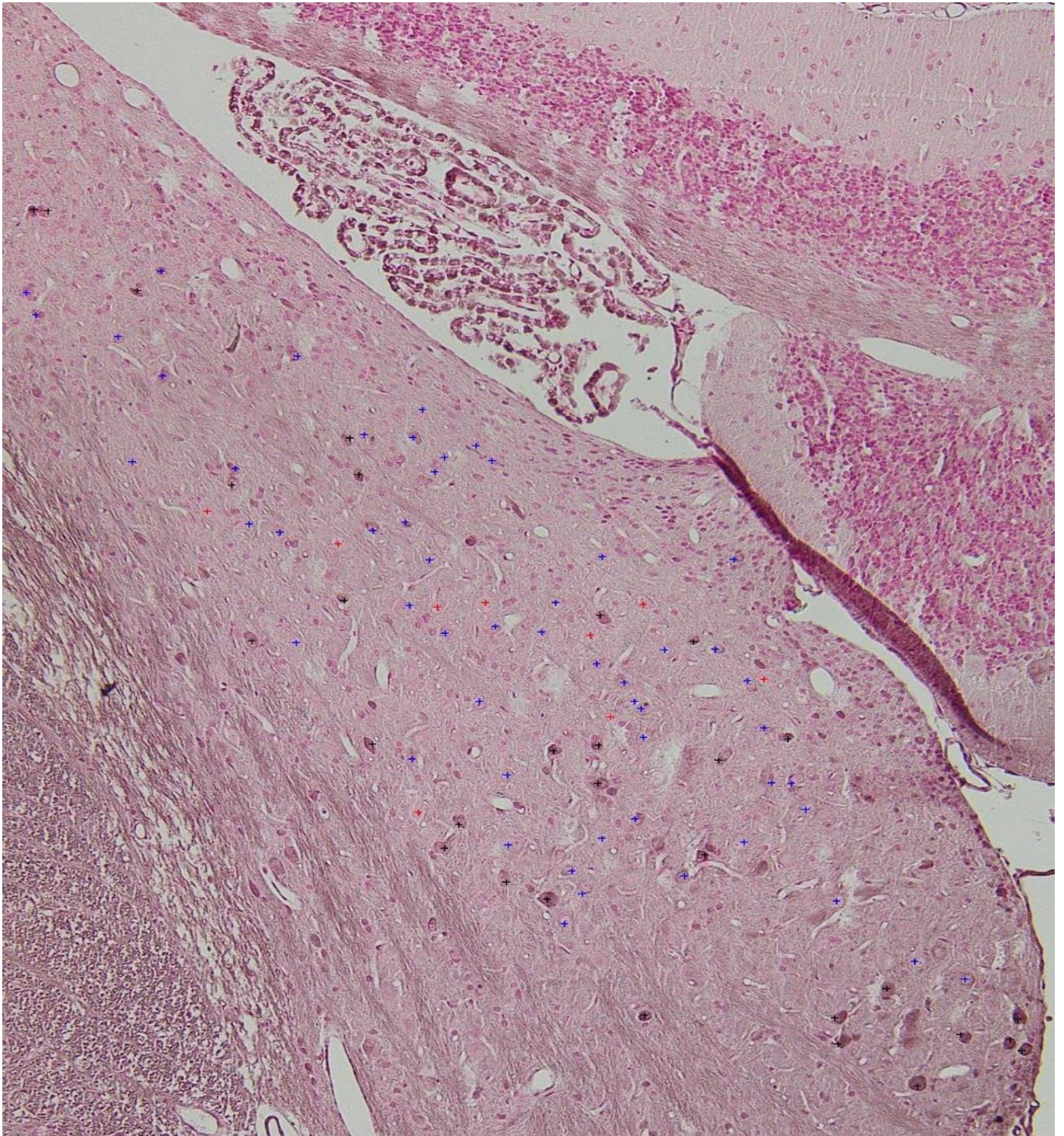


Abb. 3.8 Antikörperfärbung mit Bax: Diese Abbildung zeigt einen histologischen Schnitt der Antikörperfärbung der G-CSF post Gruppe. Die roten, blauen und schwarzen Kreuze stammen aus der Olympus soft imaging Software, (analysis getIT Software) mit welcher die histologische Auswertung erfolgte. Die Auswertung erfolgte in drei verschiedenen Intensitätsstufen. Die roten Kreuze stehen für Nervenzellen, welche sich nicht mit dem Antikörper angefärbt haben, die Blauen stehen für einfach positiv angefärbte Nervenzellen und die Schwarzen stehen für zweifach positiv angefärbte Nervenzellen.



### **3.4.3 Auswertung der TUNEL-Methode**

Die Auswertung der TUNEL-Methode erfolgte mit der 200-fachen Vergrößerung. Die TUNEL-Färbung wurde mit einem Lichtmikroskop (Olympus BX43) ausgewertet. Die Bilder wurden mit einer Mikroskopkamera (XC30 von Olympus) gemacht und mit der Olympus soft imaging Software (analySIS getIT) ausgewertet.

Da mit der TUNEL-Methode apoptotische Zellen nachgewiesen werden, können die Kriterien der Antikörperfärbungen hier nicht angewandt werden. TUNEL positive Zellen erkennt man an dem schwarz-bräunlichen Farbumschlag und den in der Einleitung beschriebenen apoptotischen zellmorphologischen Veränderungen.

## **3.5 Statistische Auswertung**

Die histologischen Daten wurden mit GraphPad Prism 6 ausgewertet. Es wurde der one-way ANOVA Bonferroni-Test für alle Grafiken mit mehr als 2 beteiligten Gruppen verwendet. Grafiken mit jeweils nur 2 Gruppen wurden mit dem student's t-Test für unverbundene Stichproben ausgewertet.



## 4. Ergebnisse

Das folgende Kapitel enthält die Ergebnisse dieser Studie, bestehend aus den immunhistochemischen Nachweisen der Antikörper Bax und Bcl-2, sowie dem direkten Apoptosenachweis mittels TUNEL-Methode.

Zunächst werden die histologischen Ergebnisse des proapoptotischen Proteins Bax dargestellt. Anschließend werden die Ergebnisse des antiapoptotischen Proteins Bcl-2 näher beleuchtet. In der jeweiligen Auswertung werden die unterschiedlich stark angefärbten Nervenzellen im Kerngebiet der Ncll. cochleares unter dem Lichtmikroskop erfasst. Abschließend werden die Ergebnisse des direkten Apoptosenachweises mittels TUNEL-Methode vorgestellt.

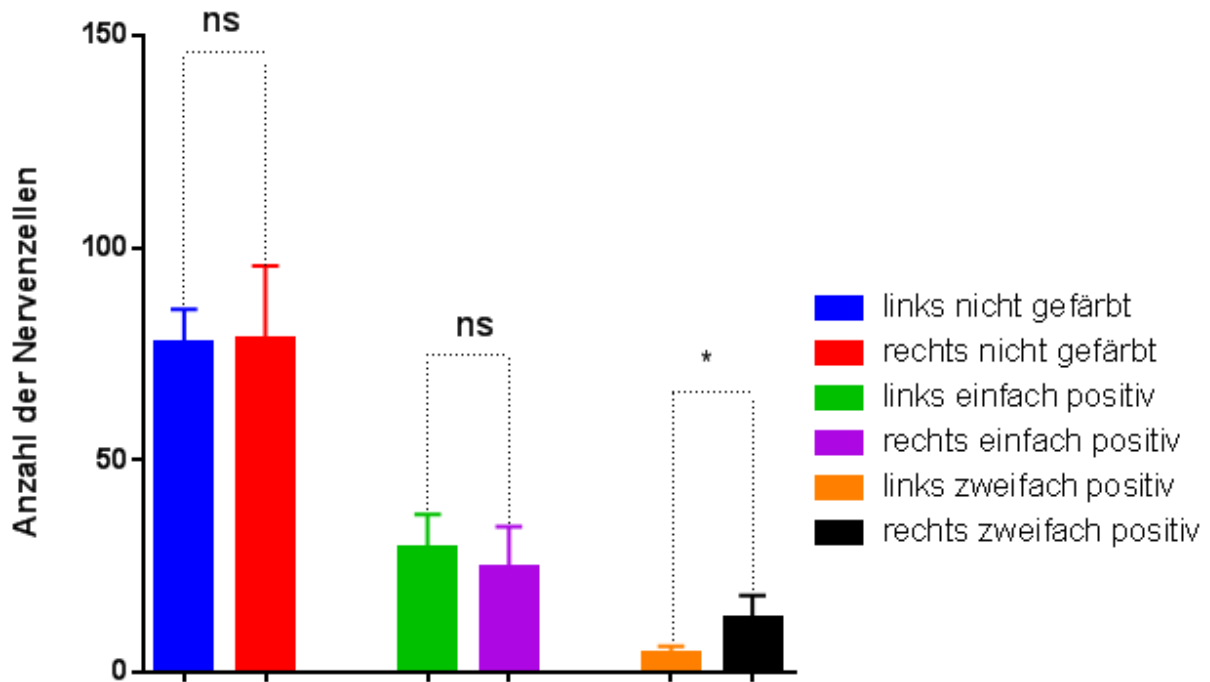
### 4.1 Bax

Die folgenden Ergebnisse verdeutlichen den Effekt von G-CSF auf die Regulierung des proapoptotischen Proteins Bax. Es wird veranschaulicht, dass die Applikation von G-CSF eine signifikante Supprimierung des proapoptotischen Proteins zur Folge hat. Hierdurch können erste Rückschlüsse auf die neuroprotektive und antiapoptotische Wirkung von G-CSF geschlossen werden.

Die unter 4.1 aufgeführten Abbildungen beziehen sich auf den Einfluss von G-CSF auf das proapoptotische Protein Bax. Verglichen wird die Anzahl der Nervenzellen im linken, nicht geschädigten Kerngebiet des N. cochlearis und im rechten, geschädigten Kerngebiet im Hinblick auf die Expressierung von Bax. Der Vergleich bezieht sich auf die Anzahl der nicht mit Bax angefärbten Nervenzellen und Bax-positiver Nervenzellen unterschiedlicher Intensität.

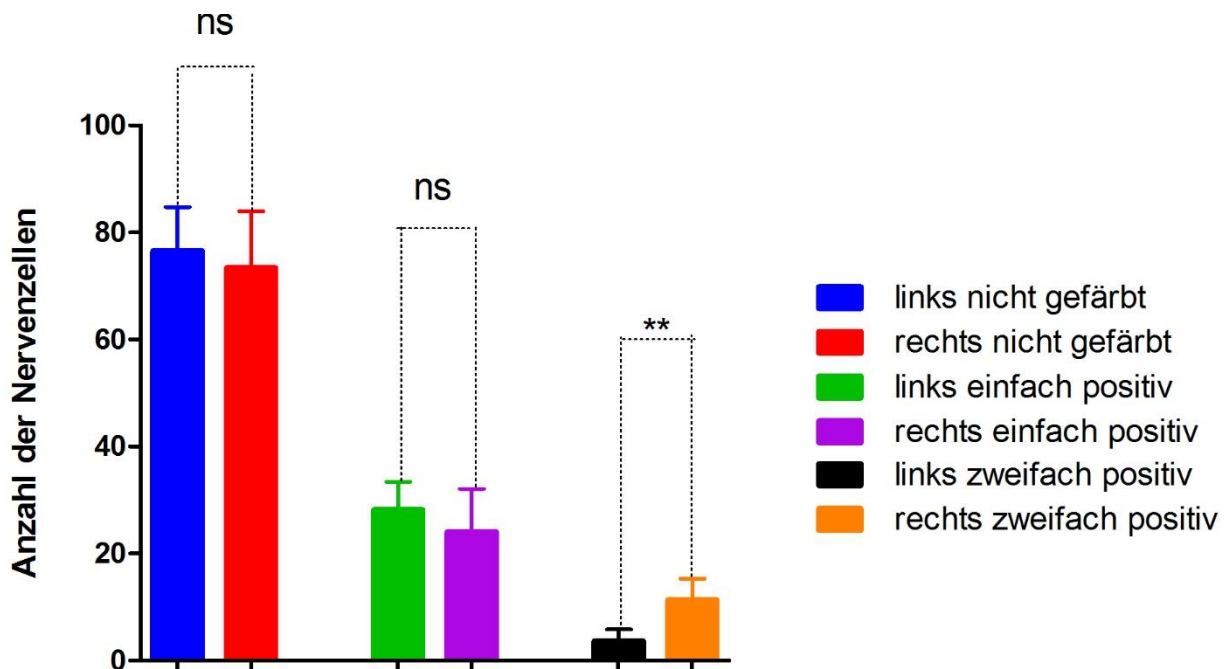
Die beiden folgenden Grafiken stehen für die beiden G-CSF Gruppen (G-CSF post und G-CSF pre&post) dieser Studie. Dargestellt ist die Anzahl der Nervenzellen im rechten und linken Kerngebiet des N. cochlearis im Vergleich. Innerhalb der G-CSF

post Gruppe (Abb. 4.1) besteht ein statistisch signifikantes Ergebnis bezüglich der Bax zweifach positiven Nervenzellen ( $p < 0,05$ ). Das gleiche Ergebnis findet sich in der G-CSF pre&post Gruppe (Abb. 4.2). Auch hier liefert die Auswertung der Bax zweifach-positiven Nervenzellen ein statistisch signifikantes Ergebnis ( $p < 0,01$ ).



#### Bax G-CSF post linke und rechte Seite im Vergleich

Abb. 4.1 Säulendiagramm: Diese Grafik zeigt den Einfluss von G-CSF auf das proapoptotische Protein Bax in der G-CSF-post Gruppe. Gezeigt werden die nicht mit Bax angefärbten Nervenzellen und die Bax positiven Nervenzellen unterschiedlicher Intensität. Die Säulenhöhe entspricht den jeweiligen Mittelwerten.



#### Bax G-CSF pre&post linke und rechte Seite im Vergleich

Abb. 4.2 Säulendiagramm: Diese Grafik zeigt den Einfluss von G-CSF auf das proapoptotische Protein Bax in der G-CSF-pre&post Gruppe. Gezeigt werden die nicht mit Bax angefärbten Nervenzellen und die Bax-positiven Nervenzellen unterschiedlicher Intensität. Die Säulenhöhe entspricht den jeweiligen Mittelwerten.

