



**Charakterisierung zellulärer Veränderungen und kognitiver
Verhaltensweisen in einem Model vom Schädel-Hirn Trauma in
männlichen Mäusen**

~ ~ ~

**Characterization of cellular and behavioral changes in a model of
traumatic brain injury in male mice**

Dissertation zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades
der Graduate School of Life Sciences,
Julius-Maximilians-Universität Würzburg,
Klasse Neurowissenschaften

Vorgelegt von

Simon Lopez Caperuchipi

aus

Regensburg

Würzburg, 2022

Eingereicht am:
Bürostempel

Mitglieder des Promotionskomitees:

Vorsitzende/r:

1. Betreuer: Prof. Dr. Anna-Leena Sirén

2. Betreuer: Prof. Dr. rer. nat. Rudolf Martini

3. Betreuer: PD Dr. rer. nat. Angelika Schmitt-Böhler

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunden ausgehändigt am:

.....

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden vorab als Publikation in der Zeitschrift *Experimental Neurology*, (341: 113721, 2021) als Erstautor (Lopez-Caperuchi et al. 2021) veröffentlicht.

Zusammenfassung

Schädel-Hirn Trauma ist die führende Ursache von Tod und Behinderung unter jungen Erwachsenen in den USA und Europa. Darüber hinaus steigert Schädel-Hirn Trauma das Risiko eine Demenzerkrankung oder andere neurodegenerative Erkrankung zu erleiden. Aus diesem Grund stellt eine bessere Erkenntnis der subakuten und chronischen pathophysiologischen Prozesse eine wichtige Grundlage für eine mögliche zukünftige neuroprotektive Therapie dar. Ziel dieser Arbeit war es daher eine Übersicht von funktionellen Einschränkungen und zellulären Veränderungen in der subakuten Phase innerhalb der ersten drei Monate darzustellen. Dazu wurden Verhaltensexperimente zu kognitiven Leistungen wie räumliches Lernen, kognitive Plastizität, episodisches Gedächtnis, Angstverhalten und allgemeine Lokomotion durchgeführt. Dabei konnten funktionale Einschränkungen der Tiere im Bereich der kognitiven Flexibilität, dem räumlichen Lernen, dem belohnungsmotivierten Verhalten, sowie Hyperaktivität beobachtet werden. Weiterführend erfolgten histologische und immunhistologische Untersuchungen an den Mäusegehirnen. So konnten in unserem Tiermodell sowohl lokale neuroinflammatorische Veränderungen nachgewiesen werden, also auch generalisierte Veränderungen, welche sich auf Isocortex und Hippocampus erstreckten und beide Hemisphären gleichermaßen betrafen. Ebenso konnten demyelinisierende Prozesse im Bereich der Läsion beobachtet werden. Im Bereich des Cortex zeigte sich außerdem eine axonale Schädigung mit begleitender Neuroinflammation, sowie eine Infiltration von B-Lymphozyten. Anschließend wurde eruiert, ob eine Korrelation von funktionalem Outcome und histologischen Veränderungen besteht. Dabei zeigte sich eine signifikante Korrelation neuroinflammatorischer Prozesse mit Einschränkungen im räumlichen Lernen und Umlernen, sowie Auffälligkeiten im Bereich des belohnungsmotivierten Verhaltens. Damit ordnet sich diese Arbeit in die bestehenden Erkenntnisse zur Pathophysiologie des SHTs ein und ergänzt diese weiter.

Summary

Traumatic brain injury is the leading cause of death and disability among young adults in the USA and Europe. Traumatic brain injury increases the risk for neurodegenerative diseases and dementia. However, the underlying pathomechanisms that contribute to the increased risk for neurodegeneration remain unclear. The aim of this thesis is to provide an overview of behavioral and cellular changes in the subacute phase of the first three months after injury. Therefore, behavioral experiments were performed with a focus on spatial learning, cognitive plasticity, episodic memory, anxiety, and general locomotion. Deficits in spatial learning, cognitive plasticity, reward-motivated behavior as well as hyperactivity were monitored in mice after traumatic brain injury. Furthermore, histological and immunohistochemical analysis were performed on brain tissue three months after injury. Local neuroinflammatory changes were seen in the lesion area as well as global inflammation in cortex and hippocampus. Both hemispheres showed similar levels of inflammation. Demyelination colocalized with neuroinflammation around the lesion area. In the cortex axonal damage, neuroinflammatory changes, and migration of B-cells were detected. We further investigated the correlation between behavioral and cellular changes. Neuroinflammation correlated significantly with deficits in spatial learning, cognitive plasticity, and reward-motivated behavior. This thesis, therefore, provides an important overview of behavioral changes and cellular pathomechanisms and further knowledge of the subacute phase of traumatic brain injury.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Epidemiologie	1
1.2	Pathophysiologie.....	2
1.2.1	Primärer und sekundärer Zelltod	2
1.2.2	Neuroinflammation	3
1.2.3	Adaptive Immunantwort.....	6
1.2.4	Langfristige Veränderungen	8
1.3.3.1	Strukturelle Veränderungen.....	8
1.3.3.2	Neurodegenerative Marker	9
1.3	Verhaltensänderungen und psychische Komorbidität	11
1.3.1	Neurobehavioral Sequelae	11
1.3.2	Aufmerksamkeitsstörungen	12
1.3.3	Langfristige psychiatrische Erkrankungen	12
1.3.4	Erhöhtes Risiko für Demenzerkrankungen	13
1.4	Ziel der Arbeit.....	14
2	Material und Methoden	15
2.1	Material	15
2.1.1	Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	15
2.1.2	Verwendete Substanzen	16
2.1.3	Verwendete Puffer und Lösungen	17

2.1.4	Verwendete Software	18
2.1.5	Verwendete Antikörper	18
2.2	Methoden	19
2.2.1	Versuchstiere und Tierhaltung.....	19
2.2.2	Zeitlicher Ablauf und <i>Drop-Outs</i>	19
2.2.3	<i>Weight-Drop</i> Model.....	21
2.2.4	Verhaltenstestung.....	23
2.2.5	Präparation der Mäusegehirne	30
2.2.6	Kryoschnitte.....	31
2.2.7	Histologie und Immunhistochemie.....	31
2.2.8	Statistische Auswertung	38
3	Ergebnisse.....	39
3.1	Verhalten.....	39
3.1.1	NSS	39
3.1.2	<i>IntelliCage</i>	40
3.1.3	<i>Open Field</i>	57
3.1.4	<i>Elevated Plus Maze</i>	59
3.2	Zelluläre Veränderungen.....	61
3.2.1	Im Bereich der Läsion.....	61
3.2.2	Im Cortex.....	69
3.2.3	Im Hippocampus.....	83

3.2.4	Korrelation zellulärer Veränderungen	89
3.3	Korrelation von zellulären Veränderungen und Verhalten	93
3.3.1	Räumliches Lernen.....	93
3.3.2	Räumliches Umlernen	95
3.3.3	Auffälligkeiten im belohnungsmotivierten Handeln	99
3.3.4	Hyperaktive Verhaltensmuster	106
4	Diskussion	111
4.1	Verhaltensweisen.....	111
4.1.1	Defizite im Räumlichen Lernen und Umlernen	111
4.1.2	Episodisches Gedächtnis und Angstverhalten	113
4.1.3	Auffälligkeiten im belohnungsmotivierten Handeln	114
4.1.4	Hyperaktives Verhalten	115
4.2	Langfristige zelluläre Veränderungen.....	116
4.2.1	Neuroinflammation	116
4.2.2	Axonale Schädigung.....	119
4.2.3	Mikroblutungen, Eisenablagerungen und Demyelinisierung	120
4.2.4	Die Rolle von B-Zellen.....	121
5	Zusammenfassung und Ausblick	122
6	Abbildungsverzeichnis	124
7	Tabellenverzeichnis.....	129
8	Litteraturverzeichnis.....	130

Danksagung 142

Anhang 143

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie

In Europa und den USA stellt Schädel-Hirn Trauma (SHT) die führende Ursache von Tod und Behinderung unter jungen Erwachsenen dar (Faul et al. 2010; Maegele et al. 2007).

Allein in den USA sind 30% aller verletzungsbedingter Tode auf SHT zurückzuführen. Im Jahr 2013 verstarben ca. 56.000 Menschen, 2,5 Millionen Menschen benötigten medizinischer Behandlung und 282.000 Patienten mussten stationär aufgenommen werden. Bei ca. 85.000 Patienten blieb eine bleibende Behinderung zurück (Taylor et al. 2017; Machamer, Temkin, and Dikmen 2003).

Eine Metaanalyse aus 28 epidemiologischen Studien in 16 verschiedenen Ländern Europas ergab eine Inzidenz von 262 auf 100.000 Einwohner und eine Mortalität von 10,5 auf 100.000 (Peeters et al. 2015). Dabei waren Männer deutlich öfter als Frauen betroffen. Demographisch zeigt sich, dass vor allem Patienten unter 25 und über 75 Jahren betroffen sind. Als häufigste Ursache wurden in 13 Studien Sturzereignisse genannt, während in 11 weiteren Studien Verkehrsunfälle an erster Stelle aufgeführt wurden. Auch zeigte sich eine Korrelation mit der Altersgruppe: So stehen in der älteren Bevölkerung und bei Kindern Stürze an erster Stelle, während bei jungen Erwachsenen Verkehrsunfälle die häufigste Ursache von SHT darstellen. Drei Studien zeigten dabei, dass gerade der Anteil an älteren betroffenen Patienten weiter zunimmt (Peeters et al. 2015).

Dies ist von besonderer Bedeutung, da die Morbidität und Mortalität in dieser Altersgruppe deutlich höher liegt bedingt durch Komorbiditäten, neuroanatomische Veränderungen und die häufigere Einnahme von Antikoagulantien (Nishijima et al. 2017; Taylor et al. 2017).

Neben individuellen Schicksalsschlägen und therapeutischen Herausforderungen ergeben sich durch SHT hohe sozio-ökonomische Kosten. Einer Studie aus dem Jahr 2010 zufolge entstanden in Europa jährliche Kosten

in Höhe von 33 Milliarden Euro. Davon verteilen sich 10,1 Milliarden auf die direkten medizinischen Kosten stationärer Aufenthalte und langfristiger Behandlungen, 3,3 Milliarden Euro auf direkte nicht-medizinische Kosten durch Sozial- und Pflegeleistungen, sowie 19,6 Milliarden auf indirekte Kosten durch bleibende Behinderung und Arbeitsunfähigkeit (Gustavsson et al. 2011).

Klassifikation

Auch wenn es keine international einheitliche Klassifikation des Schädel-Hirn Traumas gibt, so erfolgt im klinischen Alltag häufig eine Einteilung in Schwer, Mittelschwer und Leicht. Dazu wird beispielsweise die *Glasgow Coma Scale* (GCS) verwendet, welche den Bewusstseinszustand auf Basis motorischer Reaktionen, Augenöffnung und verbaler Antwort der Patienten bewertet. Ein Score von 15-13 wird als Leicht, ein Score von 12-9 als Mittelschwer und ein Score von 8-3 als Schwer eingeordnet (Schimmel, Acosta, and Lozano 2017). Eine weitere Einteilung orientiert sich an der Länge der Bewusstlosigkeit: So wird ein Verlust des Bewusstseins mit einer Länge von unter 30 min als Leicht, zwischen 30 min und 24 Stunden als Mittelschwer und von über 24 Stunden als Schwer klassifiziert (LoBue et al. 2019).

1.2 Pathophysiologie

1.2.1 Primärer und sekundärer Zelltod

Primärer Zelltod ereignet sich durch das SHT selbst. Durch die mechanische Verletzung kommt es zur Schädigung von Neuronen, Axonen und Blutgefäßen (Adams, Graham, and Gennarelli 1983). Sekundärer Zelltod entsteht durch nachfolgende biochemische Prozesse, welche durch die primäre Schädigung und Zellnekrosen ausgelöst werden. Diese beginnen innerhalb von Sekunden und Minuten nach dem Trauma und können über Tage bis Jahre anhalten. Der Prozess spielt sich primär lokal ab, kann sich jedoch im Verlauf auf das gesamte Gehirn ausbreiten. Die wichtigsten Kaskaden stellen dabei Exzitotoxizität, oxidativer Stress, mitochondriale Schädigung, eine gestörte Blut-Hirn-Schranke, sowie Neuroinflammation dar (Schimmel, Acosta, and Lozano 2017).

Durch das initiale Trauma kommt es zu einer Beschädigung der Blut-Hirn-Schranke, welche u.a. durch die Interaktion von Endothel-Zellen mit Astrozyten und Gliazellen gekennzeichnet ist. Periphere Immunzellen und freie Faktoren wandern sekundär ein und steigern durch Interaktion mit Glia- und Endothelzellen die Permeabilität weiter. Dies führt über eine Erhöhung des osmotischen Drucks zu Ödembildung und einem Anstieg des intrakraniellen Drucks (Schimmel, Acosta, and Lozano 2017).

Exzitotoxizität entsteht durch die Freisetzung größerer Mengen des Neurotransmitters Glutamat in den Extrazellularraum. Dadurch kommt es zu einer Übererregung von Glutamat- Rezeptoren, wie N-methyl-D-Aspartat (NMDA) oder α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA), was eine Calcium abhängige Degeneration zur Folge hat (Simon et al. 2017).

Auch Mitochondriale Dysfunktion wird nach SHT beschrieben. Ein Austausch von Cardiolipin von der Inneren zur Äußeren Membran markiert geschädigte Mitochondrien und löst damit sekundäre inflammatorische Prozesse aus (Chu et al. 2013). So werden mit Cardiolipin markierte Membranen durch Phagozytose abgebaut (Balasubramanian et al. 2015). Gleichzeitig kommt es bedingt durch Exzitotoxizität zu einem zunehmenden Einstrom von Kalzium in die Zelle, was zu einem veränderten Membranpotential und in letzter Instanz zu einem Stopp der Synthese von Adenosintriphosphat (ATP) führt (Mbye et al. 2008). Die fehlerhaften Mitochondrien setzen schließlich eine Reihe von Toxinen und apoptotischen Faktoren frei (Cheng et al. 2012).

Im Gehirn kommt es nach SHT zur erhöhten Konzentration freier Sauerstoff und Stickstoff Radikale, welche durch ihre oxidativen Eigenschaften eine gestörte Zellfunktion nach sich ziehen. Die dadurch geschädigten Zellen stimulieren wiederum die Produktion freier Sauerstoffradikale durch neutrophile Granulozyten, was das Absterben neuronaler Zellen weiter beschleunigt (Schimmel, Acosta, and Lozano 2017).

1.2.2 Neuroinflammation

In der Akutphase kommt es initial zu einer Aktivierung neuroinflammatorischer Prozesse, um geschädigte Zellen zu reparieren und das Gehirn vor

einwandernden Pathogenen zu schützen (Schmidt et al. 2005). Eingewanderte Immunzellen, Mikroglia und freigesetzte Zytokine, Chemokine, sowie weitere inflammatorische Moleküle führen jedoch auch zu einer Beeinträchtigung endogener Reparaturmechanismen (Tajiri et al. 2014). Durch SHT werden lokal Mikroglia aktiviert und über die beschädigte Blut-Hirn-Schranke können periphere neutrophile Granulozyten, sowie Lymphozyten und Makrophagen einwandern. Diese schütten Prostaglandine und pro-inflammatorische Zytokine aus, was wiederum zu einer weiteren Rekrutierung von Mikroglia und Immunzellen in Richtung der Läsion führt (Hosomi et al. 2020).

Initial verhindern Mikroglia durch die Trennung von gesundem und geschädigtem Gewebe und den Abbau von untergegangenen Gewebe eine weitere Ausbreitung sekundärer Zellschädigung (Hosomi et al. 2020). Mit zunehmender Rekrutierung und Aktivierung tragen sie jedoch zur Ausschüttung und Hochregulation pro-inflammatorischer Zytokine, sowie neurotoxischer Moleküle und freier Radikale bei. $\text{TNF-}\alpha$, Interleukin (IL) β , IL 6, IL 12 und Interferon δ schwächen die Blut-Hirn-Schranke zusätzlich. Des Weiteren erhöhen Mikroglia die Expression des *Major Histocompatibility Complex Class II* (MHCII+), welcher ebenfalls zu Neurodegeneration beiträgt (Schimmel, Acosta, and Lozano 2017).

