

Lisa Grönnert
Überlandstr. 21
8050 Zürich
lisa.groennert@gmail.com

Roland Ernst Stiftung für Gesundheitswesen
Naumannstr. 8
01309 Dresden

Zürich, 09. Oktober 2018

Abschlussbericht zur Masterarbeit

Sehr geehrte Damen und Herren,

Nach dem erfolgreichen Abschluss meines Studiums möchte ich mich zunächst herzlich bei Ihnen für die Förderung bedanken, die ich im Zeitraum von April bis September 2018 von Ihnen erhalten habe. Dies ermöglichte mir meine Masterarbeit am Hirnforschungsinstitut der Universität Zürich in der Arbeitsgruppe von Martin Schwab zu schreiben. Der Fokus seiner Forschung liegt auf der Regenerationsfähigkeit des Zentralen Nervensystems mit dem Ziel diese durch gezielte Antikörpertherapie zu fördern. Im Rahmen meiner Masterarbeit untersuchte ich, ob die Gabe dieser Antikörper die Bildung neuer Blutgefäße nach einem Schlaganfall und so die damit einhergehenden neurologischen Defizite verbessern kann. Anbei sende ich Ihnen einen abschließenden Bericht über das Projekt und die Ergebnisse meiner Masterarbeit.

Mit freundlichen Grüßen,





Abschlussbericht

Masterarbeit

REFUELING THE ISCHEMIC CNS: EXPLORING NOGO-A AS NOVEL THERAPEUTIC TARGET FOR VASCULAR REPAIR

von

Lisa Grönnert

Masterprogramm Regenerative Biology and Medicine (BIOTEC)

an der Technischen Universität Dresden

Hintergrund

Mangelhafte Sauerstoff- und Nährstoffzufuhr kann sich schädigend auf die Gewebs- und Organfunktion auswirken. Besonders anfällig sind Organe mit hohem Energiebedarf, wie z.B. das Gehirn. Dieses wird durch ein komplexes Netzwerk aus Blutgefäßen versorgt, das im Menschen eine beachtliche Gesamtlänge von rund 500 km erreicht. Leider ist die Regenerationsfähigkeit des Blutgefäßsystems nach einer Verletzung, wie z.B. einem Schlaganfall, stark begrenzt. Das führt dazu, dass das vom Schlaganfall betroffene Gewebe permanent mangeldurchblutet wird und dadurch anfällig für dauerhafte Schäden und Zelltod, insbesondere von Nervenzellen, ist. Aus diesem Grund gehört der ischämische Schlaganfall zu den häufigsten Todesursachen und ist die Hauptursache für Behinderung im Erwachsenenalter. Herkömmliche Therapien beschränken sich auf die schnellstmögliche Wiedereröffnung des verschlossenen Blutgefäßes durch den Einsatz von Tissue Plasminogen activator (tPA) oder Thrombektomie. Durch das kurze Zeitfenster kommen diese Verfahren jedoch nur für einen kleinen Teil der Patienten in Frage. Ein alternativer Ansatz, der das Behandlungsfenster erweitern soll, ist die therapeutische Steigerung der Gefäßreparatur in der ischämischen Randzone, mit dem Ziel ein geeignetes Milieu für Gewebsregeneration zu schaffen. Erkenntnissen aus Tierexperimenten und klinischen Studien zufolge, wird Revaskularisierung nach einem ischämischen Insult mit verbesserter neurologischer Erholung in Verbindung gebracht. Bisherige Versuche diesen Prozess durch die Zufuhr von Wachstumsfaktoren zu steigern scheiterten jedoch aufgrund von mangelnder Stabilität und Reife der neugeformten Blutgefäße. Allerdings wurde gezeigt, dass neben Wachstumsfaktoren auch neuronale Wegweiser-moleküle, wie Nogo-A, bestimmte Aspekte der Gefäßbildung regulieren und somit potenzielle Targets für pro-angiogene Medikamente darstellen. Jüngste Forschungsergebnisse aus dem Mausmodell zeigen, dass die genetische Deletion von Nogo-A oder dessen Rezeptor S1PR2 die Gefäßreparatur verbessert und neurologische Defizite nach einem Schlaganfall reduziert.

Projektziel

Das Ziel der Masterarbeit war es, diese Ergebnisse in einem klinisch relevanten Therapieansatz durch das Anwenden von Antikörpern gegen Nogo-A zu reproduzieren. Ausserdem sollte ein experimentelles Verfahren entwickelt werden,

das es ermöglicht dynamische Gefäßveränderungen in der Netzhaut darzustellen und zu quantifizieren, um die oben beschriebene Therapiestrategie in Zukunft auch in Tiermodellen für retinale Ischämie anzuwenden.