Die folgende Tabelle enthält die genauen Werte der histologischen Auswertung aller mit Bax angefärbten Nervenzellen auf der rechten und linken Seite:

<b>G-CSF post Gruppe rechts</b>	<b>Mittelwert</b>	<b>Standardabweichung (+/-)</b>
nicht gefärbte Nervenzellen	78,5	17,23
einfach positive Nervenzellen	24,7	9,64
zweifach positive Nervenzellen	12,8	5,24

<b>G-CSF post Gruppe links</b>	<b>Mittelwert</b>	<b>Standardabweichung (+/-)</b>
nicht gefärbte Nervenzellen	77,4	8,17
einfach positive Nervenzellen	29,3	7,97
zweifach positive Nervenzellen	4,1	1,98

<b>G-CSF pre&amp;post Gruppe rechts</b>	<b>Mittelwert</b>	<b>Standardabweichung (+/-)</b>
nicht gefärbte Nervenzellen	73,4	10,60
einfach positive Nervenzellen	24,0	8,05
zweifach positive Nervenzellen	11,3	3,96

<b>G-CSF pre&amp;post Gruppe links</b>	<b>Mittelwert</b>	<b>Standardabweichung (+/-)</b>
nicht gefärbte Nervenzellen	76,6	8,17
einfach positive Nervenzellen	28,1	5,26
zweifach positive Nervenzellen	3,63	2,22

Tabelle 4.1.1 Anzahl der mit Bax angefärbten Nervenzellen in den Nuclei cochleares beidseits. Aufgeführt sind nicht mit Bax angefärbte Zellen, sowie einfach und zweifach positiv angefärbte Nervenzellen.

In den nachfolgenden zwei Grafiken wird das rechte Kerngebiet näher betrachtet. Es werden die verschiedenen Farbintensitäten der drei Gruppen (Kontrollgruppe, G-CSF post und G-CSF pre&post) jeweils in einer eigenen Grafik verglichen. In dieser Studie wurde der rechte Nervus cochlearis mit einem Wasserstrahldissektor geschädigt. Folglich wurde auf der rechten Seite durch diese Schädigung eine Apoptose der Nervenzellen induziert. Aus diesem Grund ist die rechte Seite zur Quantifizierung der Wirkung von G-CSF relevant und wird deshalb gesondert dargestellt.

Die erste Grafik zeigt die Anzahl der nicht mit Bax angefärbten Nervenzellen im Bereich des rechten Kerngebiets. Zwischen der Kontrollgruppe und der G-CSF post Gruppe besteht ein statistisch signifikanter Unterschied ( $p < 0,0001$ ). Auch im Vergleich der Kontrollgruppe mit der G-CSF pre&post Gruppe zeigt sich ein statistisch signifikanter Unterschied ( $p < 0,0001$ ). In beiden G-CSF Gruppen finden sich mehr Nervenzellen, die sich nicht mit dem proapoptotischen Protein Bax angefärbt haben, als in der Kontrollgruppe. Zwischen den beiden G-CSF Gruppen gibt es keinen statistisch signifikanten Unterschied in Bezug auf die nicht mit Bax angefärbten Nervenzellen.

In der zweiten Grafik werden die mit Bax positiv angefärbten Nervenzellen dargestellt. Zwischen der Kontrollgruppe und der G-CSF post Gruppe zeigt sich eine statistische Signifikanz ( $p < 0,0001$ ). Ebenfalls liefert der Vergleich der Kontrollgruppe mit der G-CSF pre&post Gruppe ein statistisch signifikantes Ergebnis ( $p < 0,0001$ ). In der Kontrollgruppe finden sich mehr Bax zweifach positiv angefärbte Nervenzellen als in der Kontrollgruppe. Zwischen den beiden G-CSF Gruppen selbst besteht keine statistische Signifikanz.

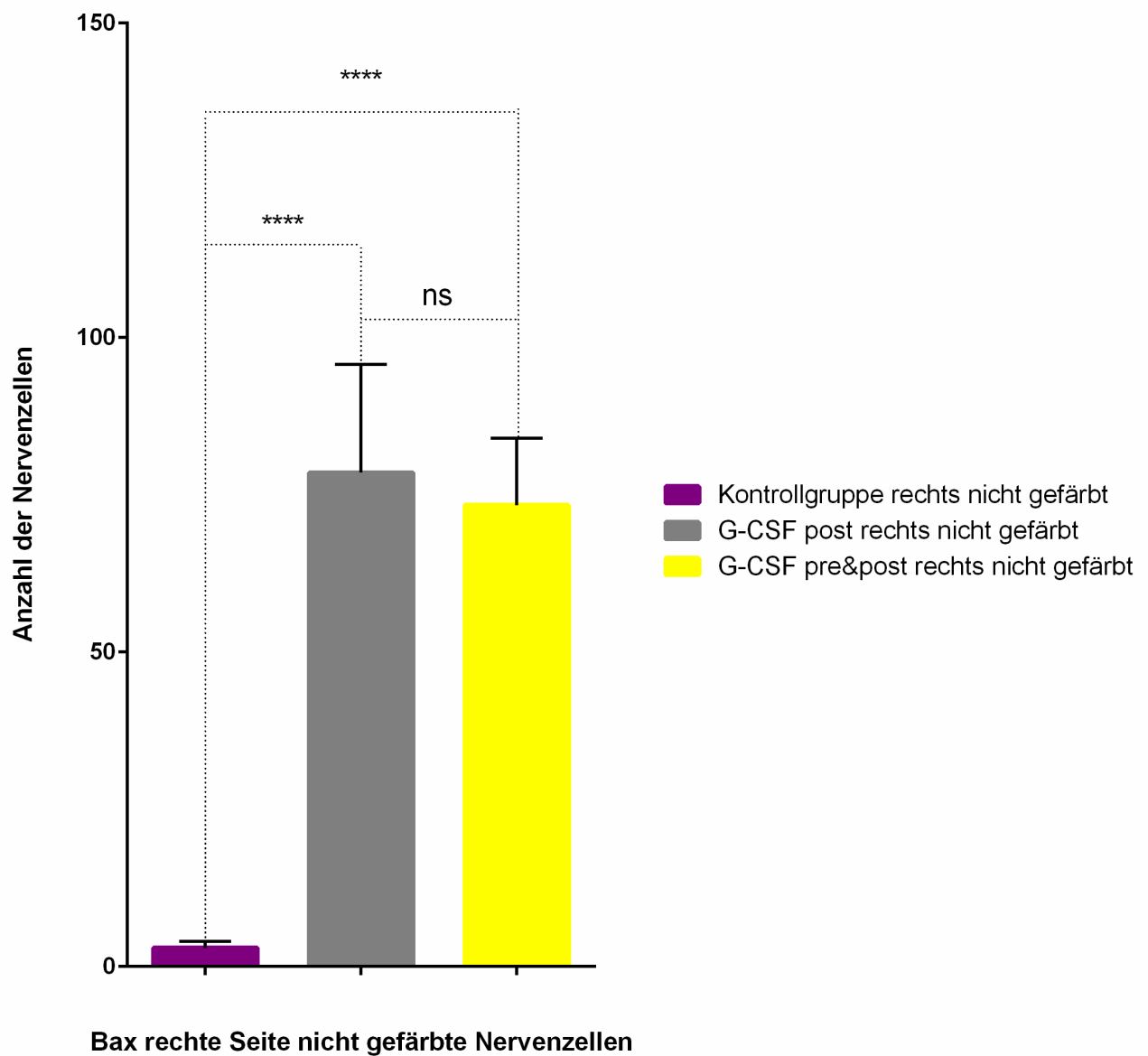
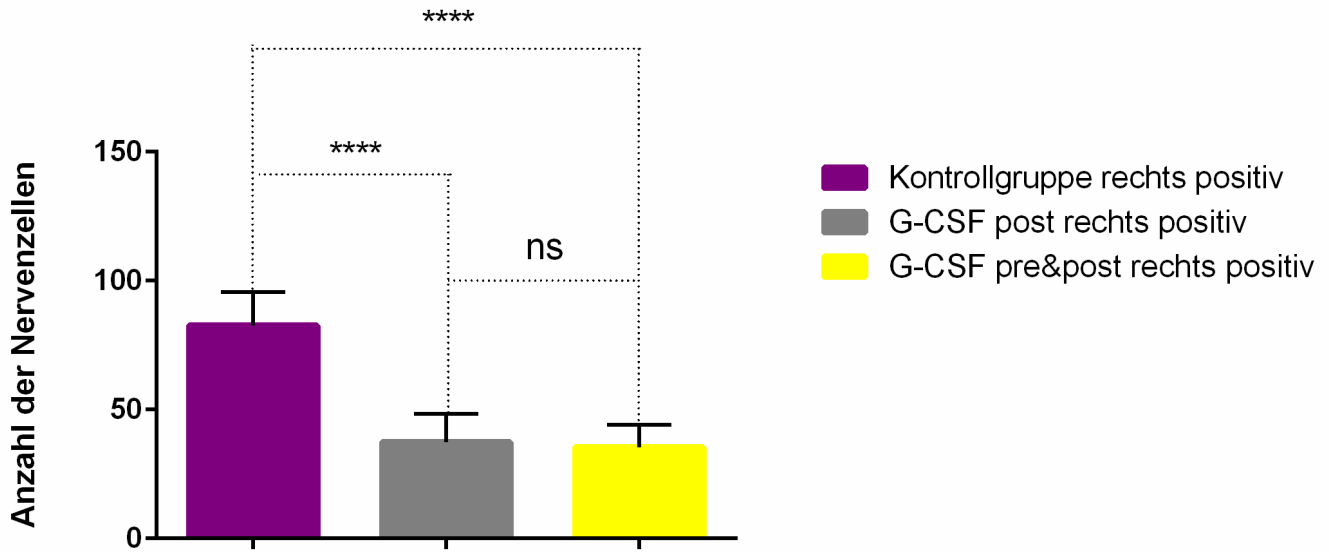


Abb. 4.3 Säulendiagramm der rechten Seite des Kerngebietes: Diese Grafik zeigt den Einfluss von G-CSF auf die nicht mit Bax angefärbten Nervenzellen. Die Anzahl der Nervenzellen entspricht den jeweiligen Mittelwerten.



**Bax rechte Seite Anzahl der positiven Nervenzellen**

Abb. 4.4 Säulendiagramm: Diese Grafik zeigt den Einfluss von G-CSF auf die mit Bax positiv angefärbten Nervenzellen. Die Anzahl der Nervenzellen entspricht den jeweiligen Mittelwerten.

Diese Tabelle enthält die genauen Werte der histologischen Auswertung aller mit Bax angefärbten Nervenzellen auf der rechten Seite:

<b>Nicht gefärbte Nervenzellen, rechts</b>	<b>Mittelwert</b>	<b>Standardabweichung (+/-)</b>
Kontrollgruppe	3,0	1,02
G-CSF post Gruppe	78,5	17,24
G-CSF pre&post Gruppe	73,4	10,60

<b>einfach positive Nervenzellen, rechts</b>	<b>Mittelwert</b>	<b>Standardabweichung (+/-)</b>
Kontrollgruppe	18,0	8,63
G-CSF post Gruppe	24,7	9,64
G-CSF pre&post Gruppe	24,0	8,05

<b>zweifach positive Nervenzellen, rechts</b>	<b>Mittelwert</b>	<b>Standardabweichung (+/-)</b>
Kontrollgruppe	64,7	10,84
G-CSF post Gruppe	12,8	5,25
G-CSF pre&post Gruppe	11,3	3,96

Tabelle 4.1.2 Anzahl der mit Bax angefärbten Nervenzellen in den Nuclei cochleares der rechten Seite. Aufgeführt sind nicht mit Bax angefärbte Zellen, sowie einfach und zweifach positiv angefärbte Nervenzellen in den jeweiligen Gruppen dieser Untersuchung.



## 4.2 Bcl-2

Die folgenden Ergebnisse verdeutlichen den Effekt von G-CSF auf die Regulierung des antiapoptotischen Proteins Bcl-2. Es wird veranschaulicht, dass die Verabreichung von G-CSF eine signifikante Expressierung des antiapoptotischen Proteins zur Folge hat. Hierdurch können weitere Rückschlüsse auf die neuroprotektive und antiapoptotische Wirkung von G-CSF geschlossen werden.

Die folgenden Abbildungen beziehen sich auf den Einfluss von G-CSF auf das antiapoptotische Protein Bcl-2. Verglichen wird die Anzahl der Nervenzellen im linken, nicht geschädigten Kerngebiet des N. cochlearis und im rechten, geschädigten Kerngebiet im Hinblick auf die Expressierung von Bcl-2. Der Vergleich bezieht sich auf die Anzahl der nicht mit Bcl-2 angefärbten Nervenzellen und Bcl-2 positiver Nervenzellen unterschiedlicher Intensität. Die Bcl-2 positiven Nervenzellen wurden wie Bax in einfach und zweifach positiv unterteilt, je nach Stärke des Farbumschlages.

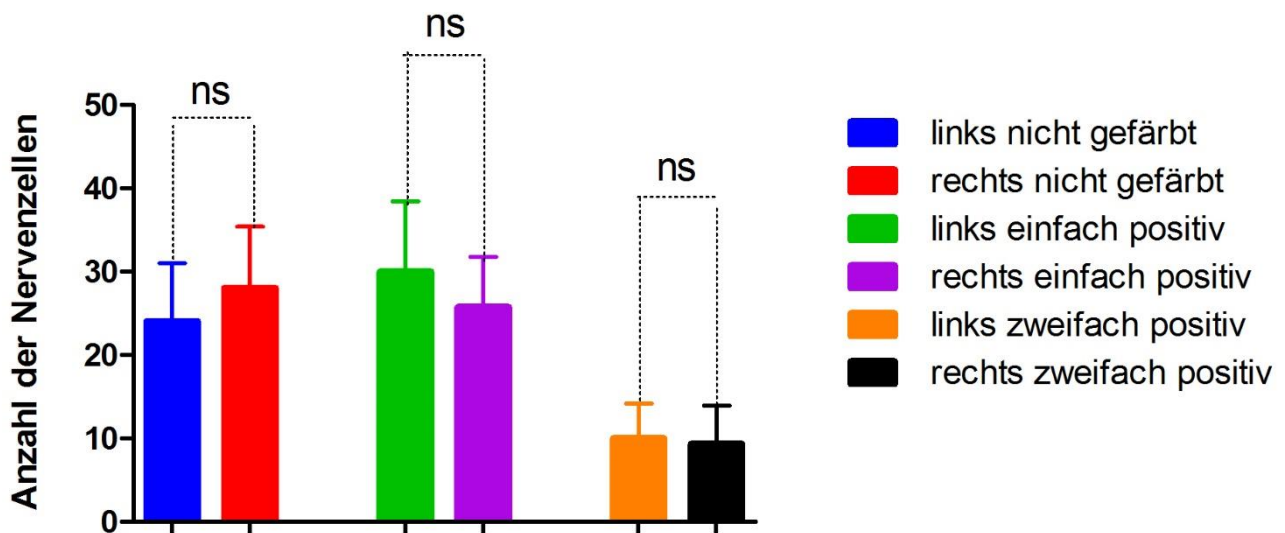
Die drei folgenden Grafiken zeigen die drei Gruppen dieser Studie (Kontrollgruppe, G-CSF post und G-CSF pre&post Gruppe) und vergleichen jeweils die linke und rechte Seite des Kerngebietes des N. cochlearis.