Je nach Phänotyp tragen Mikroglia auch zur Reduktion von Neuroinflammation bei. Dafür ist unter anderem der M2-Phänotyp verantwortlich, welcher durch den Kontakt von Mikroglia mit IL 4 oder IL 13 entsteht. Dieser regt die Produktion anti-inflammatorischer Zytokine wie IL 10 und *Transforming growth factor* (TGF) β 1 an und reguliert die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine nach unten. Im Gegensatz dazu reguliert der M1-Phänotyp, welcher durch Anwesenheit von Lipopolysacchariden und Interferon γ auftritt, die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine nach oben und die anti-inflammatorische Zytokine nach unten (Schimmel, Acosta, and Lozano 2017).

Dabei ist jedoch anzumerken, dass von einer strikten Trennung in M1- und M2-Phänotyp zunehmend Abstand genommen wird. Viel mehr wird in der Literatur von einem fließenden Spektrum mit gemischten Phänotypen ausgegangen (Simon et al. 2017; Jassam et al. 2017). Sogenannte *Damage-associated*

molecular patterns (DAMPs) spielen in der Polarisierung eine entscheidende Rolle. Bei DAMPs handelt es sich um Moleküle, welche inflammatorische Prozesse auslösen oder verstärken. Dazu gehören beispielsweise freie Desoxyribonukleinsäure (DNA), Ribonukleinsäure (RNA), ATP und S-100 Proteine (Corps, Roth, and McGavern 2015). Diese DAMPs tragen gemeinsam mit freien Radikalen und Interferon γ zu einer Polarisierung in Richtung M1-Phänotyp bei (Sica and Mantovani 2012). Trotz ihrer pro-inflammatorischen Wirkung kann eine regulierte Antwort von M1 auch neuroprotektiv wirken. Eine übermäßige Aktivierung trägt jedoch zu einer sekundären Schädigung durch übermäßige Neuroinflammation bei (Loane et al. 2014). Die genaue funktionelle Rolle nach diffusem SHT von M1- und M2-Phänotyp in axonaler Schädigung und Reparaturmechanismen ist bislang noch nicht eindeutig geklärt (Simon et al. 2017; Jassam et al. 2017). Vier Stunden nach Trauma können im Cortex und im Hippocampus jedoch erhöhte Level an IL 1 β , TNF und *Cluster of differentiation* (CD) 14 gemessen werden, welche nach 72 Stunden jedoch wieder abfallen. Gleichzeitig konnten sowohl M1- als auch M2-Marker auf Mikroglia und Makrophagen 24 Stunden nach SHT entdeckt werden (Simon et al. 2017).

Astrozyten spielen eine ebenso wichtige Rolle nach einem Schädel-Hirn Trauma vor allem in der Rettung von geschädigtem, aber noch regenerationsfähigem Gewebe. Dabei formen sie Nervengewebe, um so gesundes und geschädigtes Gewebe voneinander zu trennen (Burda and Sofroniew 2014). Diese physikalische und chemische Barriere schützt die gesunden Bestandteile des Gehirns und verhindert so die weitere Ausbreitung von Gewebeschäden und Inflammation (Burda, Bernstein, and Sofroniew 2016). Außerdem regulieren Astrozyten das extrazelluläre Glutamat Level und reduzieren so Exzitotoxizität. Der Aufbau dieser Zellmatrix verhindert jedoch gleichzeitig auch eine effiziente Regeneration und Restitution (Kumar and Loane 2012).

Über mechanische Gewebeschäden im Rahmen des SHTs kommt es zu einer gesteigerten ATP Sekretion durch Astrozyten und weiteren Zellen, welche wiederum Mikroglia in den Bereich der Läsion rekrutieren. Die Freisetzung von ATP wirkt dabei auch indirekt neuroprotektiv, da die Rekrutierung von angeborenen Immunzellen ATP-abhängig ist, welche wiederum essentiell für das

Überleben lokaler Parenchym- und Meningealzellen sind (Burda, Bernstein, and Sofroniew 2016). Zudem produzieren und sekretieren Astrozyten neuro- und glioprotektive Wachstumsfaktoren wie *brain derived neurotrophic factor* (BDNF) und *nerve growth factor* (NGF). Über Signalwege an Endothelzellen stimulieren sie außerdem neurovaskuläre Remodellierung und Reparaturprozesse der Blut-Hirn-Schranke (Burda, Bernstein, and Sofroniew 2016).

Astrozyten unterliegen durch Neuroinflammation allerdings auch reaktiven Veränderungen wie einer erhöhten Expression von *glial fibrillary acidic protein* (GFAP) und der Produktion von Zytokinen und Chemokinen, welche zur weiteren Aktivierung und Rekrutierung von Immunzellen beitragen (Simon et al. 2017). Auch Astrozyten reagieren auf nach SHT freigesetzte DAMPs indem sie eigene Signalwege in Gang setzen und mit Hilfe von pro-inflammatorischen Zytokinen mit phagozytären Zellen kommunizieren. Einerseits fördert dies die Rehabilitation durch die Beseitigung von Zellschäden, andererseits trägt dies auch zu maladapten Prozessen wie einem zytotoxischen Ödem sowie einem Überschuss an inflammatorischen Mediatoren bei (Burda, Bernstein, and Sofroniew 2016).

Die Reaktion von Astrozyten auf pro- und anti-inflammatorische Zytokine sowie weitere inflammatorische Mediatoren ist also abhängig von ihrer Umgebung. Durch ihre Möglichkeit mit Immunzellen, Neuronen, Glia- und Endothelzellen zu kommunizieren und auf diese zu reagieren, stellen sie damit einen zentralen Knotenpunkt in der Pathophysiologie des SHTs dar (Burda, Bernstein, and Sofroniew 2016).

1.2.3 Adaptive Immunantwort

Die Rolle des adaptiven Immunsystems in der Pathophysiologie von SHT ist bislang noch nicht eindeutig geklärt (Jassam et al. 2017). So gibt es einige Studien, in welchen T-Zellen ein neuroprotektiver Effekt zugeschrieben wird, was im Gegensatz zu ihrer vermuteten Rolle in der Pathophysiologie des Schlaganfalls steht. So zeigen athymische Mäuse nach SHT bezogen auf neuronales Überleben einen schlechteren Outcome als Wild-Typ Tiere. Gleichzeitig ist dieser negative Effekt reversibel, wenn T-Zell defizienten Tieren

Splenozyten injiziert werden (Filiano, Gadani, and Kipnis 2017). Eine mögliche Erklärung, stellt die Produktion neurotropher Faktoren wie BDNF und NGF durch T-Zellen dar, welche das Überleben und die Rehabilitation von Neuronen fördern (Simon et al. 2017). Ein weiterer interessanter Einflussfaktor ist die Rolle regulierender T-Zellen (T_{reg}). Diese produzieren das anti-inflammatorische Interleukin 10, was die Antwort anderer T-Zellen supprimiert. Liegt der Anteil an T_{reg} zu niedrig, ist eine überschießende Neuroinflammation die Folge, was das Outcome verschlechtert. Liegt ein Überschuss an T_{reg} vor, verschwindet wiederum der neuroprotektive Effekt der T-Zellen (Filiano, Gadani, and Kipnis 2017).

Demgegenüber stehen Experimente, in denen T-Zell Migration durch eine immunsuppressive Therapie mit Tacrolimus verhindert wurde. Dabei zeigte sich in den behandelten SHT-Tieren eine verbesserte neurologische Funktion (Wu et al. 2016). Eine weitere Studie konnte die Einwanderung von T-Zellen in den Cortex mit einer schlechteren Erholung von funktionellen Einschränkungen nach SHT verknüpfen (Ndode-Ekane et al. 2018). Ebenso zeigte sich eine Assoziation von T-Zell Infiltration mit chronischer Inflammation und einer Schädigung der Blut-Hirn-Schranke. Interessanterweise konnte dabei ein Peak der T-Zell Infiltration zwei Tage nach Trauma beobachtet werden, welcher nach sieben Tagen wieder deutlich abflachte (Ndode-Ekane et al. 2018). In einer Langzeitstudie mit Mäusen nach SHT über einen Zeitraum von 8 Monaten konnte ebenfalls ein Anstieg an $CD8^+$ T-Zellen im Gehirn beobachtet werden, welcher mit einer Infiltration von $IL\ 17^+ CD4^+$ T-Zellen einhergeht (Daglas et al. 2019). Diese Veränderungen sind jedoch mit einem voranschreitenden neurologischen und motorischen Defizit assoziiert sowie mit einem Anstieg an zirkulierenden Gehirn-spezifischen Autoantikörpern. Ebenso zeigte sich bei $CD8^+$ defizienten Tieren, sowohl bei genetischer als auch pharmakologischer Depletion, ein besserer neurologischer Outcome sowie ein immunologisches Umschalten zu $Th2/TH17$ (T-Helferzelle Typ 2/Typ 17) (Daglas et al. 2019).

Die Rekrutierung von T-Zellen in das Gehirnparenchym wird durch Mikroglia mit Hilfe der Expression verschiedener Chemokine reguliert. Darüber hinaus können Mikroglia Myelin-Antigen spezifische T-Lymphozyten aktivieren. Insbesondere

M1-Typ ähnliche Mikroglia spielen eine wichtige Rolle in der Infiltration von Th1 CD4 T-Zellen und deren Aktivierung. Th1-Lymphozyten produzieren proinflammatorische Zytokine, während Th2-Lymphozyten anti-inflammatorische Zytokine wie IL 4 und IL 10 exprimieren (Ritzel et al. 2020). Obwohl T-Zellantworten normalerweise eine Antigen Präsentation auf dem T-Zell Rezeptor benötigen, scheint die IL 4 Produktion keine derartige Aktivierung der T-Zelle zu benötigen. Im Rahmen des SHTs freigesetzte DAMPs induzieren direkt die Differenzierung von IL 4 produzierenden T-Zellen (Simon et al. 2017).

1.2.4 Langfristige Veränderungen

1.3.3.1 Strukturelle Veränderungen

In einer Reihe von Magnetresonanztomographie (MRT) Studien konnte untersucht werden, ob sich auch Jahre nach der initialen Verletzung noch strukturelle Veränderungen bei betroffenen Patienten nachweisen lassen. Dabei zeigte sich ein bis zweieinhalb Jahre nach einem mittelschweren oder schweren Trauma ein global vermindertes Gehirnvolumen (Ng et al. 2008; Gale et al. 1995; Blatter et al. 1995; Blatter et al. 1997; Sidaros et al. 2009). Auch eine Degeneration der weißen Substanz beispielsweise in der Region des Corpus Callosums konnte Jahre nach dem Trauma nachgewiesen werden (Tomaiuolo et al. 2012; Dinkel et al. 2014; Farbota et al. 2012). Studien zum Volumen des Hippocampus mindestens ein Jahr nach Trauma ergaben hingegen gemischte Ergebnisse (Tomaiuolo et al. 2012; Ng et al. 2008; Warner et al. 2010; Brezova et al. 2014): Einige berichteten von Volumenverlusten bis zu zweieinhalb Jahre nach Trauma. Andere wiederum konnten keine Veränderungen nachweisen. So zeigte die längste durchgeführte *Follow-Up* Studie für Scans ein Jahr und acht Jahre nach Trauma ein vermindertes Volumen des Corpus Callosums, jedoch keine Unterschiede im Hippocampus (Tomaiuolo et al. 2012).

Eine weitere Studie mit Untersuchungen zwei Monate, ein Jahr und vier Jahre nach einem mittelschwerem bis schwerem Trauma ergab für alle Zeitpunkte eine Degeneration der weissen Substanz (Farbota et al. 2012). Diese Daten deuten darauf hin, dass SHT zumindest einige Jahre nach Trauma zu neurodegenerativen Prozessen führt. Ob diese Neuroanatomische

Veränderungen über diesen Zeitraum hinaus persistieren, wurde bislang noch nicht untersucht. So bleibt bislang ungeklärt, in wie weit SHT einen direkten progressiven Prozess in Gang setzt, welcher zu Entwicklung neurodegenerativer Erkrankungen führt (LoBue et al. 2019).

1.3.3.2 Neurodegenerative Marker

SHT ist assoziiert mit neurobiologischen Markern, wie Amyloid- β , hyperphosphoryliertem Tau (pTau), *Transactive response* DNA Protein (TDP-43) oder α -Synuclein, welche sonst bei neurodegenerativen Erkrankungen nachgewiesen werden (LoBue et al. 2019).

So konnten in Autopsien von Patienten, welche mindestens ein Jahr zuvor ein mittelschweres bis schweres SHT erlitten hatten, in 60% aller Gehirne Ablagerungen von Amyloid- β , einem pathognomischem Marker der Alzheimer Demenz, nachgewiesen werden (Johnson, Stewart, and Smith 2012). In Positronen-Emissions-Tomographie (PET) Untersuchungen konnten ebenfalls größere Ansammlungen von Amyloid- β in der hinteren cingulären Region nachgewiesen werden. Untersucht wurden dabei Patienten, welche in den vergangenen 1-17 Jahren ein SHT erlitten hatten. Dabei zeigte sich, dass größere Ansammlungen von Amyloid- β mit ausgeprägteren Läsionen der weissen Substanz assoziiert waren (Scott et al. 2016). Ebenfalls konnten im Rahmen von Autopsien an Patienten mit einem mindesten ein Jahr zurückliegendem mittelschweren bis schweren SHT vermehrte Ablagerungen von pTau nachgewiesen werden. Bei pTau handelt es sich um einen weiteren pathognomischen Marker der Alzheimererkrankung, welcher jedoch ebenfalls in weiteren neurodegenerativen Erkrankungen, den sogenannten Tauopathien wie der frontotemporalen Demenz, nachweisbar ist. TDP-43 ist ein pathognomischer Marker für frontotemporale Demenz und Amyotrophe Lateralsklerose (ALS). Ablagerungen dieses Proteins konnten in den Gehirnen von Sportlern im Ruhestand aus dem Kreis der Kontaktsportarten nachgewiesen werden (McKee et al. 2010). Größere Mengen an zytoplasmatischem TDP-43 wurden in Patienten mit mittelschwerem bis schwerem SHT gefunden. Jedoch wiesen nur 4% der SHT Patienten dieses Protein auf, was dem gleichen Anteil wie in der

Kontrollgruppe entspricht. TDP-43 zeigt sich also nach einem Trauma erhöht und ist eher als genereller Marker für neuronale Schädigung einzuordnen (Johnson et al. 2011). α -Synuclein, welches als Protein mit Morbus Parkinson und Lewy Body Demenz assoziiert ist, konnte ebenfalls in Autopsien von Patienten mit SHT nachgewiesen werden. So wiesen 20% der Patienten, welche einen initialen Bewusstseinsverlust von unter einer Stunde hatten und 16% der Patienten, welche einen Bewusstseinsverlust von über einer Stunde hatten, diesen Marker auf (Crane et al. 2016). Diese Ergebnisse zeigen einen Zusammenhang von SHT und neurodegenerativen Ablagerungen (LoBue et al. 2019).