Umsetzung

Im Rahmen der vorliegenden Masterarbeit sollte getestet werden, ob die Antikörper vermittelte Neutralisierung von Nogo-A die Gefäßreparatur nach zerebraler Ischämie verbessert. Es wurde angenommen, dass dadurch ein geeignetes Milieu für Gewebsregeneration geschaffen wird, welches schließlich in einer Verbesserung der neurologischen Symptome resultiert. Um diese Hypothese zu prüfen, wurde Mäusen nach Induktion eines Schlaganfalls eine osmotische Pumpe implantiert, um Nogo-A-Antikörper kontinuierlich über den kontralateralen Ventrikel zu applizieren. Die Kontrollgruppe erhielt eine Isotypkontrolle des verwendeten Antikörpers. Um Rückschlüsse auf motorische Defizite und Rehabilitation zu ziehen, wurden zwei verschiedene Verhaltenstests in regelmässigen Abständen durchgeführt. Nach insgesamt drei Wochen wurden die Mäuse perfundiert und die Gehirne für histologische Analysen präpariert.

Für die Entwicklung eines geeigneten Analyseverfahrens der retinalen Blutgefäße wurden Reportermause verwendet, die ein fluoreszierendes Protein unter einem Endothelzell-spezifischen Promotor exprimieren. Das retinale Gefäßsystem wurde in Flachpräparaten dargestellt und Bilder sequenziell entlang der Z-Achse aufgenommen. Mit Hilfe einer kommerziell erhältlichen Bildbearbeitungssoftware wurde ein modulares Skript erstellt, das eine automatisierte Quantifizierung vaskulärer Parameter in verschiedenen Ebenen des Gefäßnetzwerkes ermöglicht.

Ergebnisse

Die Analyse der Blutgefäße zeigte, dass die Neutralisierung von Nogo-A mittels Antikörpern die Gefäßreparatur in der ischämischen Randzone nach einem Schlaganfall deutlich verbessert. Dies äußerte sich in einer signifikant erhöhten Blutgefäßdichte mit mehr Verästelungen, einem geringeren Abstand zwischen den Blutgefäßen und einer gleichmäßigeren Verteilung der Blutgefäße, verglichen zur Kontrollgruppe. Darüber hinaus waren die neugebildeten Blutgefäße funktionell mit dem Blutkreislauf verbunden und zeigten Zeichen für Reife und Stabilität.

Als klinisch relevantestes Readout zeigten die Verhaltenstests eine signifikante Verbesserung der koordinativ-motorischen Funktion nach Nogo-A Antikörpertherapie. Dies ließ darauf schließen, dass die verbesserte Gefäßstruktur Regenerationsprozesse fördert, die die neurologische Rehabilitation begünstigen. Aufgrund dessen untersuchten wir verschiedene Prozesse, die mit Plastizität und zellulären Veränderungen nach einem Schlaganfall in Verbindung gebracht werden, wie z.B. das selektive Überleben bestimmter Neurone, Axogenese, Neurogenese und die synaptische Aktivität. Die histologische Auswertung zeigte Veränderungen in all diesen Prozessen, die im Zusammenspiel für das verbesserte neurologische Outcome verantwortlich sein können. Um den jeweiligen Einfluss der einzelnen Prozesse zu identifizieren sind jedoch weitere Untersuchungen notwendig.

Die Analyse der retinalen Blutgefäße bestätigte die in der Literatur beschriebene Entwicklung und ermöglichte die quantitative Charakterisierung von dynamischen Veränderungen, die während der Gefäßbildung beobachtet werden können. Außerdem stellt es ein simples Verfahren dar, das es ermöglicht eine Vielzahl vaskulärer Parameter in einem einzigen Flachpräparat zu bestimmen und somit nicht nur den Arbeitsaufwand, sondern auch die Anzahl der Versuchstiere reduziert.

Ausblick

In weiterführenden Experimenten sollen die zell-spezifischen Auswirkungen einer verbesserten Revaskularisierung in der ischämischen Randzone untersucht werden. Außerdem sollen in einer komparativen Studie VEGF und anti-Nogo-A Therapie miteinander verglichen und die molekularen Mechanismen, die in die Reifung neugebildeter Blutgefäße involviert sind, identifiziert werden.

Das entwickelte Analyseverfahren soll in die Etablierung eines klinisch relevanten Tiermodells für retinale Ischämie implementiert werden.