Die Grafik der Kontrollgruppe zeigt keine statistische Signifikanz zwischen den mit Bcl-2 verschieden stark angefärbten Nervenzellen des linken und rechten Kerngebietes.

In der G-CSF post Gruppe zeigen sich statistisch signifikant mehr Nervenzellen, die sich mit dem antiapoptotischen Bcl-2 einfach positiv angefärbt haben ( $p < 0,0001$ ). Es besteht auch eine statistische Signifikanz zwischen den Bcl-2 zweifach positiv angefärbten Nervenzellen des linken und rechten Kerngebietes ( $p < 0,05$ ). In der G-CSF post Gruppe sind im rechten Kerngebiet mehr mit dem antiapoptotischen Protein Bcl-2 positiv angefärbte Nervenzellen vorhanden als im Linken.

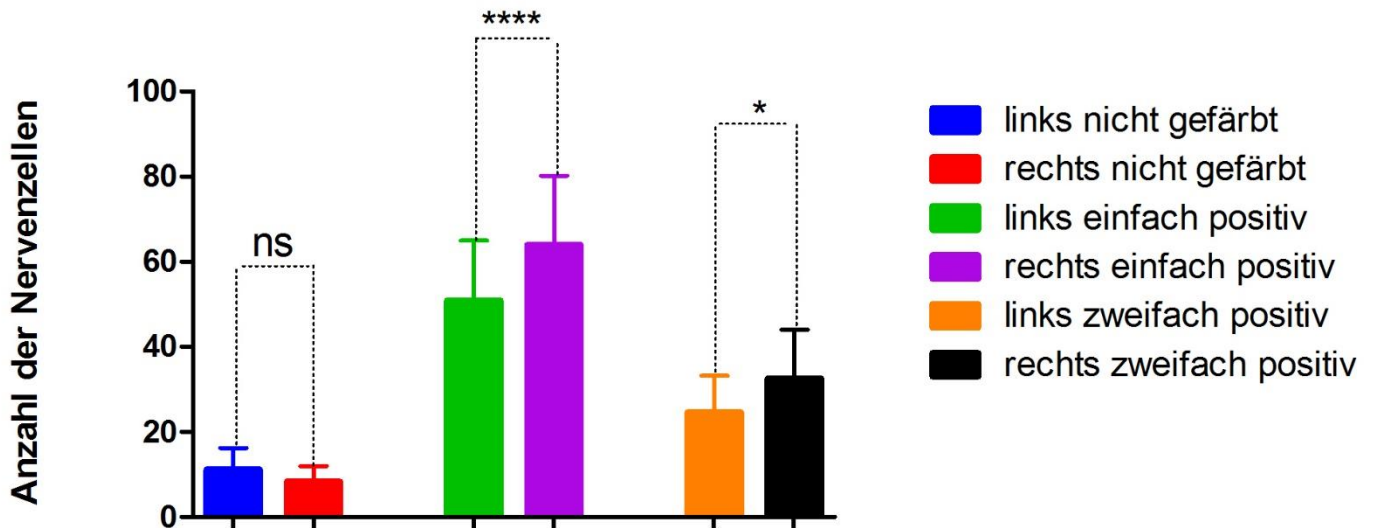
Die Grafik der G-CSF pre&post Gruppe zeigt eine statistische Signifikanz in Bezug auf die einfach positiv gefärbten Nervenzellen ( $p < 0,05$ ). Ebenfalls sind in dieser G-CSF

Gruppe im geschädigten rechten Kerngebiet mehr Nervenzellen mit dem antiapoptotischen Bcl-2 angefärbt als im linken Kerngebiet.



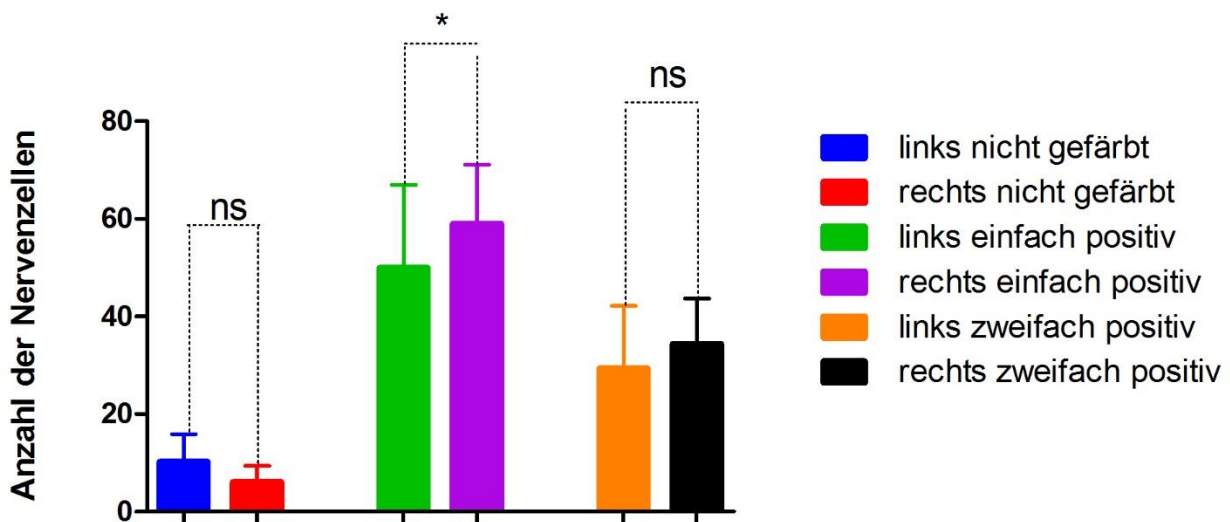
### Bcl-2 Kontrollgruppe linke und rechte Seite im Vergleich

Abb. 4.5 Säulendiagramm: Diese Grafik zeigt den Einfluss von G-CSF auf das antiapoptotische Protein Bcl-2 in der Kontrollgruppe. Gezeigt werden die nicht mit Bcl-2 angefärbten Nervenzellen und die Bcl-2 positiven Nervenzellen unterschiedlicher Intensität. Die Säulenhöhe entspricht den jeweiligen Mittelwerten.



### Bcl-2 G-CSF post Gruppe linke und rechte Seite im Vergleich

Abb. 4.6 Säulendiagramm: Diese Grafik zeigt den Einfluss von G-CSF auf das antiapoptotische Protein Bcl-2 in der G-CSF post Gruppe. Gezeigt werden die nicht mit Bcl-2 angefärbten Nervenzellen und die Bcl-2 positiven Nervenzellen unterschiedlicher Intensität. Die Säulenhöhe entspricht den jeweiligen Mittelwerten.



### Bcl-2 G-CSF pre&post linke und rechte Seite im Vergleich

Abb. 4.7 Säulendiagramm: Diese Grafik zeigt den Einfluss von G-CSF auf das antiapoptotische Protein Bcl-2 in der G-CSF pre&post Gruppe. Gezeigt werden die nicht mit Bcl-2 angefärbten Nervenzellen und die Bcl-2 positiven Nervenzellen unterschiedlicher Intensität. Die Säulenhöhe entspricht den jeweiligen Mittelwerten.

Einen Überblick über die genauen Werte der histologischen Auswertung der mit Bcl-2 angefärbten Nervenzellen liefert folgende Tabelle:

<b>Kontrollgruppe rechts</b>	<b>Mittelwert</b>	<b>Standardabweichung (+/-)</b>
nicht gefärbte Nervenzellen	28,1	7,31
einfach positive Nervenzellen	25,8	5,98
zweifach positive Nervenzellen	9,37	4,57

<b>Kontrollgruppe links</b>	<b>Mittelwert</b>	<b>Standardabweichung (+/-)</b>
nicht gefärbte Nervenzellen	24,1	6,95
einfach positive Nervenzellen	30	8,42
zweifach positive Nervenzellen	10	4,21

<b>G-CSF post Gruppe rechts</b>	<b>Mittelwert</b>	<b>Standardabweichung (+/-)</b>
nicht gefärbte Nervenzellen	8,3	3,60
einfach positive Nervenzellen	64,0	16,21
zweifach positive Nervenzellen	32,6	11,44

<b>G-CSF post Gruppe links</b>	<b>Mittelwert</b>	<b>Standardabweichung (+/-)</b>
nicht gefärbte Nervenzellen	11,1	5,13
einfach positive Nervenzellen	50,9	14,07
Zweifach positive Nervenzellen	24,6	8,59

<b>G-CSF pre&amp;post Gruppe</b>	<b>Mittelwert</b>	<b>Standardabweichung (+/-)</b>
nicht gefärbte Nervenzellen	6,1	3,26
einfach positive Nervenzellen	59,1	12,04
zweifach positive Nervenzellen	34,4	9,23

<b>G-CSF pre&amp;post Gruppe</b>	<b>Mittelwert</b>	<b>Standardabweichung (+/-)</b>
nicht gefärbte Nervenzellen	10,3	5,61
einfach positive Nervenzellen	49,9	17,02
zweifach positive Nervenzellen	29,4	12,83

Tabelle 4.2.1 Anzahl der mit Bcl-2 angefärbten Nervenzellen in den Nuclei cochleares beidseits. Aufgeführt sind nicht mit Bcl-2 angefärbte Zellen, sowie einfach und zweifach positiv angefärbte Nervenzellen in den jeweiligen Gruppen dieser Untersuchung.

In den nachfolgenden zwei Grafiken wird das rechte Kerngebiet näher betrachtet. Es werden die verschiedenen Farbintensitäten der drei Gruppen (Kontrollgruppe, G-CSF post und G-CSF pre&post) jeweils in einer eigenen Grafik verglichen. In dieser Studie wurde der rechte Hörnerv mit Hilfe eines Wasserstrahldissektors geschädigt, wodurch eine Apoptose der Nervenzellen im Bereich der rechten Ncll. cochleares induziert wurde. Aus diesem Grund ist die rechte Seite zur Quantifizierung der Wirkung von G-CSF relevant und wird deshalb gesondert dargestellt.

Die erste Grafik zeigt die Anzahl der nicht mit dem antiapoptotischen Protein Bcl-2 angefärbten Nervenzellen. In dieser Grafik wird eine statistische Signifikanz zwischen der Kontrollgruppe und der G-CSF post Gruppe deutlich ( $p < 0,0001$ ). Ebenfalls besteht eine statistische Signifikanz zwischen der Kontrollgruppe und der G-CSF pre&post Gruppe ( $p < 0,0001$ ). In der Kontrollgruppe finden sich signifikant mehr, nicht mit dem antiapoptotischen Bcl-2 angefärbte Nervenzellen, als in den beiden G-CSF Gruppen. Zwischen den beiden G-CSF Gruppen besteht keine statistische Signifikanz.

In der zweiten Grafik werden die positiv mit Bcl-2 angefärbten Nervenzellen dargestellt. Hier besteht eine statistische Signifikanz zwischen der Kontrollgruppe und der G-CSF post Gruppe ( $p < 0,0001$ ). Auch zwischen der Kontrollgruppe und der G-CSF pre&post Gruppe besteht ein statistisch signifikantes Ergebnis ( $p < 0,0001$ ). Der Grafik kann entnommen werden, dass in den beiden G-CSF Gruppen signifikant mehr mit Bcl-2 einfach positiv angefärbte Nervenzellen vorhanden sind als in der Kontrollgruppe. Im Vergleich beider G-CSF Gruppen findet sich keine statistische Signifikanz.

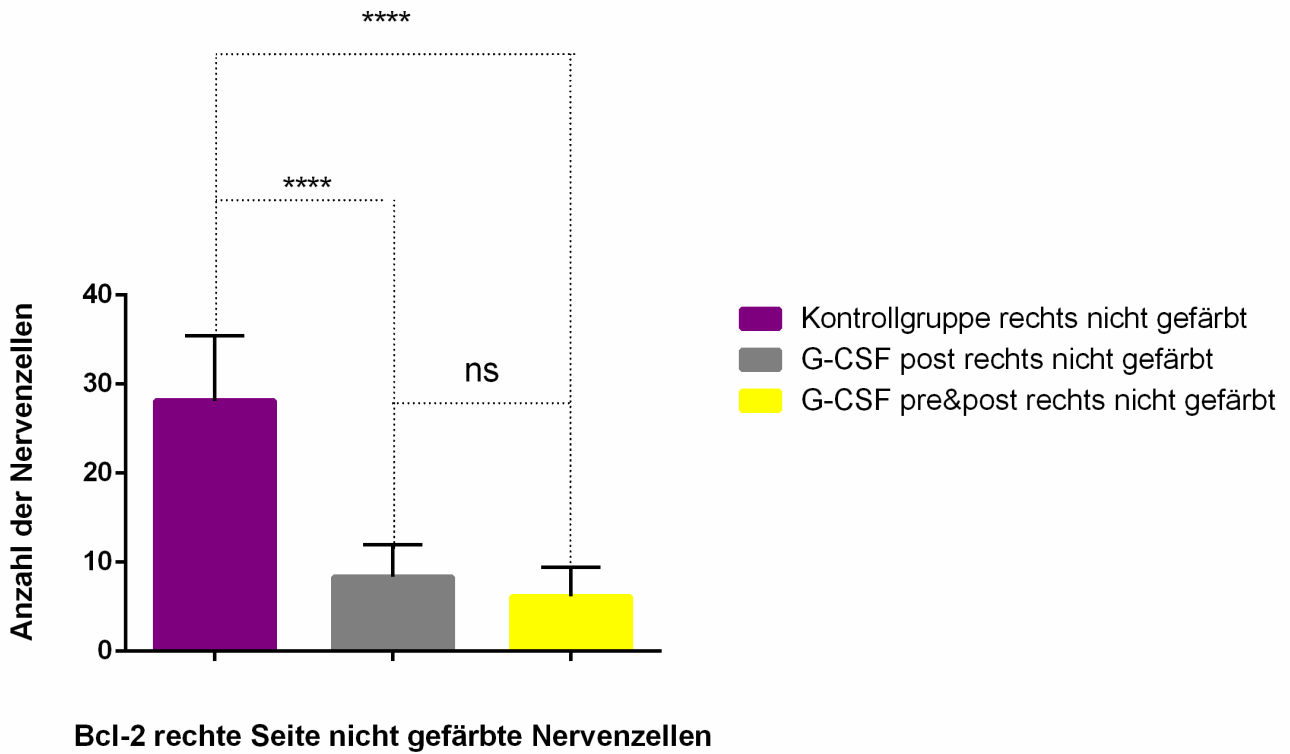


Abb. 4.8 Säulendiagramm: Diese Grafik zeigt den Einfluss von G-CSF auf die nicht mit Bcl-2 angefärbten Nervenzellen. Die Höhe der Nervenzellen entspricht den jeweiligen Mittelwerten.