Neuroinflammation

Es ist jedoch ungeklärt, ob diese pathologischen Veränderungen nach SHT weiter progredient sind. Ebenso ist der Pathomechanismus, welcher zu diesen Ablagerungen führt bislang noch unbekannt (LoBue et al. 2019). Es gibt Hinweise, dass Neuroinflammation in diesem Prozess eine entscheidende Rolle spielt. Eine Studie mit ehemaligen *National Football League* (NFL) Spielern, welche innerhalb ihrer Karriere wiederholt SHTs ausgesetzt waren, konnte in dieser Kohorte neuropsychologische Defizite im Bereich des sprachlichen Lernens und Gedächtnisses nachweisen (Coughlin et al. 2015). Gleichzeitig wurde in MRT Untersuchungen im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe eine Atrophie des rechten Hippocampus festgestellt. Darüber hinaus zeigte sich in PET Untersuchungen im Bereich der Amygdala sowie des Gyrus supramarginalis, welcher eine wichtige Rolle im Sprachlichen Lernen und Gedächtnis spielt, eine erhöhte Anreicherung an das Translocator Protein (TSPO), das auch als *Tryptophan-rich sensory protein* oder der periphere Benzodiazepin-Rezeptor bekannt ist. Bei TSPO handelt es sich um ein Protein der äußeren mitochondrialen Membran. Es wird in aktivierten Mikroglia hochreguliert (Chen and Guilarte 2008; Raghavendra Rao et al. 2000). TSPO gilt daher als zuverlässiger Marker für Neuroinflammation und Mikrogliaaktivierung (Boutin et al. 2007).

Diese Ergebnisse deuten auf einen Zusammenhang zwischen Inflammation und kognitiven Defiziten hin (Coughlin et al. 2015). Auch in dem in dieser Arbeit

verwendeten Tiermodell waren in früheren Experimenten unserer Arbeitsgruppe TSP0 Liganden 7 Tage nach SHT mit Iba1-positiven Mikroglia kolokalisiert (Israel et al. 2016). Dabei zeigte sich in dieser frühen Phase nach SHT sowohl eine morphologische Aktivierung der Mikroglia in der Immunhistochemie als auch eine erhöhte Anzahl.

Eine PET Studie bei Patienten mit einem 1-17 Jahre zurückliegenden mittelschweren bis schweren SHT ergab für die späte Phase nach SHT ebenfalls eine erhöhte Mikroglia Aktivierung innerhalb der subkortikalen Gehirnregionen. Im Bereich der ursprünglichen Läsion, war jedoch keine vermehrte Aktivierung nachweisbar (Ramlackhansingh et al. 2011). Auch zeigte sich kein Zusammenhang mit der Zeit, welche seit dem Trauma vergangen war. Dies suggeriert, dass SHT zu einer chronisch inflammatorischen Prozess führt, welcher noch Jahre nach dem initialen Trauma persistiert (LoBue et al. 2019).

1.3 Verhaltensänderungen und psychische Komorbidität

Ein erlittenes SHT führt sowohl kurz- als auch langfristig zu kognitiven Störungen, Beeinträchtigungen des Verhaltens bis hin zur Entwicklung psychiatrischer Erkrankungen. So zeigen sich bei betroffenen Patienten Aufmerksamkeitsdefizite, Gedächtnisbeeinträchtigungen und Störungen der Exekutivfunktion (Schimmel, Acosta, and Lozano 2017). Darüber hinaus treten vermehrt Persönlichkeitsveränderungen, Stimmungsschwankungen, übermäßige Gereiztheit und Aggressivität auf. Aber auch Angststörungen, Antriebsstörungen, Depression und posttraumatische Belastungsstörung sind häufig beobachtete Komorbiditäten (Riggio 2011; Tramontana et al. 2014; Acosta et al. 2013).

1.3.1 Neurobehavioral Sequelae

Diese Symptome nach einem SHT werden in der klinischen Arbeit unter dem Begriff der *Neurobehavioral Sequelae* (NBS) zusammengefasst, welcher synonym zu alternativen Begriffen wie dem *Postconcussive Syndrome* verwendet wird. Die *Task Force* der *World Health Organization* (WHO) zum Krankheitsbild des Schädel-Hirn Traumas definiert NBS als das Vorliegen von

mindestens drei der folgenden 8 Symptome: Kopfschmerz, Schwindel, Müdigkeit, Gereiztheit, Schlaflosigkeit, Konzentrationsschwierigkeiten, Beeinträchtigung des Gedächtnisses und Intoleranz gegenüber Stress (Carroll et al. 2004). Nahezu alle SHT Patienten berichten dabei in der akuten Phase über einzelne der oben genannten Symptome. Es wird davon ausgegangen, dass 30% bis 80% der Patienten mit leichtem bis mittelschwerem SHT NBS aufweisen, welche bis zu 3 Monate andauern können (Carroll et al. 2004). In ca. 15% der Patienten mit leichtem SHT kommt es jedoch zu einem Persistieren der Symptome (Riggio 2011).

1.3.2 Aufmerksamkeitsstörungen

Aufmerksamkeitsstörungen und Impulsivität stehen häufig im Vordergrund und können bei Kindern und Erwachsenen noch lange beobachtet werden. So zeigte eine Studie von Levin et al. bei Kindern einen Anstieg von Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätsstörung (ADHS) Diagnosen um 14,5% ein Jahr nach Trauma und einen Anstieg um 18,3% nach zwei Jahren (Levin et al. 2007). Dieser Zusammenhang aus SHT und sekundär auftretender ADHS Diagnose und konnte auch in weiteren Studien belegt werden (Yeates et al. 2005; Max et al. 2005a, 2005b). Als mögliche Auslöser dafür werden Verletzungen des Frontallappens, des Subkortikalen Systems und eine diffuse axonale Schädigungen diskutiert (Tramontana et al. 2014).

1.3.3 Langfristige psychiatrische Erkrankungen

Bei den langfristigen kognitiven und psychischen Komplikationen stehen Persönlichkeitsveränderungen, Depression und Angsterkrankungen sowie Psychosen im Vordergrund. Persönlichkeitsveränderungen stellen vor allem für Angehörige eine der belastenden Folgen dar. Gleichzeitig handelt es sich dabei um ein sehr häufig beobachtetes Phänomen, welches mit der besonderen Verwundbarkeit des orbitofrontalen Cortex und anterioren Temporallappen gegenüber SHT in Zusammenhang stehen könnte (Fleminger 2008).

In der akuten Phase nach SHT kann gelegentlich ein vorübergehendes wahnhaftes Erleben beobachtet werden. So berichten Patienten beispielsweise von Angehörigen-Besuchen, welche nie stattgefunden haben oder nehmen den

Zimmernachbarn als nahestehenden Angehörigen war. Dieses wahnhafte Erleben chronifiziert jedoch nur in einem geringen Prozentsatz. In dem meisten Fällen handelt es sich um ein vorübergehendes Phänomen. Bislang fehlen aber große epidemiologische Studien, um einen Zusammenhang von Schizophrenie und SHT eindeutig zu klären (Fleminger 2008).

Durch die starke Überlappung depressiver Symptome wie Antriebsminderung und apathisches Verhalten mit NBS gestaltet sich eine Diagnosestellung oftmals schwierig. Epidemiologische Untersuchungen schwanken daher zum Teil recht stark (Fleminger et al. 2003). So gehen manche Studien davon aus, dass 14% aller Patienten innerhalb eines Jahres nach Trauma die Kriterien für eine schwer Depression erfüllen (Deb et al. 1999). Während beispielsweise Jorge et al. die Größenordnung auf 20-30% aller Patienten angeben (Jorge et al. 2004; Fleminger 2008).

Eine generalisierte Angststörung zeigt sich bei ca. 10-15% der Patienten (Salazar et al. 2000). Sie ist häufig assoziiert mit Panikattacken und Agoraphobie. Darüber hinaus wird diskutiert, ob Angststörungen eine Chronifizierung von NBS Symptomen, wie Kopfschmerz, Konzentrationsstörung und Müdigkeit fördern (Fleminger 2008).

1.3.4 Erhöhtes Risiko für Demenzerkrankungen

Zwei bis fünf Jahre nach Trauma zeigt sich der Großteil der Patienten stabil und ein kleiner Anteil sogar Verbesserungen in der Funktionalität. Jedoch belegen jüngste Studien, dass bei manchen Patienten über einen längeren Zeitraum hinweg eine Verschlechterung des Outcomes auftritt. So zeigte sich in einem Follow-Up 18 Jahre nach Trauma, dass sich die Funktionalität von 32% aller Teilnehmer gemessen auf der *extended Glasgow Outcome Scale* (GOSE) verschlechtert hatte. Demgegenüber standen mit 18% nur halb so viele Patienten mit Verbesserungen der GOSE (Millar et al. 2003). Als mögliche Erklärungshypothese wurde erörtert, dass das schlechtere Outcome möglicherweise auf die Entwicklung von Demenzerkrankungen zurückzuführen sei (Fleminger 2008).

SHT konnte in verschiedenen retrospektiven Studien bereits als Risikofaktor für die Entwicklung kognitiver Defizite bis hin zu einer Demenz identifiziert werden (LoBue et al. 2019). So zeigte eine große schwedische Studie mit einer Fallzahl von 164.334 Patienten ein um den Faktor 2,0 erhöhtes Risiko für Patienten mit einem mittelschweren bis schweren SHT. Das Risiko war auch bei den Patienten erhöht, welche mit Geschwistern ohne SHT in der Vorgeschichte verglichen wurden. Das Risiko war dabei innerhalb des ersten Jahres nach Trauma mit einer *Odds Ratio* (OR) von 3,5 am höchsten, blieb jedoch mit einer OR von 1,5 auch noch 30 Jahre nach SHT signifikant erhöht (Nordström and Nordström 2018).

1.4 Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist eine funktionelle Charakterisierung des Schädel-Hirn Traumas sowie eine Beschreibung zellulärer Veränderungen drei Monate nach Trauma. Dazu wurde ein Neuro-Score erhoben und Verhaltenstestungen zur Evaluation kognitiver Leistungen wie Räumliches Lernen, kognitive Plastizität, Episodisches Gedächtnis, Angstverhalten und allgemeine Lokomotion durchgeführt. Außerdem erfolgten histologische Untersuchungen von axonaler Schädigung, Demyelinisierung und Neuroinflammation. Anschließend wurde eruiert, ob eine Korrelation von funktionalem Outcome und histologischen Veränderungen besteht.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 1: Verwendete Geräte und Verbrauchsmaterialien

Geräte/Verbrauchsmaterial	Hersteller
Biosphere Filter Tips	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Deckgläser	R. Langenbrinck (Emmendingen, Deutschland)
Isofluran-Verdampfer	Drägerwerk AG
Kamera Nikon Y-Tv55 (0,55xDigital Sight)	Nikon (Tokio, Japan)
Kamera SD 5 (WV-CP500)	Panasonic (Kadoma, Japan)
Kryostat CM 1950	Leica (Bensheim, Deutschland)
Mikroskop Nikon Phase Contrast 0.90 DRY	Nikon (Tokio, Japan)
Objektträger Super Frost Plus	R. Langenbrinck (Emmendingen, Deutschland)
Patafix Invisible transparent Glue Pads	Uhu (Bühl, Deutschland)
Pipetten 10µl, 200µl, 1000µl	Eppendorf (Hamburg, Deutschland), Gilson (Middleton, USA), Abimed Kinesis (Langenfeld, Deutschland)
Reaktionsgefäße (1,5ml, 2ml)	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Reaktionsgefäße (15ml, 50ml)	Greiner Bio-One (Kremsmünster, Österreich)
Sensi Care Ice Nitril Handschuhe	Medline Industries (Mundelein, USA)
Terralin	Schülke & Mayr (Norderstedt, Deutschland)
Tissue Tek Cryomold Standard	Sakura (Alphen am Rhein, Niederlande)
Vortex MX-S	Dragon Lab (Peking, China)
Waage	Sartorius (Göttingen, Deutschland)
Weight-drop Apparatur	Werkstatt Neurologische Klinik
ZetBox Hygienetücher	ZVG (Leopoldsdorf, Schweiz)

2.1.2 Verwendete Substanzen

Tabelle 2: Verwendete Substanzen

Substanz	Hersteller
Aluminiumkaliumsulfat-Dodecahydrat	Merck
<i>Bovine Serum Albumin (BSA)</i>	Sigma-Aldrich, A7906
<i>DAB Peroxidase Substrate Kit</i>	Vector Laboratories
Destilliertes Wasser	B. Braun Melsungen AG
Dinatriumhydrogenphosphat i	Merck
Essigsäure 100%	J.T. Baker
Ethanol 99,8%	Sigma Aldrich
Kaliumchlorid	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
Kaliumhexacyanidoferrat(II)	Merck
Kernechtrot	Merck
<i>Luxol Fast Blue</i>	ACROS Organics
Methanol 99,8%	Sigma Aldrich
Natriumchlorid	Sigma
Natriumcitratdihydrat	Merck
Natriumhydroxid	Sigma Aldrich
Normales Pferde Serum	Jackson ImmunoResearch Laboratories, 008-000-121
<i>PAP Pen</i>	Dako
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma
<i>Red Oil O</i>	Sigma Aldrich
Salzsäure	Sigma
Sucrose	Roth
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Merck
TritonX-100	Roth
<i>Ultra-Sensitive ABC Peroxidase Standard Staining Kit</i>	Thermo Scientific
<i>VECTASTAIN® ABC HRP Kit (Peroxidase, Standard)</i>	Vector Laboratories
<i>VECTASHIELD Mounting Medium with DAPI</i>	Vector Laboratories, H1200
Vitro-Clud	R. Langenbrinck
Wasserstoffperoxid 30%	Merck
Xylol	Merck
Zitronensäure	Sigma Aldrich

2.1.3 Verwendete Puffer und Lösungen

Alle Puffer wurden, soweit nicht anders dokumentiert in *Aqua dest.* frisch angesetzt.

4% PFA

4 % PFA
1 X Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)

Berliner Blau-Reaktionslösung

2 % $K_4[Fe(CN)_6]_2$
1 % HCL
Zu gleichen Teilen mischen

Red Oil O Stocksolution

0,5 G *Red Oil O*
0,1 L 100% Isopropanol

Citratpuffer

Stock Solution A

21,01 G Zitronensäure
1 L *Aqua dest.*

Stock Solution B

29,41 G Natriumcitratdihydrat
1 L *Aqua dest.*

Gebrauchslösung: 3ml A+ 17ml B, pH von 6 einstellen
1:10 mit *Aqua dest.* Verdünnen

Kernechtrot-Lösung

5 % $KAl(SO_4)_2$
0,1 % Kernechtrot

Luxol *Fast Blue*-Färbelösung

1 G *Luxol Fast Blue*
5 ml 10%ige Essigsäure
1 L 96%igen Ethanol

1 X PBS, pH 7,4

80,0 G NaCl
2,0 G KCl
11 G Na_2HPO_4
2 G KH_2PO_4
10 L *Aqua dest.*

Tris-buffered saline-Puffer (TBS)

6,05 G Tris

8,76 G NaCl

800 ml *Aqua dest.*

Mit 1 M HCl auf einen pH von 7,6 einstellen

Auf 1L mit *Aqua dest.* Auffüllen

2.1.4 Verwendete Software

Tabelle 3: Verwendete Software

Software	Hersteller
Adobe Photoshop CS2	Adobe
Etho Vision XT 10.1	Noldus
Excel 2013	Microsoft
GraphPad Prism	GraphPad Software
ImageJ 1.48v	National Institution of Health
NIS-Elements BR 4.00.05	Nikon
Word 2013	Microsoft
PowerPoint 2013	Microsoft

2.1.5 Verwendete Antikörper

2.1.5.1 Primärantikörper

Tabelle 4: Verwendete Primärantikörper

Antikörper	Verdünnung	Hersteller
Anti-CD19, Ratte, monoklonal	1: 200	Abcam Ab25232
Anti-Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP), Kaninchen, polyklonal	1: 1000	Abcam Ab7260
Anti-Iba1, Kaninchen, polyklonal	1: 5000	Wako 019-19741
Aufgereinigter <i>anti-Neurofilament H (NF-H), Nonphosphorylated</i> (früheres Covance Katalog# SMI-32P), Maus, monoklonal	1: 1000	BioLegend B224830

2.1.5.2 Sekundärantikörper

Tabelle 5: Verwendete Sekundärantikörper

Antikörper	Verdünnung	Hersteller
Biotinylierter Pferd Anti-Maus IgG	1: 100	Vector Laboratories BA 2000
Biotinylierter Ziege Anti-Kaninchen IgG	1: 200	Vector Laboratories BA 1000
Cy TM 3 AffiniPure Esel Anti-Ratte IgG (H+L)	1: 200	Jackson ImmunoResearch Laboratories

2.2 Methoden

2.2.1 Versuchstiere und Tierhaltung

In dieser Arbeit wurden 41 Mäuse eingesetzt. Die Versuchstiere waren ausschließlich männlich und 12 Wochen alt. Es wurden C57BL/6N-Mäuse (BL/6) verwendet, welche aus der Haltung von Charles River Laboratories (Sulzfeld) kamen. Alle Arbeiten wurden im Einklang mit national geltendem Recht und Ethikrichtlinien der Europäischen Union durchgeführt und im Vorfeld von der Kommission nach §15 TierSchG der Regierung von Unterfranken genehmigt (AZ 55.2.DMS2532-2-162). Die Tiere wurden artgerecht gehalten: Die Größe der Gruppen betrug drei bis neun Tiere und es wurde ein 12h/12h Hell/Dunkel-Zyklus eingehalten (Bundesgesetzblatt Jahrgang 2007; GV-SOLAS 20.03.2007 [abgerufen am 16.03.2020]). Zu jedem Zeitpunkt wurde den Tieren ein freier Zugang zu Futter und Wasser gewährleistet.