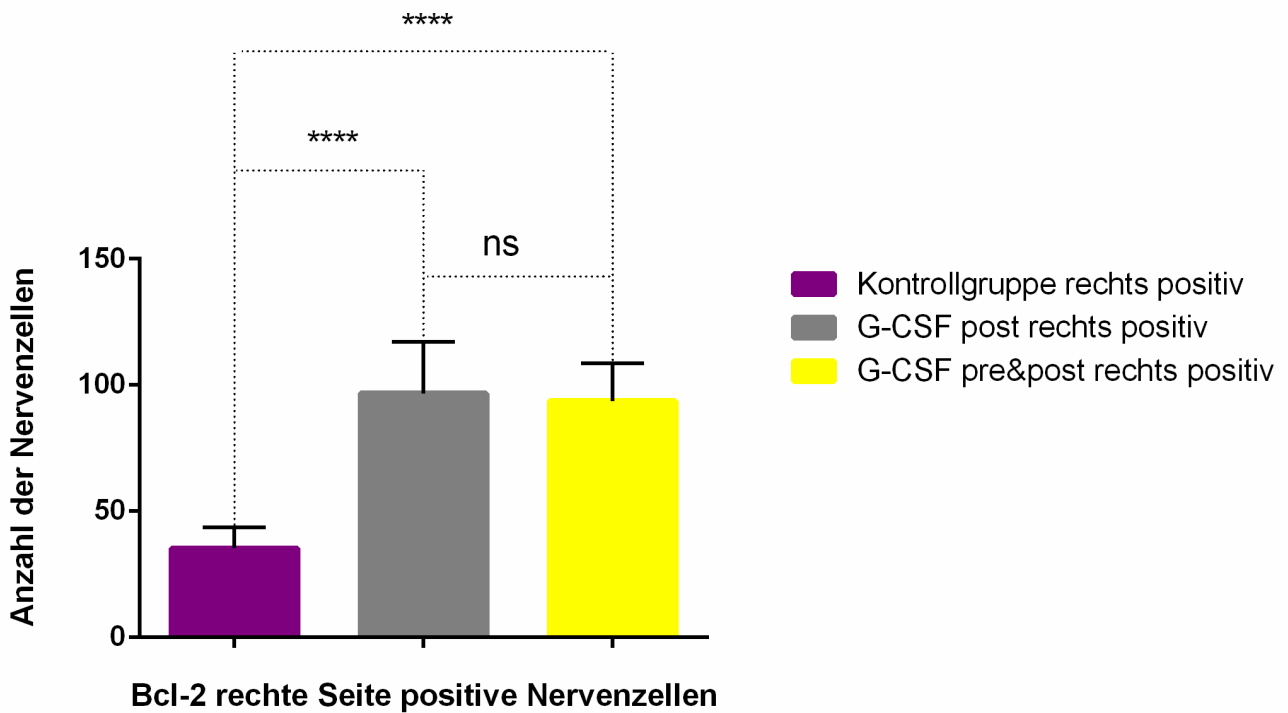


Abb. 4.9 Säulendiagramm: Diese Grafik zeigt den Einfluss von G-CSF auf die positiv mit Bcl-2 angefärbten Nervenzellen. Die Höhe der Nervenzellen entspricht den jeweiligen Mittelwerten.

Folgende Tabelle liefert einen Überblick über die genauen Daten der histologischen Auswertung der rechten Kerngebiete:

<b>Nicht gefärbte Nervenzellen, rechts</b>	<b>Mittelwert</b>	<b>Standardabweichung (+/-)</b>
Kontrollgruppe	28,1	7,32
G-CSF post Gruppe	8,3	3,60
G-CSF pre&post Gruppe	6,1	3,26

<b>einfach positive Nervenzellen, rechts</b>	<b>Mittelwert</b>	<b>Standardabweichung (+/-)</b>
Kontrollgruppe	25,8	5,98
G-CSF post Gruppe	64,0	16,21
G-CSF pre&post Gruppe	59,1	12,04

<b>zweifach positive Nervenzellen, rechts</b>	<b>Mittelwert</b>	<b>Standardabweichung (+/-)</b>
Kontrollgruppe	9,4	4,58
G-CSF post Gruppe	32,6	11,44
G-CSF pre&post Gruppe	34,4	9,23

Tabelle 4.2.2 Anzahl der mit Bcl-2 angefärbten Nervenzellen in den Nuclei cochleares der rechten Seite. Aufgeführt sind nicht mit Bcl-2 angefärbte Zellen, sowie einfach und zweifach positiv angefärbte Nervenzellen in den jeweiligen Gruppen dieser Untersuchung.



## 4.3 TUNEL

Durch eine Schädigung des N. cochlearis kommt es zur Induktion einer Apoptose in den Kerngebieten des Nervens. Dort entstehen durch Defragmentierung freie 3'-OH-Enden an den DNA-Strängen, welche durch den direkten Apoptosenachweis mit der TUNEL-Methode nachgewiesen werden. Dadurch kann der antiapoptotische Effekt von G-CSF direkt dargestellt werden.

Die folgenden Abbildungen beziehen sich auf den Einfluss von G-CSF auf TUNEL positive Nervenzellen. Verglichen wird die Anzahl der TUNEL positiven Zellen in den drei Gruppen dieser Studie (Kontrollgruppe, G-CSF post Gruppe und G-CSF pre&post Gruppe).

In den nachfolgenden zwei Grafiken werden die TUNEL positiven Zellen einer Seite des Kerngebietes innerhalb der drei Gruppen verglichen.

In der Grafik des rechten Kerngebiets finden sich in der Kontrollgruppe mehr TUNEL positive Nervenzellen als in der G-CSF post Gruppe ( $p < 0,0001$ ). Auch im Vergleich der Kontrollgruppe mit der G-CSF pre&post Gruppe zeigt sich eine statistische Signifikanz ( $p < 0,0001$ ). In beiden G-CSF Gruppen finden sich somit weniger apoptotische Zellen als in der Kontrollgruppe. Zwischen den beiden G-CSF Gruppen besteht keine statistische Signifikanz.

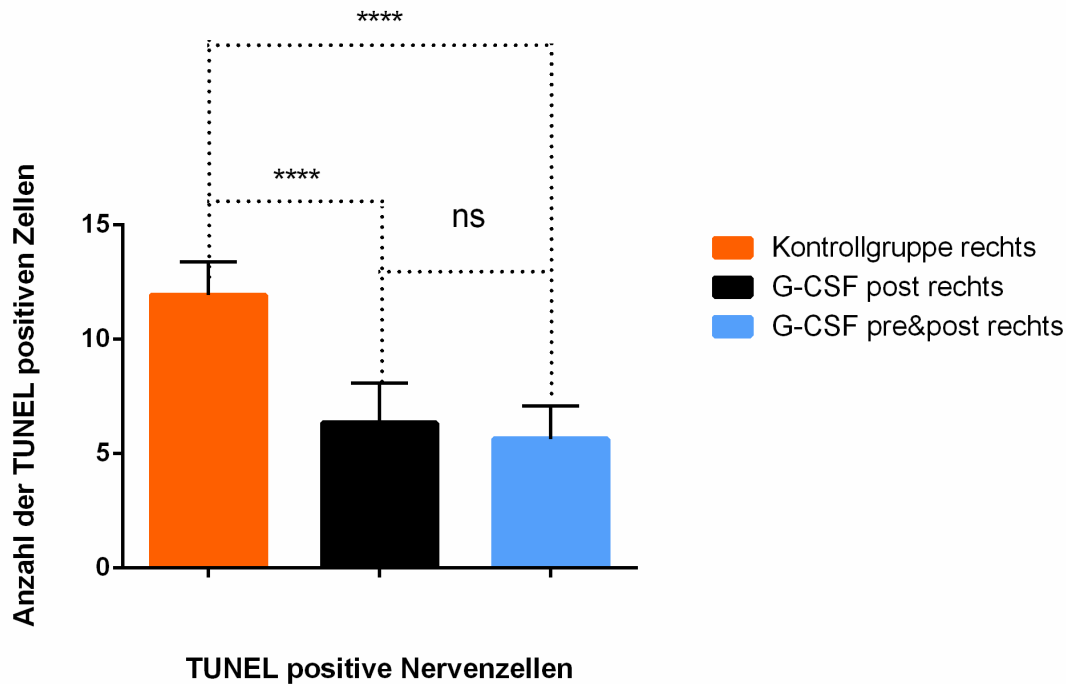


Abb. 4.10 Säulendiagramm der rechten Seite des Kerngebiets: Diese Grafik zeigt die Anzahl an TUNEL positiven Nervenzellen im rechten Kerngebiet in allen drei Gruppen. Die Säulenhöhe entspricht den jeweiligen Mittelwerten.

Die unten aufgeführte Tabelle liefert einen Überblick über die genauen Daten der histologischen Auswertung des direkten Apoptosenachweises mit der TUNEL-Methode auf der rechten Seite:

TUNEL positive Nervenzellen rechts	Mittelwert	Standardabweichung (+/-)
Kontrollgruppe	11,9	1,44
G-CSF post Gruppe	6,3	1,73
G-CSF pre&post Gruppe	5,6	1,43

<b>TUNEL positive Nervenzellen links</b>	<b>Mittelwert</b>	<b>Standardabweichung (+/-)</b>
Kontrollgruppe	4,9	0,83
G-CSF post Gruppe	4	1,22
G-CSF pre&post Gruppe	3,7	0,85

Tabelle 4.3.1 Anzahl der apoptotischen Nervenzellen in den Nuclei cochleares, quantifiziert mit Hilfe der TUNEL-Methode. Aufgeführt sind die TUNEL-positiven Nervenzellen der drei Gruppen dieser Studie.

Die nachfolgenden Grafiken zeigen jeweils beide Seiten einer Gruppe im Hinblick auf die Anzahl der TUNEL positiven Nervenzellen.

Die erste Grafik zeigt die Kontrollgruppe. Es besteht ein signifikanter Unterschied zwischen der Anzahl der TUNEL positiven Nervenzellen auf der rechten und linken Seite ( $p < 0,0001$ ).

Die zweite Grafik zeigt die G-CSF post Gruppe. Hier besteht ebenfalls ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Kerngebieten ( $p = 0,0045$ ).

In der dritten Grafik ist die G-CSF pre&post Gruppe dargestellt. Auch hier besteht ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Kerngebieten ( $p < 0,001$ ). Es finden sich in den beiden G-CSF Gruppen im geschädigten rechten Kerngebiet mehr TUNEL positive Zellen als im nicht geschädigten linken Kerngebiet.

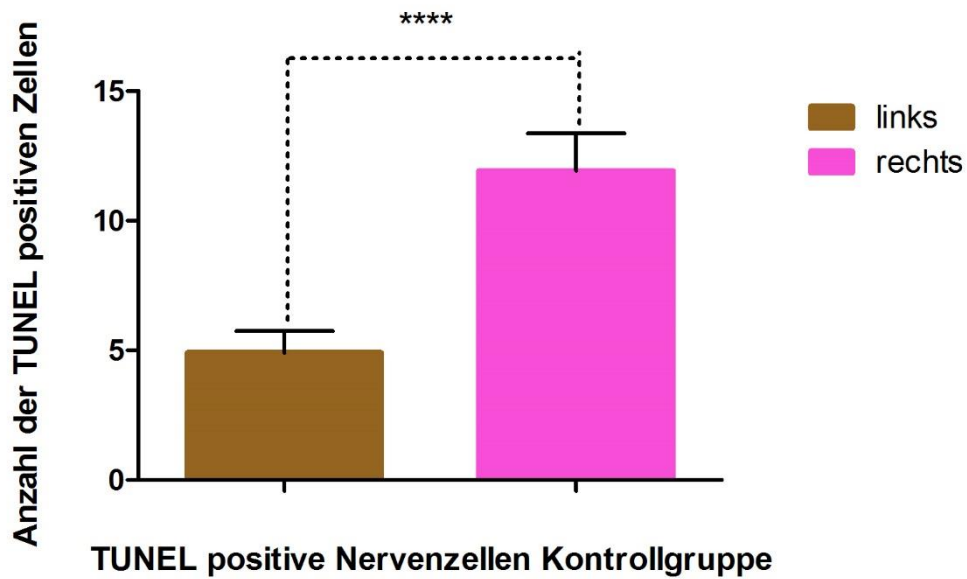


Abb. 4.11 Säulendiagramm: Einfluss von G-CSF auf die Anzahl der TUNEL positiven Zellen in der Kontrollgruppe. Es wird das Kerngebiet des N. cochlearis auf der rechten Seite mit dem auf der linken Seite verglichen. Die Säulenhöhe entspricht den jeweiligen Mittelwerten.

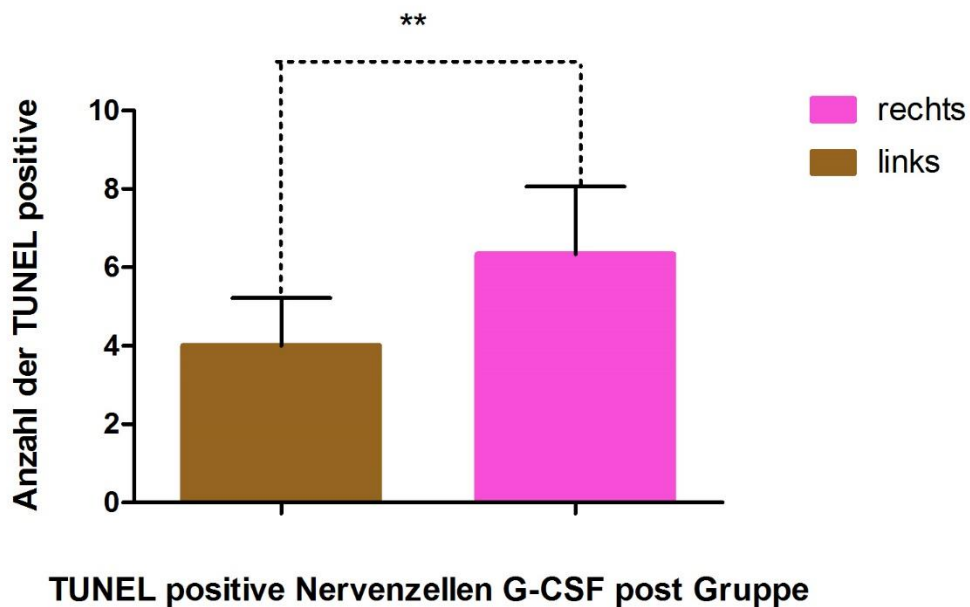
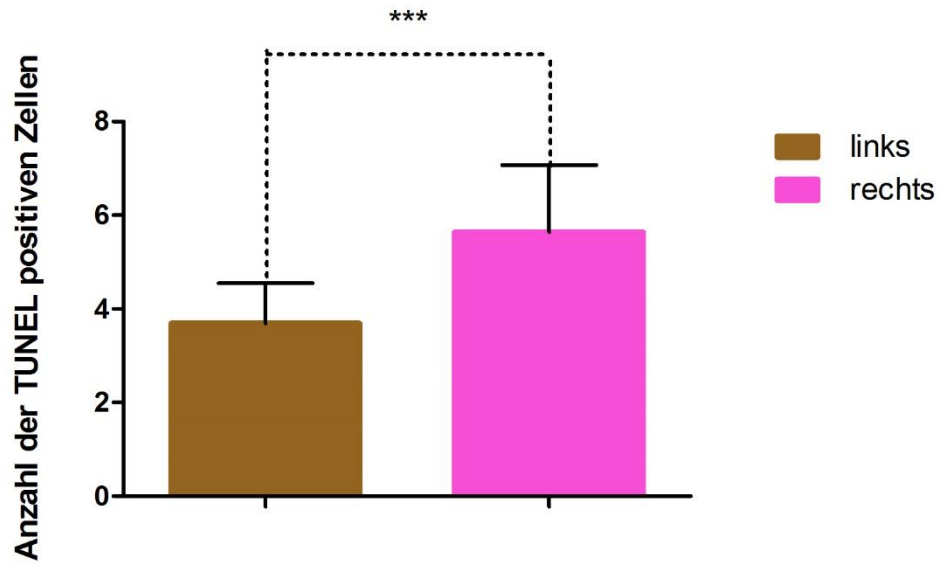


Abb. 4.12 Säulendiagramm: Einfluss von G-CSF auf die Anzahl der TUNEL positiven Zellen in der G-CSF post Gruppe. Es wird das Kerngebiet des N. cochlearis auf der rechten Seite mit dem auf der linken Seite verglichen. Die Säulenhöhe entspricht den jeweiligen Mittelwerten.



#### TUNEL positive Nervenzellen G-CSF pre&post Gruppe

Abb. 4.13 Säulendiagramm: Einfluss von G-CSF auf die Anzahl der TUNEL positiven Zellen in der G-CSF pre&post Gruppe. Es wird das Kerngebiet des N. cochlearis auf der rechten Seite mit dem auf der linken Seite verglichen. Die Säulenhöhe entspricht den jeweiligen Mittelwerten.

Folgende Tabelle liefert einen Überblick über die genauen Daten der histologischen Auswertung der TUNEL-Methode beidseits:

<b>TUNEL positive Nervenzellen Kontrollgruppe</b>	<b>Mittelwert</b>	<b>Standardabweichung (+/-)</b>
<b>rechts</b>	11,9	1,44
<b>links</b>	4,9	0,83

<b>TUNEL positive Nervenzellen G-CSF post Gruppe</b>	<b>Mittelwert</b>	<b>Standardabweichung (+/-)</b>
<b>rechts</b>	6,3	1,73
<b>links</b>	4	1,22

<b>TUNEL positive Nervenzellen G-CSF pre&amp;post Gruppe</b>	<b>Mittelwert</b>	<b>Standardabweichung (+/-)</b>
<b>rechts</b>	5,6	1,43
<b>links</b>	3,7	0,85

Tabelle 4.3.2 Anzahl der apoptotischen Nervenzellen in den Nuclei cochleares, quantifiziert mit Hilfe der TUNEL-Methode. Aufgeführt sind die TUNEL-positiven Nervenzellen der drei Gruppen dieser Studie.

## **5. Diskussion**

Das Ziel dieser Studie ist es, die Wirkung von G-CSF auf den N. cochlearis und seiner Kerngebiete, nach Schädigung im Kleinhirnbrückenwinkel zu untersuchen. Dieses Projekt untersucht die genauen intrazellulären Wirkmechanismen von G-CSF in Nervenzellen. Der Fokus dieser Arbeit liegt vor allem auf der antiapoptotischen Wirkung von G-CSF. Hierzu wurden immunhistochemische Färbemethoden mit Bax- und Bcl-2-Antikörpern, sowie ein direkter Apoptosenachweis durch die TUNEL-Methode durchgeführt.

Die Färbung mit dem Bax-Antikörper zeigt nach G-CSF- Applikation eine signifikante Reduktion der, mit proapoptotischem Bax angereicherten Zellen.

Die Verabreichung von G-CSF führt in der Bcl-2-Antikörperfärbung zu einem signifikanten Anstieg der Zellen, welche antiapoptotisches Bcl-2 exprimieren.

Der direkte Apoptosenachweis durch TUNEL zeigt, dass G-CSF zu einer signifikant geringeren Anzahl an apoptotischen Nervenzellen im Kerngebiet des N. cochlearis führt.

Folglich lässt sich sagen, dass sich G-CSF positiv auf den Erhalt von Nervenzellen auswirkt.

### **5.1 Diskussion der Methodik**

#### **5.1.1 Kriterien für eine Nervenzelle**

In dieser Studie muss eine Nervenzelle bestimmte Kriterien erfüllen, um als solche in die histologische Auswertung einzugehen. Gefordert sind ein sichtbarer Nukleolus, eine Kernmembran, eine intakte Zellmembran und ein sichtbares Zytoplasma. Diese Kriterien wurden unter anderem auch bei Tierney et. al. verwendet (90; 91). Sie stellen sicher, dass es sich um eine Nervenzelle handelt, welche in ihrer Gesamtheit auf dem histologischen Schnitt zu sehen ist und dadurch nicht doppelt gezählt wird (90; 91). Um die Stärke der immunhistochemischen Färbungen in die Wertung miteinfließen zu lassen ist die unterschiedlich starke Intensität der Zytoplasmaanfärbung genauer definiert worden (51). Es werden drei verschiedene Intensitäten verglichen. Die erste

Gruppe ist die der nicht gefärbten Nervenzellen. Diese Zellen weisen im Zytoplasma keinen Farbumschlag auf und haben sich somit mit den Antikörperfärbungen nicht anfärben lassen. Die zweite Gruppe zeigt einen mäßigen Farbumschlag. Diese Nervenzellen werden als einfach positiv gewertet. Die letzte Gruppe zeigt einen sehr starken Farbumschlag und wird als zweifach positiv angesehen (27). In dem Protokoll von Durdu et. al. werden vier Untergruppen unterschieden. Der Farbumschlag wird hier in schwach, moderat und stark unterteilt (27; 68). Diese Einteilung wird hier nicht übernommen, da die Unterscheidung zwischen schwach und moderat so gering ist, dass sie ein valides Ergebnis nur erschweren würde. Andere Studien verglichen nur die Prozentzahl der nicht gefärbten Nervenzellen mit der Anzahl von gefärbten Nervenzellen (87). Diese Unterteilung ist jedoch ungenauer, als die in diesem Projekt verwendete.

### **5.1.2 Färbemethoden**

In dieser laborexperimentellen Arbeit wurden Bax und Bcl-2 Antikörper sowie der direkte Apoptosenachweis durch die TUNEL-Methode verwendet. Die dafür verwendeten Gehirnschnitte stammen vom Projekt der AG Montibeller/Schackmann/Oertel, in welchem die Tiere 7 Tage nach Operation perfundiert wurden. In der Studie von Li et al wurde herausgefunden, dass die Apoptose und die Anzahl der apoptotischen Zellen ihr Maximum an Tag 7 nach Operation hat. Die maximale Anzahl von Bax-positiven Zellen wurde an Tag 7 und die maximale Anzahl der Bcl-2 positiven Zellen an Tag 4 nachgewiesen (51).

Für die Antikörperfärbungen wurden die polyklonale rabbit-IgG-Primärantikörper der Firma Santa Cruz Biotechnology benutzt (6; 18; 27; 28; 39; 51). Das Färbeprotokoll deckt sich mit dem vieler anderer Studien. Nach dem Schritt der Entparaffinierung und Rehydrierung wurden die Schnitte in Citratpuffer gekocht, um die zuvor maskierten Proteinstrukturen wieder zu demaskieren (9; 18; 28; 39; 58; 68; 69; 72; 73; 89; 93; 94). Um die endogene Peroxidase zu blockieren, wurden die Schnitte in Methanol und Wasserstoffperoxid gestellt. Dies ermöglichte sicherzustellen, dass der Farbschlag nur durch extern zugegebene Peroxidase erfolgt (18; 27; 28; 39; 46; 68; 93; 94). Das Glätten der Schnittoberfläche zur Verbesserung der Antikörperspezifität wird in den meisten Studien durch das goat-Normalserum erreicht (9; 18; 51; 68; 72; 89). Ebenfalls ist die Inkubation mit dem Primärantikörper bei 4°C über Nacht in vielen



Färbeprotokollen nachzulesen (9; 11; 20; 27; 28; 43; 49; 51; 58; 72; 73; 81; 93; 94). Am nächsten Morgen wurde ein polyklonaler, biotinylierter sekundär goat- anti-rabbit Antikörper in der Verdünnung 1:200 hinzugegeben (8; 9; 17; 28; 43; 58; 93). Ebenfalls wird in der Immunhistochemie die ABC-Methode angewendet. Am Ende der Antikörperfärbung entsteht ein brauner Farbumschlag durch den Farbstoff DAB, welcher lichtmikroskopisch ausgewertet werden kann (8; 9; 18; 28; 38; 39; 43; 46; 73; 89; 93; 94).

Die TUNEL-Methode erfolgte nach der Anleitung des NeuroTACS II Kits und wurde mit der 200-fachen Vergrößerung lichtmikroskopisch ausgewertet (36; 49; 66). In vielen Studien wurde ein TUNEL-Kit für Immunofluoreszenz verwendet (89). Diese Kits wurden in dieser Studie nicht verwendet, um die Methodik der Vorarbeit aufzugreifen (6; 9; 81; 93). In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass die Aussagekraft der TUNEL-Methode ab dem 3. Tag nach Nervenschädigung zunimmt (56). NeuroTACS ist ein spezieller Kit für den Nachweis von Apoptose im Nervengewebe. Er wirkt falsch positiven Ergebnissen durch Minimierung der Hintergrundfärbung entgegen und verbessert die Anfärbbarkeit von Neuronen. Schlussendlich ist dieser Kit trotz aller Kritik an der TUNEL-Methode, der beste Nachweis für Apoptose in Neuronen. Er stellt damit die beste Methodik zum Nachweis von Apoptose im Nervengewebe (36).

### **5.1.3 Auswirkung der Nervenschädigung des N. cochlearis auf dessen Kerngebiet**

In dieser Studie wurde das Kerngebiet des N. cochlearis histologisch ausgewertet. Im Vorprojekt wurde aber der N. cochlearis und nicht das Kerngebiet des Hörnervs mit dem Wasserstrahldissektor geschädigt. Frühere Studien zeigten, dass sich eine Schädigung des Hörnervs durch Deafferenzierungsprozesse und reaktive Gliosen bis in die Kerngebiete des N. cochlearis ausdehnt (78-80). Diese am Nerv gesetzten Schädigungen führen zu einem Verlust der Balance zwischen exzitatorischen und inhibitorischen synaptischen Transmittern in Folge von Deafferenzierungsprozessen. Sekiya et al. stellten fest, dass Traumata des N. cochlearis zu einer Degeneration der Neurone im Kerngebiet führen (78-80). Des Weiteren beschreiben Studien, dass eine mechanische Läsion am N. cochlearis im Kleinhirnbrückenwinkels zu einer Veränderung in den Ncll. cochleares führt (57; 59).

## 5.2 Diskussion der Ergebnisse

Im vorangegangenen Projekt der Arbeitsgruppe Montibeller/ Schackmann/ Urbschat/ Oertel lieferte die Verabreichung von G-CSF statistisch signifikante Ergebnisse im Hinblick auf die Anzahl der Nervenzellen innerhalb der Ncll. cochleares und auf die Erhaltung der Kerngebietsfläche. Es fand sich eine höhere Anzahl an Nervenzellen innerhalb der Ncll. cochleares bei den Gruppen, denen G-CSF verabreicht wurde ( $p = 0,0086$ ). Darüber hinaus ist die durchschnittliche Fläche des Kerngebiets in den beiden G-CSF-Gruppen größer als die der Kontrollgruppe ( $p = 0,0019$ ).