2.2.2 Zeitlicher Ablauf und *Drop-Outs*

Am 22.03.2016 erfolgte in der Maus Kohorte 1 mit 32 Mäusen die Setzung des Schädel-Hirn Traumas nach *Weight-Drop* Methode, beziehungsweise die Schein-Operation (Sham). Zu diesem Zeitraum waren alle Mäuse 12 Wochen alt. Die Testung des *Neurological Severity Scores* (NSS) wurde eine Stunde nach Trauma durchgeführt. Das *IntelliCage* Verhaltensexperiment begann am 11.04.2016, drei Wochen nach Trauma, und endete am 27.04.2016, fünf Wochen nach Trauma. Der *Open Field* Test wurde sechs Wochen nach Trauma am

02.05.2016 durchgeführt. Sieben Wochen nach Trauma, am 09.05.2016, erfolgte der *Elevated Plus Maze* Test. Die Mäuse wurden am 14.06.2016 und somit 12 Wochen nach Trauma getötet und mit 4% paraformaldehyd (PFA) in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) perfundiert. Zu diesem Zeitpunkt waren die Tiere 24 Wochen alt. Die extrahierten Gehirne wurde bei -80°C tiefgefroren. Sie wurden mit einem Mikrotom in 16µm geschnitten, auf Objektträger verteilt und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert. An diesen Schnitten wurden histologische Färbungen mit Berliner Blau, sowie immunhistochemische Färbungen mit anti-SMI 32, anti-Iba1 sowie anti-GFAP Antikörpern durchgeführt.

Kohorte 1 (n=32) hatte folgende *Drop-Outs* zu verzeichnen: Ein Tier musste nach Setzung des Traumas aufgrund der Schwere der Verletzung getötet und aus der Studie entfernt werden. Während der *IntelliCage* Testung mussten insgesamt vier Versuchstiere von diesem Versuch ausgeschlossen werden: Drei SHT-Tiere wurden aufgrund ihres aggressiven Verhaltens von der Gruppe getrennt und in Einzelkäfigen untergebracht. Sie konnten jedoch an den nachfolgenden Verhaltenstestungen wieder teilnehmen, welche keinen Aufenthalt in einer Gruppe mehr erforderten. Ein Schein-operiertes Tier musste aufgrund seines Ernährungszustandes gänzlich aus der Studie entfernt werden. Nach Tötung der verbliebenen 30 Mäuse, wurden 13 Gehirne für diese Arbeit aufgearbeitet.

Da ein Teil der histologischen und immunhistochemischen Färbungen nur im unperfundierten Hirngewebe möglich war, wurde bei einer zweiten Kohorte mit neun Mäusen am 12.06.17, ein Schädel-Hirn Trauma gesetzt beziehungsweise eine Schein-Operation durchgeführt. Auch diese Mäuse waren zum Zeitpunkt des Trauma 12 Wochen alt. Der NSS wurde eine Stunde nach Trauma erhoben. Am 04.09.17 wurde die zweite Kohorte getötet, jedoch ohne Perfusion mit PFA. Die Mäuse waren zu diesem Zeitpunkt 24 Wochen alt. Nach Extraktion wurden die Mäusegehirne bei -80°C weggefroren. Mit Hilfe eines Kryomikrotoms (Leica CM 1950) wurden sie auf 16µm dicke Scheiben geschnitten und auf Objektträger verteilt. Anschließend wurden sie bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert. An diesen Schnitten wurden histologische Färbungen mit Berliner Blau, *Red Oil O* und *Luxol Fast Blue* sowie eine immunhistochemische Färbung mit Anti-CD19 Antikörper durchgeführt.

Kohorte 2(n=9) hatte keine *Drop-outs* zu verzeichnen.

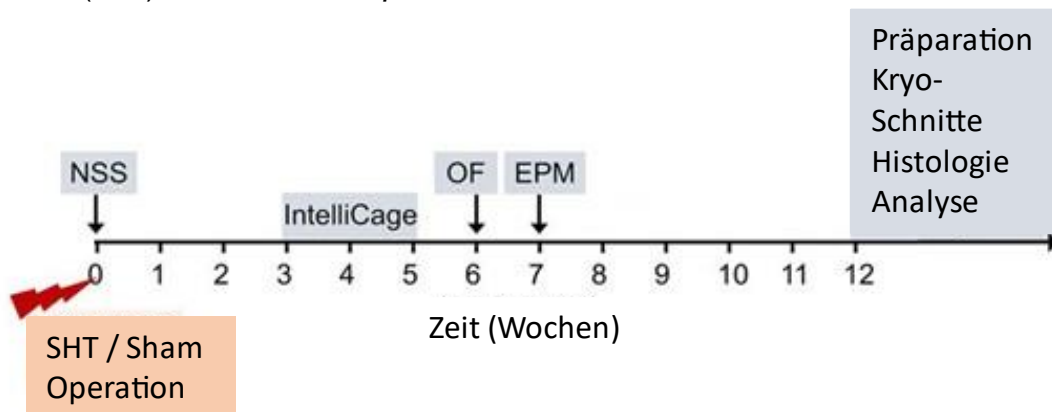


Abbildung 1: Zeitlicher Ablauf der durchgeführten Versuche an einem Zeitstrahl

SHT: Schädel-Hirn Trauma; NSS: *Neurological Severity Score*; OF: *Open Field*; EPM: *Elevated Plus Maze*;

Modifiziert nach Lopez-Caperuchi et al 2021. Eine Druckerlaubnis liegt vor.

2.2.3 *Weight-Drop Model*

Zur Simulation eines Schädel-Hirn Traumas wurde die *Weight-Drop* Methode verwendet. Dabei handelt es sich um eine etablierte Methode zur Nachahmung eines geschlossenen, diffusen Schädel-Hirn Traumas. Der Vorteil dieser Methode besteht in der realitätsnäheren Nachahmung des Traumageschehens ohne Kraniotomie gegenüber anderen etablierten Modellen wie beispielsweise der *Controlled-Cortical-Impact Injury* oder der Kryoläsion (Albert-Weissenberger and Sirén 2010; Xiong, Mahmood, and Chopp 2013). So können mit dieser Methode auch eine diffuse axonale Schädigung, sowie *Contre Cou* Verletzungen simuliert werden, welche typischerweise im Schädel-Hirn Trauma begleitend auftreten. Orientiert wurde sich dabei an dem von Albert-Weißenberger et al. modifizierten Modell nach Shohami (Albert-Weissenberger et al. 2012).

Die Versuchstiere erhielten eine Inhalationsnarkose mit 4% Isofluran. Anschließend wurden die Mäuse unter die *Weight-Drop* Apparatur gelegt (siehe Abb. 2). Die Narkose wurde mit einer Atemmaske aufrechterhalten, über welche ein Gasgemisch mit 1,5% Isofluran strömte. Die Überwachung einer hinreichenden Narkosetiefe erfolgte durch stetige Bestimmung der Atemfrequenz, Prüfung des Cornealreflexes und das Setzen eines Schmerzreizes an der Pfote. Anschließend wurde nach Rasur unter aseptischen Bedingungen die Kopfhaut longitudinal, medial inzidiert und die Schädelkalotte freigelegt. Zielort des Traumas war der rechte anteriore, frontale Bereich des

Schädels. Dazu wurde die Spitze des Kegels mittig zwischen Lambda und Bregma auf der rechten Seite platziert (siehe Abb. 2). Im nächsten Schritt wurde mit Hilfe der Apparatur ein Gewicht von 95g aus einer Höhe von 6cm fallen gelassen. Das Gewicht glitt entlang eines Führungsrohres und übertrug seine Kraft auf einen Zylinder, an welchem ein Kegel mit einem Spitzendurchmesser von 2 mm befestigt ist. Die Spitze ist dabei mit Silikon ummantelt, um das Risiko einer Schädelfraktur zu minimieren. Da es unmittelbar nach dem Trauma zu respiratorischer Insuffizienz kommen kann, wurden die Versuchstiere mit 100% O₂ beatmet. In der Schein-Operation (Sham) erfolgte unter gleicher Anästhesie lediglich die Inzision der Kopfhaut. Im nächsten Schritt wurde in beiden Gruppen die Schnittwunde mit chirurgischen Nahtmaterial (Ethilon 3-0) verschlossen. Darüber hinaus erfolgte eine lokalanästhetische Behandlung mit Lidocain-Salbe. In Kohorte 1 (n=32) wurden 18 Weight-Drop und 14 Sham-Operationen durchgeführt. Aufgrund einer zu starken und nicht mehr ethisch vertretbaren Symptomatik musste ein Versuchstier eine Stunde nach Trauma aus der Studie entfernt werden. In Kohorte 2 (n=9) wurden 5 Weight-Drop und 4 Sham-Operationen durchgeführt.



Abbildung 2: Weight-Drop Operation

(Links): schematische Zeichnung des *Weight-Drop* Apparates

(Rechts): Darstellung der anstreben Zielregion auf der rechten Hemisphäre mit Asterix

Aus Albert-Weissenberger et al., 2012, eine Druckerlaubnis liegt nach Bestimmungen von Creative Commons Attribution CC-BY 2.0, (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>) vor.

2.2.4 Verhaltenstestung

Die folgenden Verhaltenstestungen wurden jeweils an Maus Kohorte 1 durchgeführt. Eine Ausnahme stellt der NSS dar, welcher zur Evaluation der Stärke des Traumas in beiden Mauskohorten erhoben wurde.

2.2.4.1 *Neurological Severity Score*

Der *Neurological Severity Score* (NSS) ist ein etabliertes Testverfahren, um die Stärke des Schädel-Hirn Traumas zu quantifizieren ähnlich der *Glasgow Coma Scale*. Im Gegensatz zur GCS wird in diesem Score ein Punkt vergeben, wenn eine Aufgabe nicht erfüllt werden konnte. Bei Erfüllung aller Aufgaben wurde ein Score von 0 vergeben, bei Erfüllung keiner der Aufgaben ein Score von 10. Ein Score zwischen 0 und 3 wurde als leichtes, ein Score zwischen 4 und 7 als mittelschweres und ein Score zwischen 8 und 10 als schweres SHT klassifiziert (Flierl et al. 2009; Israel et al. 2016; Albert-Weissenberger et al. 2012). Die Vergabe der Punkte erfolgte erstmalig eine Stunde nach Trauma. Tiere, welche in der initialen Testung nach Trauma einen Score von größer 8 aufwiesen, wurden aufgrund der zu hohen Beeinträchtigung aus dem Experiment ausgeschlossen. Getestet wurden alle Tiere 1h nach SHT- und Sham-Operation.

Tabelle 6: *Neurological Severity Score* (NSS)

Aufgabe	Punkte (Erfolg/Misserfolg)
Verlassen einer Plattform innerhalb von 2min	(0/1)
Parese der Hinterläufe (Auftreten der Parese = 1 Punkt)	(0/1)
Geradeaus laufen	(0/1)
Reaktion auf akustischen Reiz	(0/1)
Explorierendes Verhalten	(0/1)
Balancieren auf einer senkrechten Stange für 10s	(0/1)
Festhalten an einer waagerechten Stange für 10s	(0/1)
Gehen über einen Balken, 3cm	(0/1)
Gehen über einen Balken, Breite 2cm	(0/1)
Gehen über einen Balken, Breite 1cm	(0/1)
	0/10

2.2.4.2 IntelliCage

Zur besseren Identifikation bekamen alle Versuchstiere subkutan einen sterilen 8,5mm langen und 1,2mm dicken ISO-Micro-Transponder zur Tieridentifikation 10 Tage vor dem SHT injiziert. Unter Isofluran-Narkose wurde der Chip mit einer Injektionspistole (TSE Bad Homburg) im Bereich des Nackens platziert.

Die *IntelliCage*-Apparatur besteht aus einem Haltungskäfig mit vier Plastikhäuschen, Einstreu, einem Käfigdeckel mit Futter und vier Konditionierungsecken (siehe Abb. 3). Darin können bis zu 16 Mäuse zeitgleich in einer Gruppe gehalten werden. Die Abmessungen des Käfigs betragen 20,5 x 55 x 38,5cm. Die Ecken sind mit Wärmesensoren ausgestattet, welche die Anwesenheit der Versuchstiere registrieren und über eine Transponderantenne die Identität des Tieres bestimmen. Zudem enthalten diese zwei *Nosepoke*-Sensoren, welche über eine Software mit zwei automatisch öffnenden und schließenden Türen gekoppelt sind (siehe Abb. 3). Die Türen steuern den Zugang zu jeweils zwei Trinkflaschen. In den jeweiligen Versuchsphasen wurden jedem Tier eine oder zwei bestimmte Ecken zugeordnet, zu der diese zu einer festen Uhrzeit Zugang zu Wasser oder einer Zuckerlösung erhielten. Der Zugang zu Trinkwasser war dabei auf 2 Stunden pro Tag beschränkt. Das Licht war über eine Zeitschaltuhr zwischen 07.00 und 19.00 Uhr eingeschaltet und sorgte für einen biphasischen Hell-Dunkel-Zyklus.

Der Versuchsaufbau gliederte sich in folgende Phasen:

1. Eine zweitägige **Eingewöhnungsphase**, unterteilt in „Akklimationierung“ (11.04.16, Tag 20 post Trauma (p.T.) und „*Nosepoke*-Training“ (12.04.16, Tag 21 p.T.)
2. Eine dreitägige Phase des **Räumlichen Lernens** (13.04-15.04.16, Tag 22-24 p.T.)
3. Eine zweitägige Phase des **Umlernens und der kognitiven Flexibilität** (16.04-17.04., Tag 25-26 p.T.)

4. Eine zehntägige Phase des **Episodischen Gedächtnisses**, unterteilt in Habituation (18.41-19.4, Tag 27-28 p.T.), „Was-Wann-Wo“ (20.4.-23.4.16, Tag 29-32 p.T.) und „Belohnungsentzug“ (24-27.4.16, Tag 33-36 p.T.)