Gegenstand dieser Arbeit ist es, durch immunhistochemische Färbemethoden die intrazellulären Wirkmechanismen von G-CSF auf Proteine der Bcl-2-Familie und die Apoptose genauer zu beleuchten.

### 5.2.1 Wirkt sich G-CSF auf die Anzahl der Bax-positiven Nervenzellen im Kerngebiet des N. cochlearis aus?

G-CSF führt zu einer Supprimierung der Bax-positiven Nervenzellen innerhalb der Ncll. cochleares. Die zu dieser Fragestellung erhobenen Daten sind statistisch signifikant.

Im Hinblick auf diese Fragestellung wurde das rechte geschädigte Kerngebiet mit dem linken nicht geschädigten Kerngebiet verglichen. Es sind in dem geschädigten rechten Kerngebiet mehr Nervenzellen mit dem proapoptotischen Bax angefärbt, als auf der linken, nicht geschädigten Seite. Wenn man die unterschiedlichen Farbtintensitäten der mit Bax angefärbten Nervenzellen im rechten Kerngebiet miteinander vergleicht, sieht man in der Kontrollgruppe mehr Bax einfach und zweifach positiv angefärbte Nervenzellen als in den G-CSF Gruppen. Die Zahl der nicht mit Bax angefärbten Nervenzellen ist jedoch bei den G-CSF Gruppen signifikant höher als in der Kontrollgruppe. Diese Ergebnisse führen zu dem Schluss, dass durch Schädigung mit dem Wasserstrahldissektor Apoptose in den Nervenzellen ausgelöst wurde. Durch die Behandlung mit G-CSF wurde die Zahl der Nervenzellen, die mit dem proapoptotischen Bax angefärbt sind, jedoch signifikant geringer als in der Kontrollgruppe. Diese Ergebnisse führen zu der Annahme, dass durch die Behandlung mit G-CSF die Expression und Transkription von Bax in Neuronen der Ncll. cochleares zurückgeht und wahrscheinlich dadurch auch die Apoptose verhindert wird.

Die Ergebnisse dieser Arbeit werden durch Studien anderer Autoren untermauert. Bax ist ein proapoptotisches Protein welches durch die Applikation von G-CSF beeinflusst werden kann (32). Des Weiteren führt Bax zur Apoptose, indem es sich aus dem Zytosol in die Mitochondrienmembran verlagert, eine Pore bildet und zur Freisetzung von Cytochrom c führt (88). Ebenso ist Bax ein direkter Gegenspieler des antiapoptotischen Bcl-2 (65). In einer anderen Studie wurde anstatt Bax das proapoptotische Protein Bak nachgewiesen. Da Bak nicht wie Bax direkt mit Bcl-2 interagiert lag der Fokus in dieser Studie auf dem proapoptotischen Protein Bax (99). Es wurde in Studien belegt, dass die Aktivierung von Bax für die Apoptose essentiell ist (52). Bei zerebraler Ischämie kommt es bei Ratten zu einem Anstieg von Bax (53). Ebenso kommt es bei Patienten mit Aneurysmen zu einer erhöhten Nachweisbarkeit von Bax positiven Zellen (27). Die Wirkung von G-CSF auf Bax zeigt sich durch eine sinkende Anzahl der Bax-Translokation in die Mitochondrienmembran hinein und einer geringeren Freisetzung von Cytochrom c ins Zytosol (49; 84; 103). Wie auch in unserer Arbeit proklamieren diese Studien einen antiapoptotischen und neuroprotektiven Effekt von G-CSF, der sich unter anderem durch eine niedrigere Anzahl von Bax-positiven Nervenzellen zeigt (9; 49; 53; 84; 103).

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Ergebnisse dieser Studie, den in der Literatur vielfach beschriebenen neuroprotektiven und antiapoptotischen Effekt von G-CSF, durch Supprimierung des proapoptotischen Proteins Bax, auf Nervenzellen in den Ncll. cochleares untermauern.

### **5.2.2 Wirkt sich G-CSF auf die Anzahl der Bcl-2-positiven Nervenzellen im Kerngebiet des N. cochlearis aus?**

G-CSF führt zu einer verstärkten Expressierung der Bcl-2-positiven Nervenzellen innerhalb der Kerngebiete des N. cochlearis. Die zu dieser Fragestellung erhobenen Daten sind statistisch signifikant.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass in den beiden G-CSF Gruppen auf der rechten geschädigten Kerngebietsseite mehr Zellen mit Bcl-2 angefärbt sind als auf der linken Seite. In der Kontrollgruppe sind signifikant weniger Nervenzellen mit Bcl-2 angefärbt als in den beiden G-CSF Gruppen. In den G-CSF Gruppen sind signifikant mehr Nervenzellen mit Bcl-2 angefärbt als in der Kontrollgruppe. Durch die

Behandlung mit G-CSF steigt die Zahl der mit Bcl-2 angefärbten Nervenzellen stark an. Dies führt zu einer geringeren Apoptoserate.

In diversen Studien wurde bereits die Wirkung von Bcl-2 auf die Apoptose untersucht. Bcl-2 ist ein Protoonkogen, welches den Zelltod neuraler Zellen inhibiert (105). Es wurde gezeigt, dass Bcl-2 trotz der Abwesenheit von neuralen Wachstumsfaktoren Neurone vor der Apoptose schützt (31). Im Ischämie-Modell wird durch die Applikation von G-CSF der Bcl-2 Spiegel bei Ratten erhöht und die Freisetzung von Cytochrom c aus dem Zytoplasma gesenkt (50; 84; 103). Wie auch in unserer Arbeit, wurde in diesen Studien gezeigt, dass das antiapoptotische Protein Bcl-2 neurale Zellen vor der Apoptose bewahrt (4; 13; 49; 101; 103; 105). In einer Studie zu MPTP induziertem dopaminergen Zelltod führt die Verabreichung von G-CSF ebenfalls zu einem steigenden Bcl-2 Level und zum Erhalt der Neurone (9). Weitere Studien zeigen, dass G-CSF zu einer erhöhten Anzahl von Bcl-2 positiven Zellen führt und somit antiapoptotisch wirkt, was sich mit den Ergebnissen dieser Arbeit deckt (50; 100). G-CSF wirkt nicht nur indirekt durch die Hochregulation antiapoptotischer Proteine neuroprotektiv und hemmend auf die Apoptose, sondern auch direkt durch die Aktivierung des antiapoptotischen Weges, der unter 2.4 ausführlich erläutert wurde (9; 22; 46; 49; 53; 84; 103).

Auch im Zusammenhang mit Bcl-2 zeigt sich ein neuroprotektiver und antiapoptotischer Effekt von G-CSF auf Nervenzellen in den Ncll. cochleares.

### **5.2.3 Wirkt sich G-CSF auf die Anzahl der apoptotischen Nervenzellen im Kerngebiet des N. cochlearis aus?**

Die Applikation von G-CSF führt zu einem Rückgang apoptotischer Nervenzellen innerhalb der Kerngebiete des N. cochlearis. Die zu dieser Fragestellung erhobenen Daten sind statistisch signifikant.

Der direkte Apoptosenachweis mit der TUNEL-Methode zeigt, dass im geschädigten rechten Kerngebiet des N. cochlearis die Anzahl der TUNEL-positiven Nervenzellen signifikant höher ist, als im linken nicht geschädigten Kerngebiet. Innerhalb des rechten Kerngebietes ist die Anzahl der TUNEL-positiven Nervenzellen in der Kontrollgruppe am höchsten. In den Kerngebieten der beiden G-CSF Gruppen

befinden sich statistisch signifikant weniger TUNEL-positive Nervenzellen als in den Kerngebieten der Kontrollgruppe. Diese Ergebnisse führen zu der Erkenntnis, dass G-CSF einen hemmenden Einfluss auf die Apoptose hat. Diese antiapoptotische Wirkung wird aller Voraussicht nach durch die Regulation des antiapoptotischen Proteins Bcl-2 und des proapoptotischen Proteins Bax mitbestimmt.

In der Literatur finden sich diverse Studien die belegen, dass die Applikation von G-CSF zu einer geringeren Anzahl TUNEL-positiver Nervenzellen führt (34; 66; 94; 103). Diese Ergebnisse stimmen mit den Ergebnissen unserer Studie überein, welche ebenfalls eine Supprimierung TUNEL-positiver Nervenzellen durch die Applikation von G-CSF nachweist. Bei fokaler und globaler zerebraler Ischämie bei Ratten bewirkt die Applikation von G-CSF eine geringere Anzahl apoptotischer Zellen (56; 72). Des Weiteren wurde in Modellen bezüglich Rückenmarksverletzungen gezeigt, dass G-CSF zu einer geringeren Apoptoserate der Nervenzellen führt (35; 53; 69). In den Modellen der ischämischen anterioren Optikusneuropathie und der Optikusnervenschädigung wurde gezeigt dass die Applikation von G-CSF antiapoptotisch wirkt und dass dies wiederum einen positiven Effekt auf die Anzahl der Nervenzellen hat (11; 49; 50; 93). Auch im Modell diabetischer Ratten führt G-CSF zu einer geringeren Apoptoserate in Kardiomyozyten und führt zu einer verbesserten diastolischen Funktion (81).

Zusammenfassend kann man sagen, dass G-CSF zu einer geringeren Anzahl an TUNEL-positiven Nervenzellen in den Ncll. cochleares nach Schädigung des Nervus cochlearis führt und somit die Apoptose in Nervenzellen hemmt. Diese Hemmung der Apoptose beruht insbesondere auf der Beeinflussung der Proteine Bax und Bcl-2.

### 5.3 Ausblick

Diese Studie ist eine Folgestudie einer vorangegangenen Doktorarbeit von Benjamin Schackmann und liefert erste immunhistochemische Ergebnisse in Bezug auf die Wirkung von G-CSF nach Schädigung des N. cochlearis. Es konnte bereits gezeigt werden, dass G-CSF zu einer höheren Anzahl von Neuronen im Kerngebiet des N. cochlearis und zu einem besseren Erhalt der Kerngebietsfläche des N. cochlearis nach Schädigung führt. Die vorliegende Arbeit ergänzt diese und viele andere Studien, die sich mit der Wirkung von G-CSF auf Nervenzellen beschäftigen. In dieser Studie wurden die immunhistochemischen Wirkungen von G-CSF genauer beleuchtet. Hierzu wurde die Wirkung von G-CSF auf das proapoptotische Protein Bax und das antiapoptotische Protein Bcl-2 untersucht. Ebenso wurde ein direkter Apoptosenachweis mittels TUNEL-Methode durchgeführt.

G-CSF ist ein Medikament mit guter Verträglichkeit und weitreichender klinischer Anwendung im Bereich der Blut- und Stammzellmobilisation, insbesondere vor Chemotherapien. Im Mittelpunkt der heutigen Forschung steht jedoch immer mehr die Wirkung von G-CSF auf das zentrale und periphere Nervensystem.

Durch die signifikanten Ergebnisse dieser Studie empfiehlt sich die Erprobung von G-CSF in weiteren experimentellen Studien zum Erhalt von Nervenzellen und Nervengewebe. Momentan wird in Projekten unserer Arbeitsgruppe die Wirkung von G-CSF auf den N. facialis und den N. ischiadicus untersucht. Auch die Untersuchung weiterer Proteine der Bcl-2 Familie wie Bak, Bid oder Bim würden helfen die genauen intrazellulären Wirkmechanismen von G-CSF besser zu verstehen.

Nach Operationen von Tumoren im Kleinhirnbrückenwinkel wird der Hörnerv oft geschädigt, was nicht selten einen permanenten Hörverlust zur Folge hat. In dieser Studie wurde gezeigt, dass sich G-CSF positiv auf die Anzahl der Nervenzellen in den Kerngebieten des N. cochlearis durch Hemmung der Apoptose auswirkt. G-CSF könnte somit einer postoperativen Hörminderung entgegenwirken und dadurch die Hörfunktion von Patienten nach Eingriffen am Kleinhirnbrückenwinkel nachhaltig verbessern. Aus diesem Grund empfiehlt sich eine klinische Studie zur Evaluation der Ergebnisse beim Menschen.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Adams JM, Huang DC, Strasser A, Willis S, Chen L, et al. 2005. Subversion of the Bcl-2 life/death switch in cancer development and therapy. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 70:469-77
2. Aktories K. 2009. *Pharmakologie und Toxikologie*. Elsevier, Urban & Fischer
3. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. 2011. *Molekularbiologie der Zelle*. pp 18. Wiley. 1261-76 pp.
4. Allsopp TE, Wyatt S, Paterson HF, Davies AM. 1993. The proto-oncogene bcl-2 can selectively rescue neurotrophic factor-dependent neurons from apoptosis. *Cell* 73:295-307
5. Arts HA, Telian SA, El-Kashlan H, Thompson BG. 2006. Hearing preservation and facial nerve outcomes in vestibular schwannoma surgery: results using the middle cranial fossa approach. *Otology & neurotology : official publication of the American Otological Society, American Neurotology Society [and] European Academy of Otology and Neurotology* 27:234-41
6. Baldo MP, Davel AP, Damas-Souza DM, Nicoletti-Carvalho JE, Bordin S, et al. 2011. The antiapoptotic effect of granulocyte colony-stimulating factor reduces infarct size and prevents heart failure development in rats. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 28:33-40
7. Bensinger W, Singer J, Appelbaum F, Lilleby K, Longin K, et al. 1993. Autologous transplantation with peripheral blood mononuclear cells collected after administration of recombinant granulocyte stimulating factor. *Blood* 81:3158-63
8. Broadwater MA, Liu W, Crews FT, Spear LP. 2014. Persistent loss of hippocampal neurogenesis and increased cell death following adolescent, but not adult, chronic ethanol exposure. *Developmental neuroscience* 36:297-305
9. Cao XQ, Arai H, Ren YR, Oizumi H, Zhang N, et al. 2006. Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor protects against MPTP-induced dopaminergic cell death in mice by altering Bcl-2/Bax expression levels. *Journal of neurochemistry* 99:861-7
10. Certo M, Del Gaizo Moore V, Nishino M, Wei G, Korsmeyer S, et al. 2006. Mitochondria primed by death signals determine cellular addiction to antiapoptotic BCL-2 family members. *Cancer cell* 9:351-65
11. Chang CH, Huang TL, Huang SP, Tsai RK. 2014. Neuroprotective effects of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) in a rat model of anterior ischemic optic neuropathy (rAION). *Experimental eye research* 118:109-16
12. Chao NJ, Schriber JR, Grimes K, Long GD, Negrin RS, et al. 1993. Granulocyte colony-stimulating factor "mobilized" peripheral blood progenitor cells accelerate granulocyte and platelet recovery after high-dose chemotherapy. *Blood* 81:2031-5
13. Charles MS, Ostrowski RP, Manaenko A, Duris K, Zhang JH, Tang J. 2012. Role of the pituitary-adrenal axis in granulocyte-colony stimulating factor-induced neuroprotection against hypoxia-ischemia in neonatal rats. *Neurobiology of disease* 47:29-37
14. Chen L, Willis SN, Wei A, Smith BJ, Fletcher JI, et al. 2005. Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. *Molecular cell* 17:393-403
15. Chen WF, Jean YH, Sung CS, Wu GJ, Huang SY, et al. 2008. Intrathecally injected granulocyte colony-stimulating factor produced neuroprotective effects in spinal cord ischemia via the mitogen-activated protein kinase and Akt pathways. *Neuroscience* 153:31-43
16. Cheng EH, Wei MC, Weiler S, Flavell RA, Mak TW, et al. 2001. BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis. *Molecular cell* 8:705-11