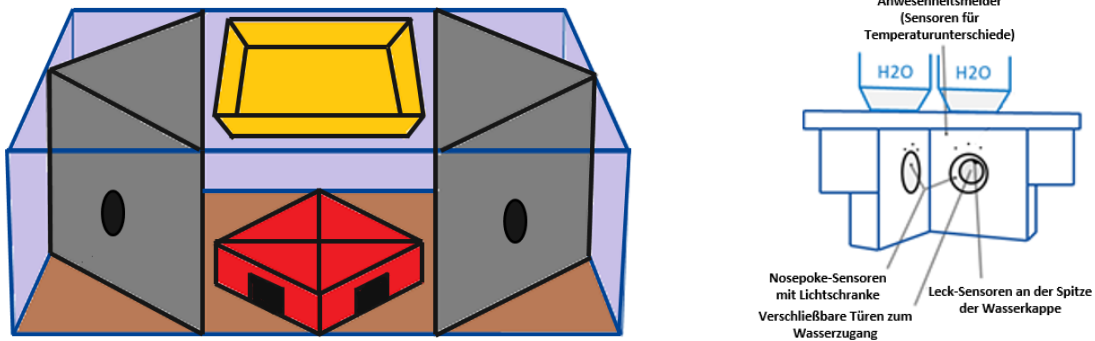


Abbildung 3: IntelliCage

(Links): Schematische Darstellung des Haltungskäfigs mit 4 Plastikhäuschen (rot), Einstreu (braun), einem Käfigdeckel mit Futter (gelb) und 4 Konditionierungsecken (grau).
 (Rechts): Schematische Darstellung einer Konditionierungsecke mit Anwesenheitsmelder, Nosepoke-Sensor, verschließbaren Türen, und Leck-Sensoren.

Eingewöhnung

Die Eingewöhnungsphase dauerte insgesamt zwei Tage und unterteilte sich in zwei Phasen. Ziel war es die Mäuse schrittweise in das Versuchssetting einzugewöhnen:

Tag 1 Akklimatisierung

In der Akklimatisierungsphase hatten die Tiere die Möglichkeit zu lernen, dass der Zugang zu Wasser über die vier Konditionierungsecken erfolgt. Alle Türen waren 24 Stunden lang geöffnet und zugänglich.

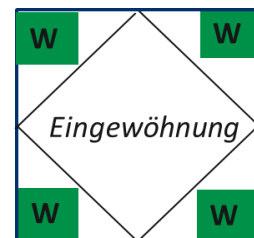


Abbildung 4: Versuchsaufbau Eingewöhnung
 Grün: für Mäuse zugängliche Ecken; W: Wasser.

Tag 2 Nosepoke-Training

Während des Nosepoke Trainings waren alle Türen geschlossen und nur nach einem Nosepoke, einem Stoß mit der Nase, zugänglich.

Räumliches Lernen

Das Ziel der dreitägigen Phase war die Untersuchung des Räumlichen Lernens. Dazu wurde jedem Versuchstier per Zufall eine Ecke zugewiesen, welche nur zwischen 19.00 und 21.00 Uhr zugänglich war. Während der dreitägigen Testphase war der Zugang zu den übrigen Ecken verwehrt. Gemessen wurde dabei die die Anzahl der Besuche und *Nosepokes* in der Zielecke im Vergleich zu den verbliebenen Ecken.

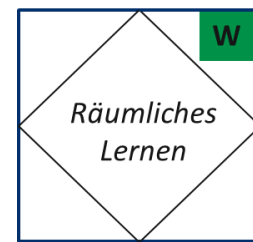


Abbildung 5:
Versuchsaufbau
Räumliches Lernen
Grün: für Mäuse
zugängliche Ecken; W:
Wasser.

Umlernen und Kognitive Flexibilität

Die Untersuchung der kognitiven Flexibilität und der Fähigkeit des Umlernens war Gegenstand dieser zweitägigen Testphase. Hierzu änderte sich die zugewiesene Wasserecke auf die diametral gegenüberliegende. Zugänglich war lediglich die neue zugewiesene Ecke und nur zwischen 19.00 und 21.00 Uhr.

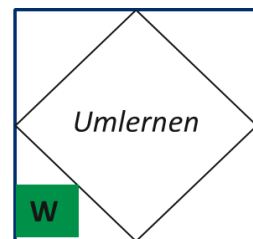


Abbildung 6:
Versuchsaufbau
Räumliches Lernen
Grün: für Mäuse
zugängliche Ecken; W:
Wasser.

Episodisches Gedächtnis

Das Episodische Gedächtnis war das Ziel dieser zehntägigen Untersuchungsphase, welche sich in 3 weitere Teile gliederte: Habituation, Was-Wann-Wo und Belohnungsentzug. Beim episodischen Gedächtnis handelt es sich um ein komplexes Gedächtnissystem, welches auf die Erinnerung spezifischer Ereignisse spezialisiert ist (Dere et al. 2008). Dabei untersuchten wir, wie weit die Versuchstiere in der Lage waren sich zu erinnern was sich ereignet hatte, wann es sich ereignet hatte und wo es sich ereignet hatte. Im Tiermodell der Maus werden diese Erinnerungen „*what-where-when memories*“ genannt.

Habituation

Als nächstes folgte eine zweitägige Habituationsphase: Jede Maus bekam zwei neue bisher ungenutzte Ecken zugewiesen, welche nun beide zugänglich waren, während die in den ersten beiden Phasen zugänglichen Ecken blockiert wurden. Zusätzlich änderte sich die Zeiten der Öffnungsphase von 19.00-21.00 Uhr auf 21.00-23.00 Uhr. An Tag 1 der Habituationsphase gab es in einer der Ecken eine Zuckerlösung (2% Saccharose in Wasser) zu trinken, wogegen es in der diametral gegenüberliegenden Ecke nur Wasser gab. An Tag 2 der Habituationsphase gab es an beiden Ecken nur noch Wasser zu trinken.



Abbildung 7:
Versuchsaufbau Habituation
Grün: für Mäuse zugängliche Ecken; W: Wasser; S: Zuckerlösung.

Was-Wann-Wo

In dieser Testphase wurden die beiden Konditionierungsecken, in welchen während der Habituationsphase Wasser erhältlich war, blockiert. Die Tiere konnten so über einen Zeitraum von 4 Tagen lernen, dass es in einer bestimmten Ecke (die zuvor blockiert war), es zu einer bestimmten Zeit (zwischen 19.00-21.00 Uhr statt, wie zuvor zwischen 21.00-23.00 Uhr) eine Zuckerlösung (2%) zu trinken gab, wogegen es in der diametral gegenüberliegenden Ecke (die bislang ebenfalls blockiert war) nur Wasser zu trinken gab. Die Tiere lernten also was (Zuckerwasser oder Wasser) es, wann (zwischen 19.00-21.00 Uhr) und wo (in welcher Ecke) zu trinken gab.

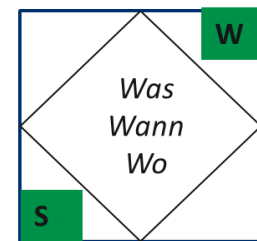


Abbildung 8:
Versuchsaufbau Was-Wann-Wo
Grün: für Mäuse zugängliche Ecken; W: Wasser; S: Zuckerlösung.

Belohnungsentzug

Nach der „Was-Wann-Wo“ Phase wurde die Zuckerlösung entfernt und durch Wasser ersetzt. In der viertägigen „Belohnungsentzug“ Phase wurde nun untersucht, ob sich eine Präferenz für die zuvor mit Zuckerlösung bestückte Ecke entwickelt hatte und weiterführend, wie schnell eine

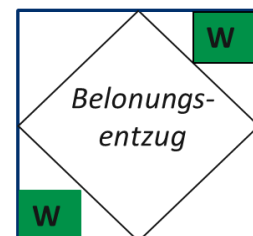


Abbildung 9:
Versuchsaufbau Belohnungsentzug
Grün: für Mäuse zugängliche Ecken; W: Wasser.

Abschwächung einer möglicherweise erworbenen Platzpräferenz stattfand.

2.2.4.3 *Open Field Test*

Der *Open Field Test* ist ein etablierter Verhaltenstest zur Bestimmung von Verhaltensweisen, Bewegungsmustern sowie der allgemeinen Aktivität (Crawley 1999). Der Versuchsaufbau erfolgte nach der von Crawley beschriebenen Standarddurchführung (Crawley 1999). Die Maus wird dabei in eine Arena in der Form eines nach oben geöffneten Quaders mit den Abmessungen 40cmx40cmx40cm gesetzt (siehe Abb. 10). Alle Flächen des Quaders sind weiß lackiert. Um Lichtunterschiede während des Experimentes zu vermeiden, wurde die Arena während des gesamten Zeitraumes ausgeleuchtet. Das Experiment wurde durch eine Kamera (Panasonic WV-CP500) in Vogelperspektive gefilmt. Die Aufzeichnungen wurden dabei direkt auf einen nahestehenden Computer übertragen. Der Testablauf zeigte sich wie folgend dargestellt: Die Tiere wurden einzeln in die Arena gesetzt. Die Aufnahme begann unverzüglich mit dem Absetzen des Tieres. Dies wurde mit Hilfe einer *Timer*-Funktion gewährleistet, um so Verzögerungen zu vermeiden. Die Länge des Versuchs betrug fünf Minuten. Anschließend wurde die Aufnahme gestoppt, das Versuchstier aus der Arena entfernt und wieder zurück in den Käfig gesetzt. Während des Versuchsablaufes wurde auf eine geräusch- und störungsfreie Kulisse geachtet. Um eine Beeinflussung der nachfolgenden Tiere zu vermeiden, wurde außerdem der Quader nach jeder Versuchsrunde mit 1%iger Essigsäure gereinigt. Die Auswertung des Versuches erfolgte dabei teilautomatisch mit Hilfe des Programmes EthoVisionXT 10.1 (Noldus). Das Programm misst die Parameter Geschwindigkeit und zurückgelegte Strecke.

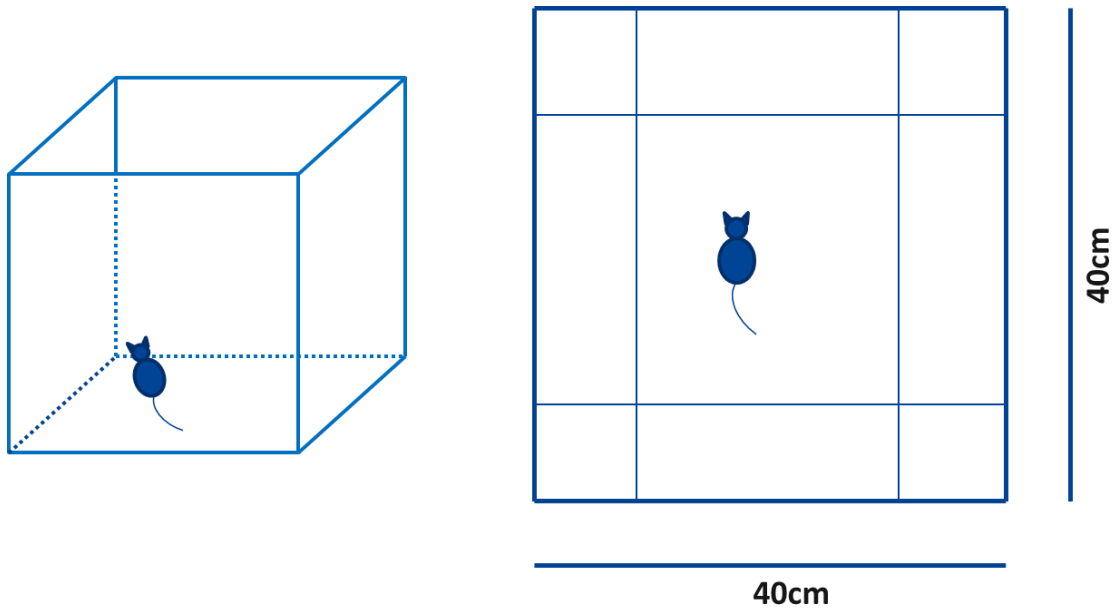


Abbildung 10: Schematische Darstellung des *Open Field Test*

Links: dreidimensionale Schematische Darstellung.

Rechts: schematische Darstellung aus Vogelperspektive mit Größenangaben.

2.2.4.4 *Elevated Plus Maze*

Beim *Elevated Plus Maze* handelt es sich um einen der am meisten genutzten Verhaltenstest für Angstverhalten. Dabei wird ein Versuchstier in ein plusförmig gestaltetes Testfeld mit zwei offenen und zwei geschlossenen Armen gesetzt (siehe Abb. 11). Hintergrund des Testes ist ein Vermeidungsverhalten von Mäusen gegenüber den offenen Versuchsarmlen, was auf eine allgemeine Angst vor offenen Räumen zurückgeführt wird (Korte and De Boer 2003).

Das Testfeld besteht aus rostfreiem Stahl. Die vier Arme haben eine Länge von 50cm und eine Breite von 10cm. Das Testfeld befindet sich in einer Höhe von 40cm. Die Arena wurde während der gesamten Testphase ausgeleuchtet, um Lichtunterschiede zu vermeiden. Eine Kamera (Panasonic WV-CP500) zeichnete den Versuch aus Vogelperspektive auf. Die Aufnahmen wurden direkt auf einen sich in der Nähe befindenden Computer übertragen. Der Versuchsablauf gestaltet sich wie folgt: Das Versuchstier wurde einzeln in die Mitte des *Elevated Plus Mazes* gesetzt. Anschließend begann unmittelbar die Aufzeichnung. Dieser nahtlose Ablauf ohne Verzögerungen wurde mittels einer *Timer* Funktion erreicht. Die Länge des Tests betrug fünf Minuten. Nach Ablauf der Zeit wurde die

Aufnahme gestoppt und die Maus aus dem Testgelände zurück in den Käfig gelegt. Während des gesamten Versuchsablaufes wurde stets auf eine geräusch- und störungsfreie Kulisse geachtet. Nach jedem Durchlauf wurde das Testgelände mit 1%iger Essigsäure gereinigt, um eine mögliche Beeinflussung nachfolgender Tiere zu vermeiden.

Ausgewertet wurde der Versuch mit Hilfe des Programmes EthoVisonXT 10.1 (Noldus). Dabei misst das Programm die Parameter Distanz, Geschwindigkeit, Zeit in offenem Arm, Zeit in geschlossenem Arm sowie die Frequenz des Wechsels zwischen offenen und geschlossenen Armen.

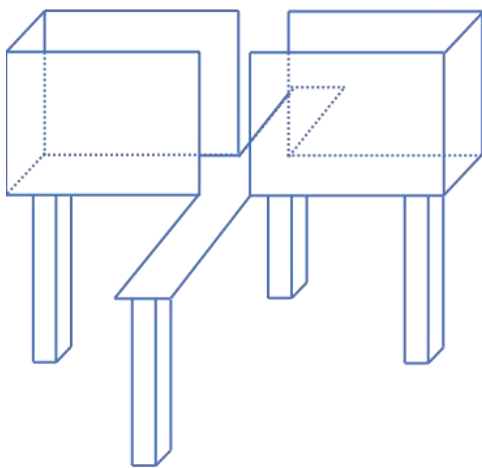


Abbildung 11: *Elevated Plus Maze*

(Links): Schematische Darstellung des *Elevated Plus Maze* mit zwei offenen und zwei geschlossenen Armen modifiziert nach Samueljohn.de (<https://commons.wikimedia.org/wiki/File:ElevatedPlusMaze.svg>). Eine Druckerlaubnis liegt nach Bestimmungen von Creative Commons Attribution-Share Alike 3.0 Unported (<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0/>) vor.

(Rechts): Beispielfoto des Versuchsaufbaus aus Kameraperspektive.

2.2.5 Präparation der Mäusegehirne

Am Versuchsende wurden die Mäuse durch eine tiefe und schließlich letale CO₂ Narkose getötet. Danach wurde die tote Maus auf den Rücken gelegt und an ihren vier Pfoten fixiert. Das Abdomen wurde längs mit einer Schere eröffnet und frei präpariert, um die Organe einsehen zu können. Das Mediastinum wurde mit zwei Schnitten entlang der Rippen eröffnet, sodass das Sternum nach oben geklappt und fixiert werden konnte. Im nächsten Schritt erfolgte die Eröffnung des

rechten Vorhofs mit einer chirurgischen Schere sowie das Einführen einer Kanüle in den linken Ventrikel. Über diese an einem Perfusor angeschlossenen Kanüle wurde der Kreislauf mit PBS mit Heparin (2ml Heparin in 1l 1x PBS vor dem Beginn der Perfusion) gespült. Nachdem das Blut nach zwei bis fünf Minuten ausreichend aus dem Organismus gespült worden war, was am Verblassen der Leber überprüft werden konnte, wurde der Perfusor auf eine 4%ige PFA Lösung umgestellt. Das Herausquellen der inneren Organe, Muskelkontraktionen der Extremitäten und des Schwanzes indizierten, dass eine ausreichende Konzentration erreicht wurde. Dieser Prozess dauerte im Schnitt 15 min.

Bei beiden Kohorten wurde anschließend das Gehirn freipräpariert. Hierzu wurde mit einer chirurgischen Schere der Kopf der Maus abgetrennt und anschließend der Schädel longitudinal eröffnet, was eine Extraktion des Gehirns ermöglichte. Die Mäusegehirne wurden in 4% PFA für 24 Stunden im Kühlschrank postfixiert. In einem nachfolgenden Schritt wurden die Gehirne mit 1x PBS gewaschen und in 30% Saccharose in 1X PBS im Kühlschrank gelagert. Wenn die Gehirne auf den Boden des Behältnisses abgesunken waren, wurden sie in Isopentan (=Methylbutan) über Trockeneis eingefroren und anschließend in einem -80°C Gefrierschrank aufbewahrt.

2.2.6 Kryoschnitte

Die tiefgefrorenen Mäusegehirne wurden mit einem Kryostat bei -30°C in 16µm dicke Scheiben geschnitten und auf einen Objektträger aufgebracht. Die Schnitte wurden bis zur weiteren histologischen und immunhistochemischen Verwendung bei -20°C gelagert.

2.2.7 Histologie und Immunhistochemie

2.2.7.1 Histologische Färbungen

Berliner Blau

Berliner Blau färbt über eine chemische Reaktion eisenhaltige Zellen blau an. Diese Eigenschaft fand Anwendung, um Siderophagen zu detektieren, also Makrophagen, welche eisenhaltige Partikel phagozytiert haben (Oehmichen et al. 1986).

Im ersten Schritt der Berliner Blau Färbung wurden die beiden Reaktionslösungen 1 und 2 hergestellt. Für Reaktionslösung 1 wurden 2% gelbes Blutlaugensalz (Kaliumhexacyanoferrat (II)) in *Aqua dest.* gelöst. Reaktionslösung 2 bestand aus 1% HCL in *Aqua dest.* Vor Durchführung der Färbung wurden dann Reaktionslösung 1 und 2 unter einem Abzug zu gleichen Teilen gemischt. Anschließend wurden die Schnitte für eine Stunde bei 37°C in die angesetzte Färbelösung gegeben. Danach wurden die Schnitte mit *Aqua dest* gespült. Im nächsten Schritt erfolgte eine Gegenfärbung mit Kernechtrot. Für die Kernechtrot Lösung, welche zwei Tage zuvor angesetzt worden war, wurden 5g Aluminiumkaliumsulfat in 100ml *Aqua dest.* gegeben und erhitzt. Darin wurden 0,1g Kernechtrot gelöst und die Lösung zum Erkalten abgestellt. Im Anschluss wurde die Lösung filtriert, für einen Tag ruhen gelassen und abermals filtriert. Die Schnitte wurden schließlich für 10 Minuten in die Kernechtlösung gegeben und danach mit *Aqua dest.* gespült. Im letzten Schritt wurden die Objektträger durch eine aufsteigende Alkoholreihe gezogen und mit Xylol und Vitro-Clud eingedeckt.

Red Oil O

Red Oil O ist ein fettlöslicher Farbstoff zum Anfärben von Triglyzeriden und Lipiden, welcher zum Nachweis von demyelinisierenden Prozessen eingesetzt wird. Abbauprodukte der Myelinscheiden werden dadurch erfasst, intaktes Myelin jedoch nicht. Zusammen mit Luxol *Fast Blue* wurde die Färbung als Nachweis einer stattgefundenen Demyelinisierung genutzt.

Im ersten Schritt der *Red Oil O* Färbung wurden 0,5g *Red Oil O* in 100% Isopropanol gegeben. Anschließend wurden die Schnitte in 4% PFA bei 4°C fixiert. Nach 15 Minuten wurden die Objektträger entfernt und zweimal 10 Minuten mit PBS gewaschen. In der Zwischenzeit wurde die *Red Oil O* Stocksolution in einem 6:4 Verhältnis mit *Aqua dest.* gemischt und anschließend 10 Minuten stehen gelassen. Im drauffolgenden Schnitt wurde die Lösung dreimal gefiltert. Nun wurden die Schnitte für 15 Minuten in die *Red Oil O* Lösung gegeben. Nach Ablauf der Zeit wurden die Objektträger erneut mit *Aqua dest.* gespült und schließlich eingedeckt.

Luxol *Fast Blue*

Als weiterer Marker für Demyelinisierung fand der Farbstoff Luxol *Fast Blue* Anwendung. Dieser färbt Myelin gleichmäßig blau an und ermöglicht über Verblässen der Farbintensität einen Rückschluss auf eine verminderte Dichte an Myelinscheiden.

Für die Luxol *Fast Blue* Färbelösung wurden 1g Luxol *Fast Blue* mit 5ml 10%ige Essigsäure in 1l 96%igen Ethanol vermischt. Die Schnitte wurden über Nacht in der Färbelösung bei 60°C inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden die Schnitte in 96% Ethanol gewaschen. Anschließend erfolgte ein weiterer Waschvorgang mit *Aqua dest.* Als nächstes fand eine Differenzierung mit Lithiumcarbonatlösung, 5g Lithiumcarbonat gelöst in 1l *Aqua dest.*, unter mikroskopischer Kontrolle statt. Im Anschluss wurde 70%ger Ethanol hinzugegeben und die Schnitte schließlich in *Aqua dest.* gewaschen. Danach wurden die Objektträger durch eine aufsteigende Alkoholreihe gezogen und mit Xylol und Vitro-Clud eingedeckt.

2.2.7.2 Immunhistochemische Färbungen

SMI 32

SMI 32 färbt beschädigte Axone an und wurde daher als Marker für axonalen Schaden genutzt. Bei SMI 32 handelt es sich um einen Antikörper gegen Neurofilament H, welches einen strukturellen Bestandteil von Axonen bildet (BioLegend 2020; UniProtKB/Swiss-Prot 2020c).

Für die histologische Färbung mit dem Antikörper SMI 32 (BioLegend) wurden die Schnitte zunächst aufgetaut. Im nächsten Schritt wurden die Schnitte dreimal in Citratpuffer aufgekocht. Nachdem die Schnitte wieder abgekühlt waren, wurden die Gehirnschnitte auf dem Objektträger mit einem *PAP Pen* (Dako) umrandet. Danach erfolgte ein zweimal 10-minütiger Waschvorgang in TBS Lösung. Im Anschluss wurden die Schnitte für 20 Minuten in Methanol mit 0,3% H₂O₂ gelegt und danach erneut zweimal 10 Minuten in TBS Lösung gewaschen. Im nächsten Schritt erfolgte das Auftragen einer Blocklösung mit 10% Normalem Pferde-Serum (NHS) und 0,2% Triton X in PBS. Nach einer Stunde wurde die

Lösung wieder abgekippt. Danach erfolgte das Auftragen des SMI 32 Antikörpers (BioLegend) in einer Konzentration von 1:1000 mit 2% NHS und 0,2% Triton X in PBS. Die Antikörperlösung wurde auf den Schnitten über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Antikörperlösung abgekippt und die Schnitte für zweimal 10 Minuten in TBS gewaschen. Anschließend erfolgte das Auftragen eines VECTASTAIN® ABC HRP Kits (Peroxidase, Standard; Vector Laboratories). Die Avidin Lösung wurde für 15 Minuten auf die Objektträger gegeben und danach zweimal für 7,5 Minuten in TBS gewaschen. Im Anschluss wurde die Biotin- Lösung für 15 min auf die Schnitte verteilt. Nach Ablauf der Zeit wurden die Objektträger für zweimal 10 Minuten in 1xTBS gewaschen. Als nächstes erfolgte das Auftragen des biotinylierten Sekundär-Antikörpers (Pferde anti-Maus, Vector Laboratories) in 1:100 Verdünnung mit 2,5% NHS in PBS. Nach 60 Minuten Inkubation in einer feuchten Kammer wurden die Schnitte erneut zweimal für 10 Minuten in TBS gewaschen. Anschließend erfolgte das Auftragen eines *Ultra-Sensitive ABC Peroxidase Standard Staining Kits* (Thermo Scientific) mit 1,8% Lösung A (specially purified Avidin) und 1,8% Lösung B (*specially-prepared Biotinylated Peroxidase*) in PBS, welches bereits 30 Minuten zuvor angesetzt worden war. Nach 30 Minuten wurden die Objektträger abermals für zweimal 10 Minuten in TBS gewaschen. Im letzten Schritt erfolgte eine Anfärbung mit Hilfe eines *DAB Peroxidase Substrate Kits* (Vector Laboratories), welche in 5ml destillierten Wasser 84µl Buffer Stock Solution, 100µl DAB Stock Solution sowie 80µl H₂O₂ enthält. Die Färbereaktion wurde nach sieben Minuten durch Spülen mit destilliertem Wasser gestoppt. Die Objektträger wurden im Anschluss durch eine aufsteigende Ethanol-Reihe gezogen und schließlich mit Xylol und Vitro-Clud (R. Langenbrinck) eingedeckt.

Iba1

Ionized calcium binding adaptor molecule 1 (Iba1) gehört zu einer Familie Calcium-bindender Proteine und wird spezifisch auf der Oberfläche von Makrophagen und Mikroglia exprimiert. Bei Aktivierung ist dieses Protein hochreguliert (Wako 2020; Imai et al. 1996).

Für die histologische Färbung mit dem anti-Iba1 Antikörper (Wako) wurden die Objektträger im ersten Schritt aufgetaut. Anschließend wurden die Schnitte in Citratpuffer (pH=7) dreimal aufgekocht und anschließend abgekühlt. Die Gehirnschnitte wurden auf dem Objektträger mit einem *PAP Pen* (Dako) umrandet. Im darauffolgenden Schritt wurden die Schnitte zweimal 10 Minuten in PBS gewaschen. Danach wurden die Objektträger für 20 Minuten in Methanol mit 0,3% H₂O₂ gelegt. Anschließend erfolgte erneut ein zweimal zehnteiliger Waschvorgang in PBS. Die Schnitte wurden im nächsten Schritt mit 10% NHS und 0,2% Triton X in PBS in Raumtemperatur geblockt. Nach einer Stunde wurde die Blocklösung abgekippt. Nun wurde der Primärantikörper anti-Iba1 (Wako) mit einer Verdünnung von 1:5000 in PBS mit 2% NHS und 0,5% Triton X aufgetragen und die Schnitte für zwei Tage in einer feuchten Kammer bei 4°C inkubiert. Nach Abkippen der Antikörperlösung wurden die Objektträger zweimal 10 Minuten in PBS gewaschen. Anschließend erfolgte das Auftragen des Sekundärantikörpers (Ziege Anti-Kaninchen, Vector Laboratories) 1:200 verdünnt in PBS mit 1,5% Normalem Pferde Serum, sowie eine einstündige Inkubation bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer. Danach wurde die Antikörperlösung abgekippt und die Schnitte zweimal 10 Minuten in PBS gewaschen. Anschließend wurde ein *Ultra-Sensitive ABC Peroxidase Standard Staining Kit* (Thermo Scientific) mit 1,8% Lösung A (specially purified Avidin) und 1,8% Lösung B (*specially-prepared Biotinylated Peroxidase*) in PBS aufgetragen, welches bereits 30 Minuten zuvor angesetzt worden war. Nach 30 Minuten wurden die Objektträger erneut zweimal 10 Minuten in PBS gewaschen. Im letzten Schritt erfolgte eine Anfärbung mit Hilfe eines *DAB Peroxidase Substrate Kits* (Vector Laboratories), welches in 5ml destilliertem Wasser 84µl Buffer Stock Solution, 100µl DAB Stock Solution sowie 80µl H₂O₂ enthält. Die Färbereaktion wurde nach sieben Minuten durch Spülen mit destilliertem Wasser gestoppt. Die Objektträger wurden im Anschluss durch eine aufsteigende Ethanolreihe gezogen und schließlich mit Xylol und Vitro-Clud (R. Langenbrinck) eingedeckt.

GFAP

GFAP ist ein Intermediärfilament und zellspezifischer Marker für Astrozyten (UniProtKB/Swiss-Prot 2020a). Für die histologische Färbung mit dem Anti-GFAP Antikörper wurden die Schnitte zunächst aufgetaut. Danach wurden sie dreimal in Citratpuffer (pH=7) aufgekocht und im Anschluss abgekühlt. Die Mäusegehirne wurden mit einem *PAP Pen* (Dako) umrandet und zweimal 10 Minuten in PBS gewaschen. Im nächsten Schritt erfolgte das Blocken mit 10% NHS und 0,2% Triton X in PBS. Nach einer Stunde wurde die Blocklösung abgekippt. Nun wurde der Primärantikörper anti-GFAP (Abcam) in einer Verdünnung von 1:1000 in 2% NHS und 0,2% Triton X in PBS aufgetragen und über Nacht in einer feuchten Kammer bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Antikörperlösung abgekippt und die Schnitte zweimal 10 Minuten in PBS gewaschen. Im Anschluss wurden die Objektträger für 30 Minuten in Methanol mit 0,3% H₂O₂ gestellt. Nach Ablauf der Zeit erfolgte erneut zweimal eine zehnminütige Waschung in PBS. Als nächstes wurde der Sekundärantikörper (Ziege Anti-Kaninchen, Vector Laboratories) in einer Verdünnung von 1: 200 mit 2,5 % NHS in PBS aufgetragen und für eine Stunde bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Danach wurden die Schnitte zweimal 10 Minuten mit PBS gewaschen. Im nächsten Schritt erfolgte das Auftragen eines *Ultra-Sensitive ABC Peroxidase Standard Staining Kits* (Thermo Scientific) mit 1,8% Lösung A (*specially purified Avidin*) und 1,8% Lösung B (*specially-prepared Biotinylated Peroxidase*) in PBS, welches bereits 30 Minuten zuvor angesetzt worden war. Nach 30 Minuten wurden die Objektträger erneut für zweimal 10 Minuten in PBS gewaschen. Im letzten Schritt erfolgte eine Anfärbung mit Hilfe eines *DAB Peroxidase Substrate Kits* (Vector Laboratories), welche in 5ml destilliertem Wasser 84µl Buffer Stock Solution, 100µl DAB Stock Solution sowie 80µl H₂O₂ enthält. Die Färbereaktion wurde nach sieben Minuten durch Spülen mit destilliertem Wasser gestoppt. Die Objektträger wurden anschließend durch eine aufsteigende Ethanolreihe gezogen und schließlich mit Xylol und Vitro-Clud (R. Langenbrinck) eingedeckt.

CD19

CD19 ist ein Protein der Zellmembran von B-Zellen, welches als Ko-Rezeptor des B-Zell Antigen Rezeptor Komplexes fungiert (UniProtKB/Swiss-Prot 2020b).

Für die Immunhistochemische Färbung mit dem anti-CD19 Antikörper wurden die Schnitte 10 Minuten bei -20°C mit Aceton fixiert. Anschließend wurden sie zum Trocken bei Raumlauft ausgelegt. Die Schnitte wurden mit einem *PAP Pen* umrandet und danach einmal für fünf Minuten in PBS gewaschen. Als nächstes wurden die Schnitte für eine Stunde mit 10% NHS und 0,2% Triton X in PBS geblockt. Im nächsten Schritt wurde die Blocklösung abgekippt, der Primärantikörper in einer Konzentration von 1:200 in 2% NHS und 0,2% Triton X in PBS aufgetragen und über Nacht in einer feuchten Kammer bei 4°C inkubiert. Am Folgetag erfolgte dreimal ein fünfminütiger Waschvorgang in PBS. Anschließend fand das Auftragen des Sekundärantikörpers Cy3 (Esel Anti-Ratte, Jackson ImmunoResearch Laboratories) in einer Konzentration von 1:200 mit 1% NHS in PBS und eine Inkubation von einer Stunde in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur statt. Im letzten Schritt wurden die Schnitte mit 0,025% Triton X gewaschen und schließlich mit VECTASHIELD Mounting Medium mit DAPI (Vector Laboratories) eingedeckt.