17. Cheng XL, Li MK. 2014. Effect of topiramate on apoptosis-related protein expression of hippocampus in model rats with Alzheimers disease. *European review for medical and pharmacological sciences* 18:761-8
18. Coban J, Dogan-Ekici I, Aydin AF, Betul-Kalaz E, Dogru-Abbasoglu S, Uysal M. 2014. Blueberry treatment decreased D-galactose-induced oxidative stress and brain damage in rats. *Metabolic brain disease*
19. Demetri GD, Griffin JD. 1991. Granulocyte colony-stimulating factor and its receptor. *Blood* 78:2791-808
20. Diederich K, Sevimli S, Dorr H, Kosters E, Hoppen M, et al. 2009. The role of granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) in the healthy brain: a characterization of G-CSF-deficient mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29:11572-81
21. Ding J, Zhang Z, Roberts GJ, Falcone M, Miao Y, et al. 2010. Bcl-2 and Bax interact via the BH1-3 groove-BH3 motif interface and a novel interface involving the BH4 motif. *The Journal of biological chemistry* 285:28749-63
22. Ding L, Gao X, Yu S, Yang J. 2014. Effects of mild and moderate hypothermia therapy on expression of cerebral neuron apoptosis related proteins and glial fiber acidic protein after rat cardio-pulmonary resuscitation. *Cell biochemistry and biophysics* 70:1519-25
23. Dong F, Larner AC. 2000. Activation of Akt kinase by granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF): evidence for the role of a tyrosine kinase activity distinct from the Janus kinases. *Blood* 95:1656-62
24. Dubrulle F, Ernst O, Vincent C, Vaneecloo FM, Lejeune JP, Lemaitre L. 2000. Cochlear fossa enhancement at MR evaluation of vestibular Schwannoma: correlation with success at hearing-preservation surgery. *Radiology* 215:458-62
25. Dudek H, Datta SR, Franke TF, Birnbaum MJ, Yao R, et al. 1997. Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt. *Science (New York, N.Y.)* 275:661-5
26. Dunn IF, Bi WL, Erkmen K, Kadri PA, Hasan D, et al. 2014. Medial acoustic neuromas: clinical and surgical implications. *Journal of neurosurgery* 120:1095-104
27. Durdu S, Deniz GC, Balci D, Zaim C, Dogan A, et al. 2012. Apoptotic vascular smooth muscle cell depletion via BCL2 family of proteins in human ascending aortic aneurysm and dissection. *Cardiovascular therapeutics* 30:308-16
28. Ferrer I, Pozas E, Lopez E, Ballabriga J. 1997. Bcl-2, Bax and Bcl-x expression following hypoxia-ischemia in the infant rat brain. *Acta neuropathologica* 94:583-9
29. Frampton JE, Lee CR, Faulds D. 1994. Filgrastim. A review of its pharmacological properties and therapeutic efficacy in neutropenia. *Drugs* 48:731-60
30. Galonek HL, Hardwick JM. 2006. Upgrading the BCL-2 network. *Nature cell biology* 8:1317-9
31. Garcia I, Martinou I, Tsujimoto Y, Martinou JC. 1992. Prevention of programmed cell death of sympathetic neurons by the bcl-2 proto-oncogene. *Science (New York, N.Y.)* 258:302-4
32. Gavathiotis E, Reyna DE, Davis ML, Bird GH, Walensky LD. 2010. BH3-triggered structural reorganization drives the activation of proapoptotic BAX. *Molecular cell* 40:481-92
33. Gorgen I, Hartung T, Leist M, Niehorster M, Tiegs G, et al. 1992. Granulocyte colony-stimulating factor treatment protects rodents against lipopolysaccharide-induced toxicity via suppression of systemic tumor necrosis factor-alpha. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 149:918-24
34. Guo X, Bu X, Jiang J, Cheng P, Yan Z. 2012. Enhanced neuroprotective effects of co-administration of G-CSF with simvastatin on intracerebral hemorrhage in rats. *Turkish neurosurgery* 22:732-9
35. Guo Y, Liu S, Wang P, Zhang H, Wang F, et al. 2014. Granulocyte colony-stimulating factor improves neuron survival in experimental spinal cord injury by regulating nucleophosmin-1 expression. *Journal of neuroscience research* 92:751-60



36. Hargitai B, Szabo V, Cziniel M, Hajdu J, Papp Z, et al. 2004. Human brain of preterm infants after hypoxic-ischaemic injuries: no evidence of a substantial role for apoptosis by using a fine-tuned ultrasound-guided neuropathological analysis. *Brain & development* 26:30-6
37. Hockenbery D, Nunez G, Milliman C, Schreiber RD, Korsmeyer SJ. 1990. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* 348:334-6
38. Huang HY, Lin SZ, Kuo JS, Chen WF, Wang MJ. 2007. G-CSF protects dopaminergic neurons from 6-OHDA-induced toxicity via the ERK pathway. *Neurobiology of aging* 28:1258-69
39. Jansohn M, Aigner A. 2007. *Gentechnische Methoden: eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor*. Elsevier, Spektrum, Akad. Verlag
40. Karow T, Lang-Roth R. 2013. *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie: vorlesungsorientierte Darstellung und klinischer Leitfaden für Studium und Praxis 2013; [Markierung der Prüfungsfakten des "Hammerexamens" bis 04/2012 ; Therapieempfehlungen deutscher und internationaler Fachgesellschaften ; umfassende Dosierungen ; in Farbe]*. Selbstverl. des Verf.
41. Karp G, Beginnen K, Vogel S, Kuhlmann-Krieg S. 2005. *Molekulare Zellbiologie*. Springer
42. Kerr JB. 2010. *Functional Histology*. Elsevier Mosby Australia
43. Kim BK, Ko IG, Kim SE, Kim CJ, Yoon JS, et al. 2013. Impact of Several Types of Stresses on Short-term Memory and Apoptosis in the Hippocampus of Rats. *International neurology journal* 17:114-20
44. Kim H, Rafiuddin-Shah M, Tu HC, Jeffers JR, Zambetti GP, et al. 2006. Hierarchical regulation of mitochondrion-dependent apoptosis by BCL-2 subfamilies. *Nature cell biology* 8:1348-58
45. Klemm K, Eipel C, Cantre D, Abshagen K, Menger MD, Vollmar B. 2008. Multiple doses of erythropoietin impair liver regeneration by increasing TNF-alpha, the Bax to Bcl-xL ratio and apoptotic cell death. *PloS one* 3:e3924
46. Komine-Kobayashi M, Zhang N, Liu M, Tanaka R, Hara H, et al. 2006. Neuroprotective effect of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in transient focal ischemia of mice. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 26:402-13
47. Kroemer G, Martin SJ. 2005. Caspase-independent cell death. *Nature medicine* 11:725-30
48. Kuwana T, Bouchier-Hayes L, Chipuk JE, Bonzon C, Sullivan BA, et al. 2005. BH3 domains of BH3-only proteins differentially regulate Bax-mediated mitochondrial membrane permeabilization both directly and indirectly. *Molecular cell* 17:525-35
49. Lan X, Qu H, Yao W, Zhang C. 2008. Granulocyte-colony stimulating factor inhibits neuronal apoptosis in a rat model of diabetic cerebral ischemia. *The Tohoku journal of experimental medicine* 216:117-26
50. Li L, Klebe D, Doycheva D, McBride DW, Krafft PR, et al. 2015. G-CSF ameliorates neuronal apoptosis through GSK-3beta inhibition in neonatal hypoxia-ischemia in rats. *Experimental neurology* 263:141-9
51. Li Y, Han F, Shi Y. 2013. Increased neuronal apoptosis in medial prefrontal cortex is accompanied with changes of Bcl-2 and Bax in a rat model of post-traumatic stress disorder. *Journal of molecular neuroscience : MN* 51:127-37
52. Lindsten T, Ross AJ, King A, Zong WX, Rathmell JC, et al. 2000. The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members bak and bax are essential for normal development of multiple tissues. *Molecular cell* 6:1389-99
53. Liu G, Wang T, Wang T, Song J, Zhou Z. 2013. Effects of apoptosis-related proteins caspase-3, Bax and Bcl-2 on cerebral ischemia rats. *Biomedical reports* 1:861-7
54. Llambi F, Moldoveanu T, Tait SW, Bouchier-Hayes L, Temirov J, et al. 2011. A unified model of mammalian BCL-2 protein family interactions at the mitochondria. *Molecular cell* 44:517-31
55. Löffler G, Petrides PE, Heinrich PC. 2007. *Biochemie und Pathobiochemie*. Springer
56. Matchett GA, Calinisan JB, Matchett GC, Martin RD, Zhang JH. 2007. The effect of granulocyte-colony stimulating factor in global cerebral ischemia in rats. *Brain research* 1136:200-7

57. Matsumoto M, Sekiya T, Kojima K, Ito J. 2008. An animal experimental model of auditory neuropathy induced in rats by auditory nerve compression. *Experimental neurology* 210:248-56
58. Meuer K, Pitzer C, Teismann P, Kruger C, Goricke B, et al. 2006. Granulocyte-colony stimulating factor is neuroprotective in a model of Parkinson's disease. *Journal of neurochemistry* 97:675-86
59. Morest DK, Kim J, Bohne BA. 1997. Neuronal and transneuronal degeneration of auditory axons in the brainstem after cochlear lesions in the chinchilla: cochleotopic and non-cochleotopic patterns. *Hearing research* 103:151-68
60. Moriyama T, Fukushima T, Asaoka K, Roche PH, Barrs DM, McElveen JT, Jr. 2002. Hearing preservation in acoustic neuroma surgery: importance of adhesion between the cochlear nerve and the tumor. *Journal of neurosurgery* 97:337-40
61. Murphy KP, Travers P, Walport M, Janeway C. 2008. *Janeway's Immunobiology*. Garland Science
62. Nagata S, Tsuchiya M, Asano S, Kaziro Y, Yamazaki T, et al. 1986. Molecular cloning and expression of cDNA for human granulocyte colony-stimulating factor. *Nature* 319:415-8
63. Naito T, Goto K, Morioka S, Matsuba Y, Akema T, et al. 2009. Administration of granulocyte colony-stimulating factor facilitates the regenerative process of injured mice skeletal muscle via the activation of Akt/GSK3 $\alpha$  signals. *European journal of applied physiology* 105:643-51
64. Nicola NA, Metcalf D, Matsumoto M, Johnson GR. 1983. Purification of a factor inducing differentiation in murine myelomonocytic leukemia cells. Identification as granulocyte colony-stimulating factor. *The Journal of biological chemistry* 258:9017-23
65. Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. 1993. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 74:609-19
66. Pastuszko P, Schears GJ, Greeley WJ, Kubin J, Wilson DF, Pastuszko A. 2014. Granulocyte colony stimulating factor reduces brain injury in a cardiopulmonary bypass-circulatory arrest model of ischemia in a newborn piglet. *Neurochemical research* 39:2085-92
67. Petros AM, Olejniczak ET, Fesik SW. 2004. Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. *Biochimica et biophysica acta* 1644:83-94
68. Pillai K, Pourgholami MH, Chua TC, Morris DL. 2013. Does the expression of BCL2 have prognostic significance in malignant peritoneal mesothelioma? *American journal of cancer research* 3:312-22
69. Pitzer C, Klussmann S, Kruger C, Letellier E, Plaas C, et al. 2010. The hematopoietic factor granulocyte-colony stimulating factor improves outcome in experimental spinal cord injury. *Journal of neurochemistry* 113:930-42
70. Pollard TD, Earnshaw WC, Lippincott-Schwartz J. 2007. *Cell Biology: Das Original Mit Übersetzungshilfen*. Spektrum, Akad. Verlag
71. R&D-Systems. TUNEL-Schema. [www.rndsystems.com/products/tdt-in-situ-apoptosis-detection-kit--fluorescein\\_4812-30-k#product-details](http://www.rndsystems.com/products/tdt-in-situ-apoptosis-detection-kit--fluorescein_4812-30-k#product-details)
72. Schabitz WR, Kollmar R, Schwaninger M, Juettler E, Bardutzky J, et al. 2003. Neuroprotective effect of granulocyte colony-stimulating factor after focal cerebral ischemia. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 34:745-51
73. Schabitz WR, Sommer C, Zoder W, Kiessling M, Schwaninger M, Schwab S. 2000. Intravenous brain-derived neurotrophic factor reduces infarct size and counterregulates Bax and Bcl-2 expression after temporary focal cerebral ischemia. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 31:2212-7
74. Scharl M, Arand M. 2009. *Biochemie und Molekularbiologie des Menschen*. Elsevier, Urban & Fischer
75. Schneider A, Kruger C, Steigleder T, Weber D, Pitzer C, et al. 2005. The hematopoietic factor G-CSF is a neuronal ligand that counteracts programmed cell death and drives neurogenesis. *The Journal of clinical investigation* 115:2083-98