2.2.7.3 Neuroanatomische Zuordnung der Histologischen Schnitte

Um eine Vergleichbarkeit der einzelnen Schnitte bezüglich ihrer neuroanatomischen Zuordnung im Gehirn zu gewährleisten, wurde alle Schnitte mit dem *Allen Mouse Brain Atlas* verglichen und eine entsprechende Position zugewiesen (Allen Institute for Brain Science 2011). Der *Mouse Brain Atlas* enthält 132 Referenzfotos, wodurch Positionen zwischen 1 und 132 vergeben wurden.

2.2.7.4 Photographie, Zählungen und Bildbearbeitung

Die Aufnahmen der histologischen und immunhistochemischen Schnitte entstanden durch Fotografie der mikroskopischen Bilder mit einer *Digital Sight* Kamera (Nikon). Diese Fotos wurden anschließend mit dem Programm NIS-

Elements (Nikon) verarbeitet. Zählungen von Zellen erfolgten manuell mit Hilfe der Software ImageJ (NIH, USA). Zur erweiterten Bildbearbeitung wurde das Bildbearbeitungsprogramm Photoshop CS2 (Adobe) benutzt.

2.2.8 Statistische Auswertung

Die Auswertung erfolgte mithilfe des Statistikprogramms Graph Pad Prism. Dargestellt wurden die jeweiligen Mittelwerte mit dem Standardfehler des Mittelwertes. Nach Untersuchung auf Normalverteilung und Varianzgleichheit wurde der *Student's* T-Test für unabhängige Stichproben oder der Welch Test angewendet. Eine Ausnahme stellt die Auswertung der Histologischen Färbungen Berliner Blau, *Red Oil O* und Luxol *Fast Blue* dar. Hier wurde der *Fisher's Exact* Test verwendet. Bei Stichproben mit ungleicher Varianz fand der Welch-Test Anwendung. Für Vergleiche innerhalb derselben Gruppe mit unterschiedlichen Zeiträumen wurde ein gepaarter T-Test verwendet. Zur Ermittlung von Korrelation wurde der Korrelationskoeffizient nach Spearman, sowie Pearson berechnet. P-Werte kleiner 0,05 wurden als signifikant (*) erachtet. Zusätzlich wurde ein P-Wert kleiner 0,01 mit ** und ein P-Wert kleiner 0,001 mit *** gekennzeichnet.

3 Ergebnisse

3.1 Verhalten

3.1.1 NSS

Eine Stunde nach Trauma wurde der NSS erhoben, um die Stärke des gesetzten SHT zu quantifizieren.

In Kohorte 1 ergab sich bei den SHT-Tieren im Mittel ein *Score* von 5,4 bzw. im Median von 6, was einem mittelschweren SHT entspricht. Der niedrigste *Score* betrug 2, der höchste 8. Bei den Sham-Tieren der Kohorte 1 ergab sich im Mittel ein *Score* von 0,3 bzw. im Median von 0,0. Der niedrigste *Score* betrug 0, der höchste 1. Die SHT-Gruppe wies damit einen signifikant höheren NSS auf (NSS nach 1h: $0,2857 \pm ,1253$ in Sham gegenüber $5,412 \pm 0,5220$ in Trauma, $P < 0,0001$, Welch-Test Abb. 12).

Bei den zur histologischen Darstellung benutzten SHT-Tieren betrug der *Score* im Mittel 5,1 bzw. im Median 6. Der niedrigste *Score* betrug 2, der höchste 8. Bei den Sham-Tieren betrug der *Score* im Mittel und Median 0. Alle Tiere der Sham-Gruppe wiesen dabei einen *Score* von 0 auf.

In Kohorte 2 ergab sich ein mittlerer *Score* von 5,8 bzw. im Median von 6, was ebenfalls einem mittelschwerem SHT entspricht. Der niedrigste *Score* betrug in dieser Gruppe 5, der höchste 7. Bei den Sham-Tieren der Kohorte 2 ergab sich im Mittel und Median ein *Score* von 0. Alle Tiere der Sham-Gruppe wiesen dabei einen *Score* von 0 auf. Die SHT-Gruppe wies damit auch in Kohorte 2 einen signifikant höheren NSS auf (NSS nach 1h: $0,00 \pm 0,00$ in Sham gegenüber $5,800 \pm 0,3742$ in Trauma, $P = 0,0079$, *Fisher's Exact Test*, Abb. 12).

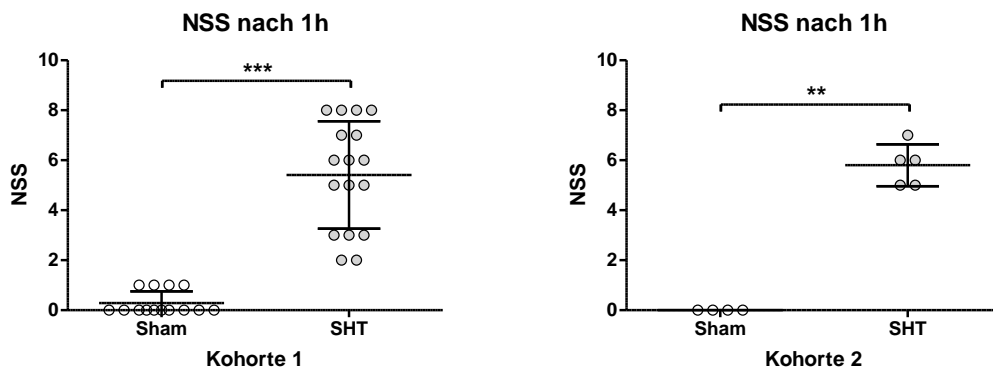


Abbildung 12: NSS nach 1h in Kohorte 1 und 2

(Links): Kohorte 1 Sham: n=14, SHT: n=17, *** $P < 0,001$; (Rechts): Kohorte 2 Sham: n=4, SHT: n=5, ** $P < 0,01$.

3.1.2 IntelliCage

Ausgewertet wurden folgende Parameter:

- „Richtige Besuche [%]“, also wie viel Prozent aller Besuche in Ecken erfolgten in der geöffneten Ecke
- „Nosepokes pro Besuch in geöffneter Ecke“, also wie viele *Nosepokes* ein Versuchstier bei einem Besuch in einer geöffneten Ecke durchschnittlich durchführte
- „Besuche in zuvor geöffneten Ecke [%]“, wie viel Prozent aller Besuche in Ecken erfolgten in der nun geschlossenen, aber in der Phase zuvor geöffneten Ecke
- „Nosepokes pro Besuch in zuvor geöffneten Ecke“, also wie viele *Nosepokes* ein Versuchstier bei einem Besuch in der nun geschlossenen, aber in der Phase zuvor geöffneten Ecke durchschnittlich durchführte
- „Besuche in Zucker-Ecke [%]“, wie viel Prozent aller Besuche in Ecken erfolgten in der mit Zuckerwasserlösung bestückten Ecke
- „Besuche in ehemaliger Zucker-Ecke [%]“, wie viel Prozent aller Besuche in Ecken erfolgten in der ehemaligen Zuckerecke, welche nun mit Wasser bestückt ist
- „Nosepokes pro Besuch“, also wie viele *Nosepokes* ein Versuchstier bei einem Besuch in der Ecke durchschnittlich durchführte

3.1.2.1 Räumliches Lernen

Ziel dieser Versuchsphase war es, räumliches Lernen zu analysieren und mögliche Unterschiede zwischen der Sham- und Trauma-Gruppe zu eruieren. Der Zeitraum von 20.00 bis 21.00 Uhr stand dabei im Fokus.

Als Parameter für räumliches Lernen diente uns „Richtige Besuche [%]“, sprich der Anteil der Besuche in der geöffneten Ecke von allen Besuchen. An Tag 1, 2 und 3 zeigte sich kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen („Richtige Besuche [%]“: an Tag 1: 52.76 ± 5.257 in Sham gegenüber 53.56 ± 4.677 in Trauma, $P=0,9104$; an Tag 2: $53,88 \pm 6,223$ in Sham gegenüber $60,28 \pm 2,877$ in Trauma, $P=0,3641$, Welch-Test; an Tag 3: $59,75 \pm 6,089$ in Sham gegenüber $72,66 \pm 3,326$ in Trauma, $P=0,0695$, Abb. 13).

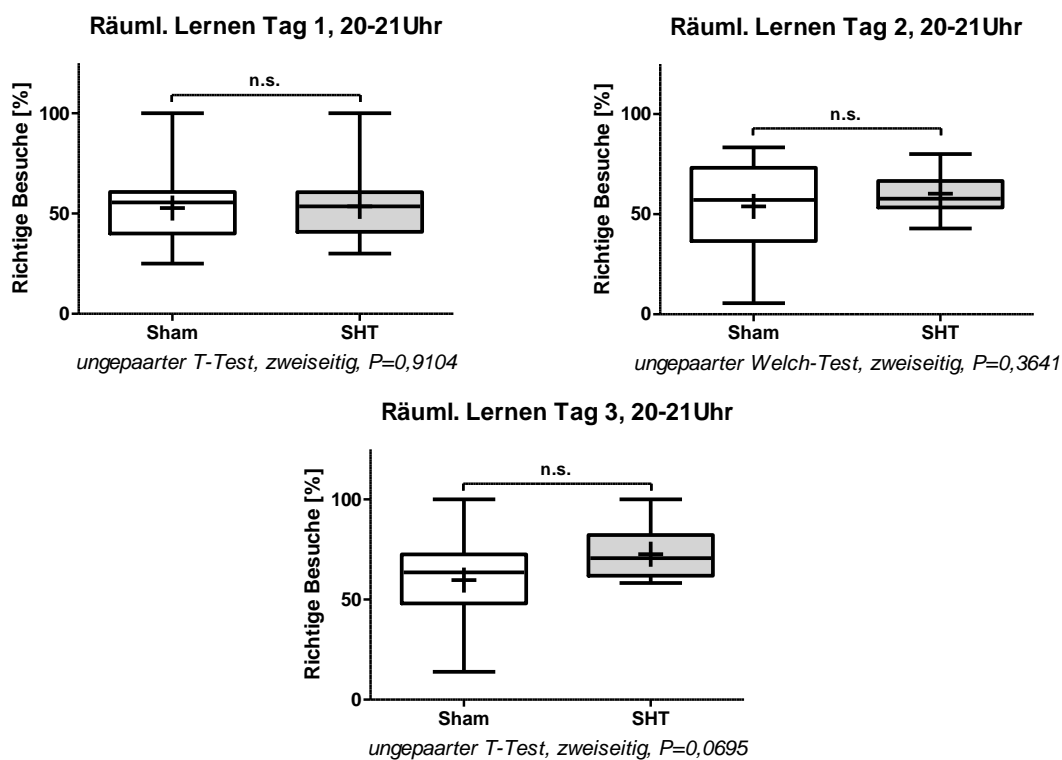


Abbildung 13: Richtige Besuche [%]: Vergleich Sham und SHT-Mäuse an Tag 1, Tag 2 und Tag 3 des Räumlichen Lernens

(oben links): Tag 1; (oben rechts): Tag 2; (unten): Tag 3; (Alle): Sham: $n=13$, SHT: $n=14$, n.s. nicht signifikant Graphische Darstellung als Box Plot (Horizontale Linien: Median, + Mittelwert, Boxen 25. und 75. Perzentile, Whiskers 10. und 90. Perzentile).

Als weiterer Parameter für Räumliches Lernen diente „Nosepokes pro Besuch in geöffneten Ecke“. Dort wurde erfasst wie viele *Nosepokes* ein Versuchstier bei einem Besuch in der geöffneten Ecke durchschnittlich durchführte. Um Zugang

zur Korrekten Ecke zu erlangen, war ein vorausgehender *Nosepoke* notwendig. Bei einem *Nosepoke* in einer nicht zugewiesenen Ecke erfolgte kein Zugang zur Wasserecke. Aus der Anzahl der *Nosepokes* bei einem Besuch leiteten wir die Erwartungshaltung des Tieres ab, dass sich die Türe nach der erforderlichen Aktion öffnet.

An Tag 2 des Räumlichen Lernens zeigte sich, dass die Trauma- gegenüber der Sham Gruppe signifikant weniger *Nosepokes* pro Besuch in der geöffneten Ecke ausführte (*Nosepokes* pro Besuch in geöffneten Ecke: an Tag 2: $2,868 \pm 0,4543$ in Sham gegenüber $1,815 \pm 0,1165$ in Trauma, $P=0,0427$, Welch-Test, Abb. 14).

An Tag 1 und 3 war ein ähnlicher Trend zu beobachten. Der Unterschied zwischen beiden Gruppen war allerdings nicht signifikant (*Nosepokes* pro Besuch in geöffneten Ecke: an Tag 1: $3,122 \pm 0,2894$ in Sham gegenüber $2,549 \pm 0,1852$ in Trauma, $P=0,1030$; Tag 3: $3,028 \pm 0,7198$ in Sham gegenüber $1,733 \pm 0,1821$ in Trauma, $P=0,1048$, Welch-Test, Abb. 14).

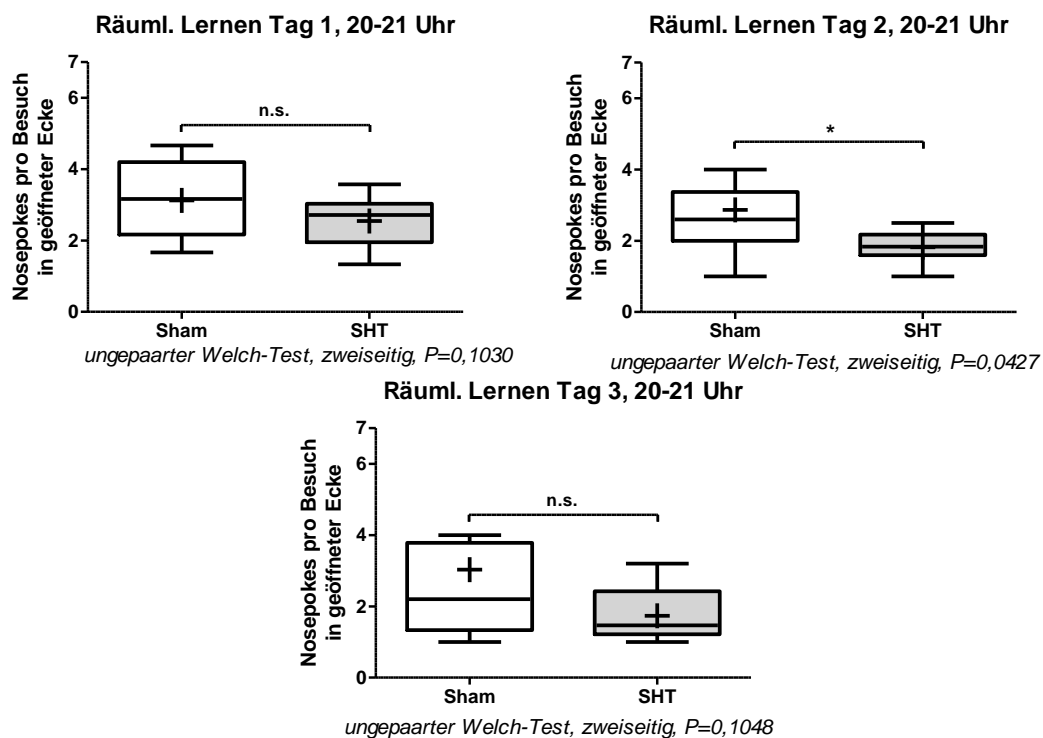


Abbildung 14: *Nosepokes* pro Besuch in geöffneten Ecke: Vergleich Sham und SHT-Mäuse an Tag 1, Tag 2 und Tag 3 des Räumlichen Lernens

(oben links): Tag 1; (oben rechts): Tag 2; (unten): Tag 3; (Alle): Sham: $n=13$, SHT: $n=14$, n.s. nicht signifikant, * $P<0,05$; Graphische Darstellung als Box Plot (Horizontale Linien: Median, + Mittelwert, Boxen 25. und 75. Perzentile, Whiskers 10. und 90. Perzentile).