76. Schneider A, Kuhn HG, Schabitz WR. 2005. A role for G-CSF (granulocyte-colony stimulating factor) in the central nervous system. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 4:1753-7
77. Schulz JB, Bremen D, Reed JC, Lommatzsch J, Takayama S, et al. 1997. Cooperative interception of neuronal apoptosis by BCL-2 and BAG-1 expression: prevention of caspase activation and reduced production of reactive oxygen species. *Journal of neurochemistry* 69:2075-86
78. Sekiya T, Canlon B, Viberg A, Matsumoto M, Kojima K, et al. 2009. Selective vulnerability of adult cochlear nucleus neurons to de-afferentation by mechanical compression. *Experimental neurology* 218:117-23
79. Sekiya T, Matsumoto M, Kojima K, Ono K, Kikkawa YS, et al. 2011. Mechanical stress-induced reactive gliosis in the auditory nerve and cochlear nucleus. *Journal of neurosurgery* 114:414-25
80. Sekiya T, Viberg A, Kojima K, Sakamoto T, Nakagawa T, et al. 2012. Trauma-specific insults to the cochlear nucleus in the rat. *Journal of neuroscience research* 90:1924-31
81. Shin JH, Lim YH, Song YS, So BI, Park JY, et al. 2014. Granulocyte-colony stimulating factor reduces cardiomyocyte apoptosis and ameliorates diastolic dysfunction in Otsuka long-evans Tokushima Fatty rats. *Cardiovascular drugs and therapy / sponsored by the International Society of Cardiovascular Pharmacotherapy* 28:211-20
82. Shyu WC, Lin SZ, Lee CC, Liu DD, Li H. 2006. Granulocyte colony-stimulating factor for acute ischemic stroke: a randomized controlled trial. *CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne* 174:927-33
83. Solaroglu I, Cahill J, Tsubokawa T, Beskonakli E, Zhang JH. 2009. Granulocyte colony-stimulating factor protects the brain against experimental stroke via inhibition of apoptosis and inflammation. *Neurological research* 31:167-72
84. Solaroglu I, Tsubokawa T, Cahill J, Zhang JH. 2006. Anti-apoptotic effect of granulocyte-colony stimulating factor after focal cerebral ischemia in the rat. *Neuroscience* 143:965-74
85. Strasser A. 2005. The role of BH3-only proteins in the immune system. *Nature reviews. Immunology* 5:189-200
86. Strasser A, O'Connor L, Dixit VM. 2000. Apoptosis signaling. *Annual review of biochemistry* 69:217-45
87. Sun N, Meng Q, Tian A. 2010. Expressions of the anti-apoptotic genes Bag-1 and Bcl-2 in colon cancer and their relationship. *American journal of surgery* 200:341-5
88. Suzuki M, Youle RJ, Tjandra N. 2000. Structure of Bax: coregulation of dimer formation and intracellular localization. *Cell* 103:645-54
89. Takada SH, dos Santos Haemmerle CA, Motta-Teixeira LC, Machado-Nils AV, Lee VY, et al. 2015. Neonatal anoxia in rats: hippocampal cellular and subcellular changes related to cell death and spatial memory. *Neuroscience* 284:247-59
90. Tierney TS, Moore DR. 1997. Naturally occurring neuron death during postnatal development of the gerbil ventral cochlear nucleus begins at the onset of hearing. *The Journal of comparative neurology* 387:421-9
91. Tierney TS, Russell FA, Moore DR. 1997. Susceptibility of developing cochlear nucleus neurons to deafferentation-induced death abruptly ends just before the onset of hearing. *The Journal of comparative neurology* 378:295-306
92. Tsai KJ, Tsai YC, Shen CK. 2007. G-CSF rescues the memory impairment of animal models of Alzheimer's disease. *The Journal of experimental medicine* 204:1273-80
93. Tsai RK, Chang CH, Sheu MM, Huang ZL. 2010. Anti-apoptotic effects of human granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) on retinal ganglion cells after optic nerve crush are PI3K/AKT-dependent. *Experimental eye research* 90:537-45
94. Tsai RK, Chang CH, Wang HZ. 2008. Neuroprotective effects of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) in neurodegeneration after optic nerve crush in rats. *Experimental eye research* 87:242-50

95. Watari K, Asano S, Shirafuji N, Kodo H, Ozawa K, et al. 1989. Serum granulocyte colony-stimulating factor levels in healthy volunteers and patients with various disorders as estimated by enzyme immunoassay. *Blood* 73:117-22
96. Wei MC, Zong WX, Cheng EH, Lindsten T, Panoutsakopoulou V, et al. 2001. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science (New York, N.Y.)* 292:727-30
97. Westphal D, Dewson G, Czabotar PE, Kluck RM. 2011. Molecular biology of Bax and Bak activation and action. *Biochimica et biophysica acta* 1813:521-31
98. Willis SN, Adams JM. 2005. Life in the balance: how BH3-only proteins induce apoptosis. *Current opinion in cell biology* 17:617-25
99. Willis SN, Chen L, Dewson G, Wei A, Naik E, et al. 2005. Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-xL, but not Bcl-2, until displaced by BH3-only proteins. *Genes & development* 19:1294-305
100. Winkler IG, Bendall LJ, Forristal CE, Helwani F, Nowlan B, et al. 2013. B-lymphopoiesis is stopped by mobilizing doses of G-CSF and is rescued by overexpression of the anti-apoptotic protein Bcl2. *Haematologica* 98:325-33
101. Xu S, Hoglund M, Hakansson L, Venge P. 2000. Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) induces the production of cytokines in vivo. *British journal of haematology* 108:848-53
102. Yamakami I, Ito S, Higuchi Y. 2014. Retrosigmoid removal of small acoustic neuroma: curative tumor removal with preservation of function. *Journal of neurosurgery* 121:554-63
103. Yata K, Matchett GA, Tsubokawa T, Tang J, Kanamaru K, Zhang JH. 2007. Granulocyte-colony stimulating factor inhibits apoptotic neuron loss after neonatal hypoxia-ischemia in rats. *Brain research* 1145:227-38
104. Yin XM, Oltvai ZN, Korsmeyer SJ. 1994. BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax. *Nature* 369:321-3
105. Zhong LT, Sarafian T, Kane DJ, Charles AC, Mah SP, et al. 1993. bcl-2 inhibits death of central neural cells induced by multiple agents. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90:4533-7
106. Zong WX, Lindsten T, Ross AJ, MacGregor GR, Thompson CB. 2001. BH3-only proteins that bind pro-survival Bcl-2 family members fail to induce apoptosis in the absence of Bax and Bak. *Genes & development* 15:1481-6

## Publikation

01.06.2015

The effect of Granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) on the cochlear nerve. An electrophysiological and immunohistochemical study on rats.

Guilherme R. Montibeller, Benjamin Schackmann, Julia Lessing, Steffi Urbschat, Joachim Oertel (Homburg/Saar)

66th Annual Meeting of the German Society of Neurosurgery, DGNC 07.-10.06.2015. Düsseldorf: German Medical Science GMS Publishing House; 2015. DocMO.01.06

doi: 10.3205/15dgnc006, urn:nbn:de:0183-15dgnc0066

## Materialliste:

### Substanzen:

- Roti Histokitt; Firma Roth
- Paraffin; Engelbrecht
- Formaldehydlösung 4% gepuffert, Firma Roth
- Wasserstoffperoxid 30%; Firma Merk
- Xylol-Isomere zur Synthese (701864); zentrales Chemikalienlager der Universität des Saarlandes
- Ethanol 99% vergällt mit 1% MEK; zentrales Chemikalienlager der Universität des Saarlandes
- Methanol; Rotipuran (4627.1); Firma Roth
- Natriumchlorid (NaCl), VWR Chemicals (27810364)
- Natriumhydrogenphosphat-Monohydrat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ); Merk (1063460500)
- Dinatriumhydrogenphosphatdihydrat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), Merk (1065801000)
- TrizmaHydrochloride ( $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3\text{HCl}$ ), Sigma (T3253-1kg)
- TrizmaBase ( $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$ ); Sigma (T1503-1kg)
- Kernechtrot; Firma Roth
- Aqua dest. (destilliertes Wasser); Milli-Q
- Trinatriumcitrat-Dihydrat; Merk

### Antikörper:

- Bcl-2 Antikörper polyklonal IgG Rabbit; Santa Cruz (N19, sc492)
- Bax Antikörper polyklonal Rabbit IgG, Santa Cruz ( N20; sc493)
- Biotinyliereter goat anti-Rabbit IgG als sekundärer Antikörper (ABC-Elite Kit VECTASTAIN)

### Materialien:

- Färbekasten nach Hellendahl (500ml), Firma Roth
- Färbekasten (105x85x70mm) und Gestell (85x60x40mm) aus Kalk-Soda-Glas; Firma Roth
- Drahtbügel; Firma Roth

- Rotilabo Griffinbecher (50ml, 100ml, 250ml); Firma Roth
- Rotilabo-Instrumentenschale Edelstahl mit Knopfdeckel (200x100x50, 300x200x50), Firma Roth
- Parafilm, Firma Roth
- Premiumflaschen Glas (500ml, 1000ml); Firma Roth
- Rotilabo Objektträgerästen (100x76x25mm, 25x76x26mm); Firma Roth
- Pipettenspitzen : Firma Roth
  - o StandardUniversal 100-1000  $\mu$ l
  - o StandardUniversal 10-200  $\mu$ l
  - o StandardKristall 0,5-10  $\mu$ l
- Eppendorfgefäße 1,5ml; Firma Roth
- Feuchte Kammer; Eigenproduktion
- Objektträger Glas, matter Rand; Marienfeld; VWR (76x26mm)
- Pipetten von Glison
  - o 0,5-10  $\mu$ l
  - o 10-200  $\mu$ l
  - o 100-1000  $\mu$ l
- Messzylinder Klasse A; Hirschmann; Firma Roth
  - o 50ml
  - o 100ml
  - o 1000ml
- Immunpen; Vector Laboratories
- Eppendorfständer; Firma Roth
- BD-Falcon; 50ml Polypropyrene Conical Tube#
- VWR Nitrilhandschuhe Größe M
- Deckgläser
  - o 24x32mm ; Marienfeld
  - o 24x60mm; VWR

**Geräte:**

- Wärmeschrank, VWR DRY-Line
- Mikroskop, Olympus BX43

- Mikroskopkamera, XC30 Olympus
- Mikrotom SLEE Cut 4062
- Dampfgarer; Firma Braun
- Zentrifuge Labnet (C1301LB-230V)
- MS1-Minishaker, IKA

**Kits:**

- NeuroTACS In Situ Apoptosis detection kit; (4823-30k) R&D-Systems
  - o Strep-HRP
  - o TACS-Nuclease Puffer
  - o NeuroPore
  - o Proteinase K
  - o DAB
  - o DAB Enhancer
  - o TACS-Nuclease
  - o TdT dNTP Mix
  - o TdT Enzyme
  - o 50x Magnesium Kationen
- DAB Substrate Kit for peroxidase (SK-4100)
  - o Puffer-Stammlösung
  - o DAB-Stammlösung
  - o Hydrogenperoxid-Stammlösung
  - o Nickel-Lösung
- ABC-Elite-Kit , VECTASTAIN ; Vector laboratories
  - o Normalserum (goat)
  - o Biotinylierter goat anti-Rabbit IgG als sekundärer Antikörper
  - o Reagenz A ( Avidin DH)
  - o Reagenz B ( Biotinyliertes Enzym)
- Avidin/Biotin Blocking Kit, Vector laboratories
  - o Avidin D-Lösung
  - o Biotin- Lösung



**Sonstiges:**

- Auswertungssoftware für Histo: Olympus soft imaging software, analySIS  
getIT
- Eis und Storoporbehälter

## Danksagung

Ein großer Dank geht an meinen Doktorvater Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Oertel, welcher mich stets bei dieser Arbeit unterstützt hat. Ohne seine Verbesserungsvorschläge wäre diese Arbeit nicht so, wie sie heute ist.

Ein herzlicher Dank geht an den Betreuer meiner Promotion Herrn Dr. med. Guilherme Montibeller. Ich blicke auf eine Zeit freundschaftlicher Zusammenarbeit zurück. Durch seine Verbesserungsvorschläge, Hilfsbereitschaft und sein Wissen im Forschungsbereich hat er meine Doktorarbeit wesentlich geprägt und geholfen sie zu einem guten Ende zu bringen.

Darüber hinaus möchte ich mich bei der Leiterin des Neurochirurgischen Forschungslabors Frau Prof. Dr. rer. nat. Steffi Urbschat für ihre Unterstützung, ihre zahlreichen Ratschläge und Hilfestellungen bedanken.

Den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Neurochirurgischen Forschungslabors, allen voran Frau Sigrid Welsch und Frau Sonja Hoffmann, möchte ich auch von ganzem Herzen danken. Ohne deren Hilfe, Wissen und unsere gute Zusammenarbeit wären die immunhistochemischen Experimente nicht so reibungslos verlaufen.

Weiterhin bedanke ich mich bei Herrn Dr. med. Jacek Szczygielski, Klinik für Neurochirurgie, für seine geduldige Unterstützung bei der statistischen Auswertung meiner Daten.

Ein herzliches Dankeschön geht an Benjamin Schackmann, Dr. med. Guilherme Montibeller, Prof. Dr. rer. nat. Steffi Urbschat, Beate Lessing und Dr. med. Peter Lessing für ihre Hilfe beim Gegenlesen der Arbeit.

Ich danke meiner Mutter, Beate Lessing, und meinem Bruder, Simon Lessing, dafür, dass sie stets für mich da sind und mich in allem unterstützen.

Besonders erwähnen möchte ich meinen Freund Benjamin Schackmann, welcher mich immer unterstützt und mir viel Verständnis und Geduld entgegen gebracht hat. Ohne ihn an meiner Seite hätte diese Arbeit nie dieses schöne Ende gefunden. Vielen Dank, dass es dich gibt.

Zuletzt möchte ich mich noch bei meinem Vater, Dr. med. Peter Lessing bedanken. Er war und wird mir während meiner gesamten medizinischen Laufbahn stets ein Vorbild

sein. Auf meinem bisherigen Lebensweg hat er mich in allen Lebenslagen stets unterstützt und war mir immer ein guter Ratgeber. Darauf konnte ich auch beim Schreiben dieser Dissertation zurückgreifen.

Diese Arbeit widme ich in tiefer Verbundenheit meinem Vater, Dr. med. Peter Lessing, und meinem Freund, Benjamin Schackmann.