Nachdem an Tag 2 ein Unterschied im Räumlichen Lernen entdeckt worden war, ergab sich die Fragestellung inwieweit die Stärke des Traumas mit den beobachteten Veränderungen zusammenhängt. Hierzu wurde die Korrelation zwischen NSS und „Nosepokes pro Besuch in geöffneter Ecke“ analysiert. Dabei zeigte sich eine signifikante negative Korrelation. Je größer somit die Stärke des Traumas war, umso weniger *Nosepokes* wurden für die geöffnete Ecke durchgeführt (Räumliches Lernen Tag 2: NSS und *Nosepokes* pro Besuch in geöffneter Ecke: Korrelationskoeffizient $r = -0,4055$, $P = 0,0358$, Spearman, Abb. 15).

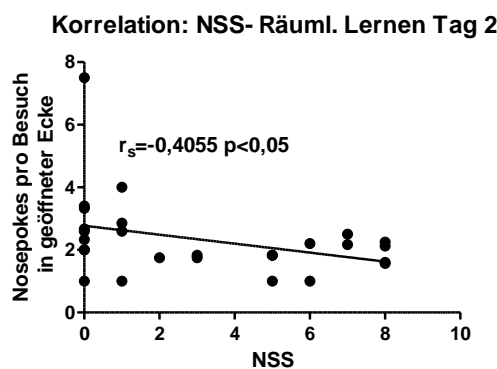


Abbildung 15: Räumliches Lernen Tag 2: Korrelation von Nosepokes pro Besuch in geöffneter Ecke und *Neurological Severity Score* (NSS)
 Sham: $n = 13$, SHT: $n = 14$; $r_s = \text{Spearman's rank Rho}$. Graphische Darstellung als Lineare Regression Analyse.

3.1.2.2 Umlernen und kognitive Flexibilität

Untersucht wurde in dieser Phase die Fähigkeit der Tiere sich auf eine neue Situation in einem veränderten Versuchssetting einzustellen und die erlernten Verhaltensweisen der ersten Versuchsphase auf eine neue Situation anzuwenden. Dazu wurden die Parameter „Besuche in zuvor geöffneter Ecke [%]“, der Anteil der Besuche in der ehemals geöffneten und nun geschlossenen Ecke an allen Besuchen, genutzt sowie der Parameter „Richtige Besuche [%]“. Außerdem wurde der Parameter „Nosepokes pro Besuch in geöffneter Ecke“ betrachtet. Analysiert wurde die Zeit zwischen 20.00 und 21.00 Uhr.

Dabei zeigte sich an Tag 1, dass die Traumtiere signifikant häufiger die ehemalige geöffnete Ecke besuchten (Besuche in zuvor geöffneter Ecke [%]):

Tag1: $21,03 \pm 2,928$ in Sham gegenüber $32,49 \pm 3,107$ in Trauma, $P=0,0130$. Dieser Effekt war an Tag 2 nicht mehr zu beobachten. Es zeigte sich kein Unterschied zwischen den Gruppen (Besuche in zuvor geöffneter Ecke [%]: Tag 2: $22,11 \pm 3,168$ in Sham gegenüber $21,33 \pm 2,677$ in Trauma, $P=0,8521$).

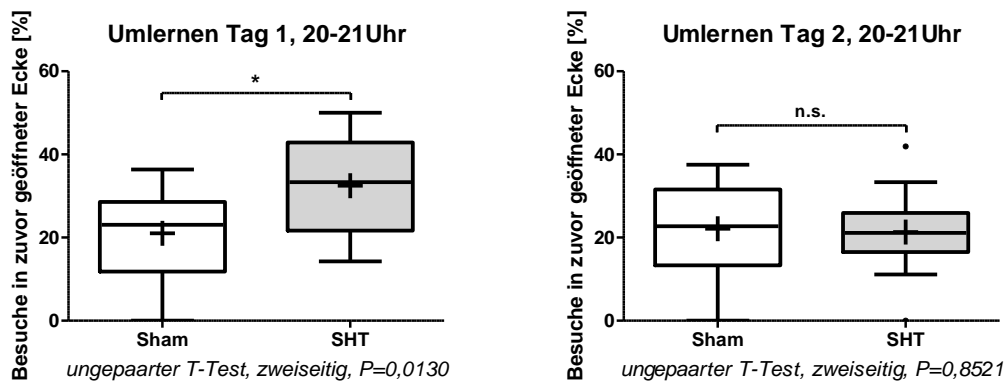


Abbildung 16: Besuche in zuvor geöffneter Ecke [%]: Vergleich Sham und SHT-Mäuse an Tag 1 und Tag 2 des Umlernens

(Links): Umlernen Tag 1; (Rechts): Umlernen Tag 2; (Beide): Sham: $n=13$, SHT: $n=14$, n.s. nicht signifikant, * $P<0,05$; Graphische Darstellung als Box Plot (Horizontale Linien: Median, + Mittelwert, Boxen 25. und 75. Perzentile, Whiskers 10. und 90. Perzentile).

Im Parameter „Richtige Besuche [%]“ konnte jedoch an keinem der beiden Tage ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen entdeckt werden (Richtige Besuche [%]: Tag 1: $46,07 \pm 4,050$ in Sham gegenüber $50,04 \pm 2,929$ in Trauma, $P=0,4294$; Tag 2: $47,11 \pm 6,318$ in Sham gegenüber $58,15 \pm 5,864$ in Trauma, $P=0,2112$).

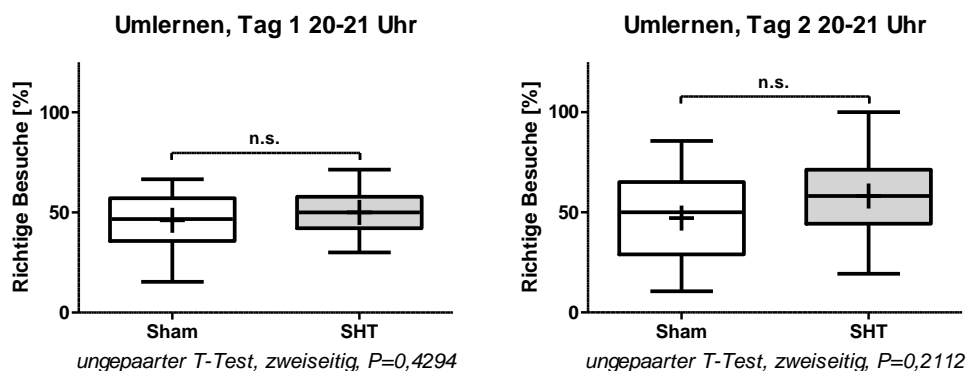


Abbildung 17: Richtige Besuche [%]: Vergleich Sham und SHT-Mäuse an Tag 1 und Tag 2 des Umlernens

(Links): Umlernen Tag 1; (Rechts): Umlernen Tag 2; (Beide): Sham: $n=13$, SHT: $n=14$, n.s. nicht signifikant; Graphische Darstellung als Box Plot (Horizontale Linien: Median, + Mittelwert, Boxen 25. und 75. Perzentile, Whiskers 10. und 90. Perzentile).

Für den Parameter „*Nosepokes* pro Besuch in geöffneter Ecke“ wiederum zeigte sich sowohl an Tag 1 und 2 des Umlernens ein signifikanter Unterschied. Dabei führte die Trauma- gegenüber der Sham-Gruppe signifikant weniger *Nosepokes* pro Besuch in der geöffneten Ecke aus (*Nosepokes* pro Besuch in geöffneter Ecke: an Tag 1: $3,274 \pm 0,4213$ in Sham gegenüber $2,037 \pm 0,3784$ in Trauma, $P=0,0390$, Welch-Test; an Tag 2: $4,304 \pm 0,6440$ in Sham gegenüber $2,587 \pm 0,4855$ in Trauma, $P=0,0447$, Welch-Test, Abb. 18).

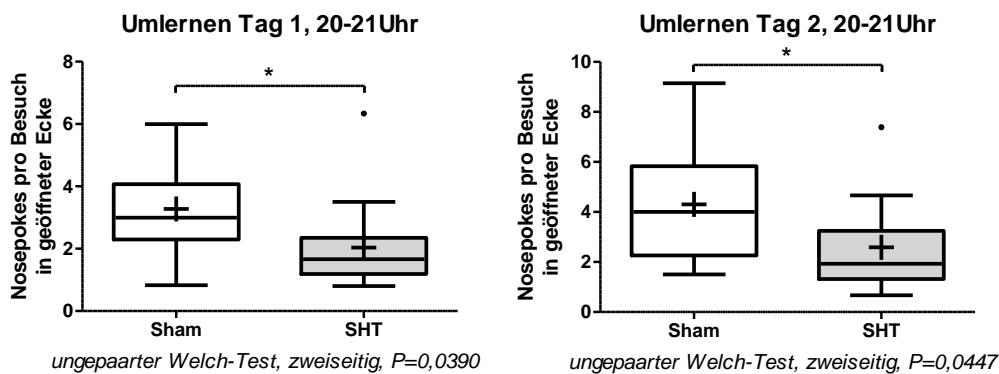


Abbildung 18: *Nosepokes* pro Besuch in geöffneter Ecke: Vergleich Sham und SHT-Mäuse an Tag 1 und Tag 2 des Umlernens

(Links): Umlernen Tag 1; (Rechts): Umlernen Tag 2; (Beide): Sham: $n=13$, SHT: $n=14$; * $P<0,05$; Graphische Darstellung als Box Plot (Horizontale Linien: Median, + Mittelwert, Boxen 25. und 75. Perzentile, Whiskers 10. und 90. Perzentile).

Nachdem zwischen den beiden Gruppen ein Unterschied im Umlernen entdeckt worden war, ergab sich die Fragestellung inwieweit die Stärke des Traumas mit den beobachteten Veränderungen zusammenhängt. Hierzu wurde für Tag 1 die Korrelation zwischen NSS und „Besuche in zuvor geöffneter Ecke [%]“ analysiert. Dabei zeigte sich eine positive Korrelation, welche jedoch knapp nicht mehr signifikant war. Je größer somit die Stärke des Traumas war, umso häufiger wurde die ehemalige Ecke besucht (Umlernen Tag 1: NSS und Besuche in zuvor geöffneter Ecke [%]: Korrelationskoeffizient $r = 0,3519$, $P=0,0718$, Spearman, Abb. 19). Ebenso wurde für Tag 1 und 2 die Korrelation zwischen NSS und „*Nosepokes* pro Besuch in geöffneter Ecke“ berechnet. Dabei ergab sich für beide Tage eine signifikante negative Korrelation. Je höher also die Stärke des Traumas war, umso weniger *Nosepokes* wurden für die geöffnete Ecke ausgeführt (Umlernen Tag 1: NSS und *Nosepokes* pro Besuch in geöffneter

Ecke: Korrelationskoeffizient $r = -0,4109$, $P = 0,0332$, Spearman; Umlernen Tag 2: Korrelationskoeffizient $r = -0,4763$, $P = 0,0120$, Spearman, Abb. 19).

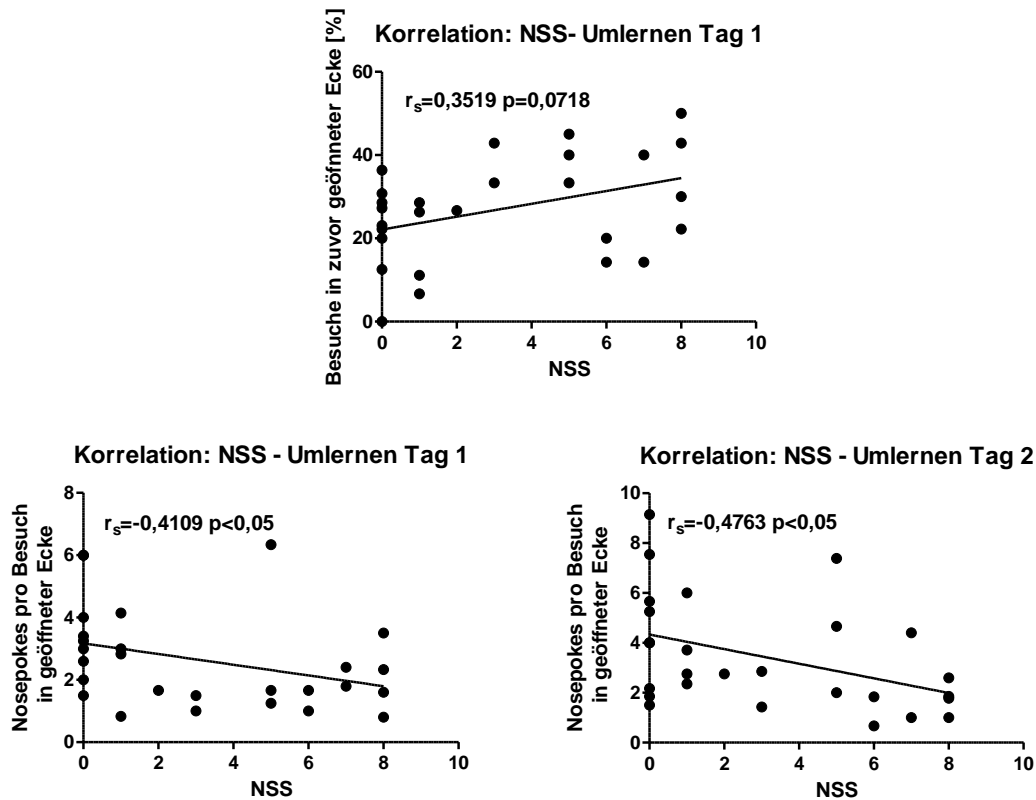


Abbildung 19: Umlernen Tag 1 und 2: Korrelation von *Neurological Severity Score* (NSS) mit „Besuche in zuvor geöffneter Ecke [%]“ und „Nosepokes pro Besuch in geöffneter Ecke“

(Oben): Umlernen Tag 1- Korrelation von Besuchen in zuvor geöffneter Ecke [%] und *Neurological Severity Score* (NSS); (Unten links): Umlernen Tag 1- *Nosepokes* pro Besuch in geöffneter Ecke und *Neurological Severity Score* (NSS); (Unten rechts): Umlernen Tag 2- *Nosepokes* pro Besuch in geöffneter Ecke und *Neurological Severity Score* (NSS); (Alle): Sham: $n = 13$, SHT: $n = 14$; $r_s =$ Spearman's rank *Rho*. Graphische Darstellung als Lineare Regression Analyse.

3.1.2.3 Episodisches Gedächtnis

Habituation

An Tag 1 dieser Phase wurde der Parameter „Besuche in Zucker-Ecke [%]“ untersucht. Während an Tag 2 der Parameter „Besuche in ehemaliger Zucker-Ecke [%]“ analysiert wurde. Ausgewertet wurde jeweils der Zeitraum 22-23 Uhr.

An Tag 1 konnten keine Unterschiede zwischen Sham- und SHT-Tieren beobachtet werden (Besuche in Zucker-Ecke [%]: Tag1: $64,57 \pm 6,422$ in Sham gegenüber $61,83 \pm 7,602$ in Trauma, $P=0,7873$).

Auch an Tag 2 ergaben sich keine Unterschiede im Besuchsverhalten der beiden Gruppen (Besuche in ehemaliger Zucker-Ecke [%]: Tag 2: $62,99 \pm 5,038$ in Sham gegenüber $54,30 \pm 5,546$ in Trauma, $P=0,2599$).

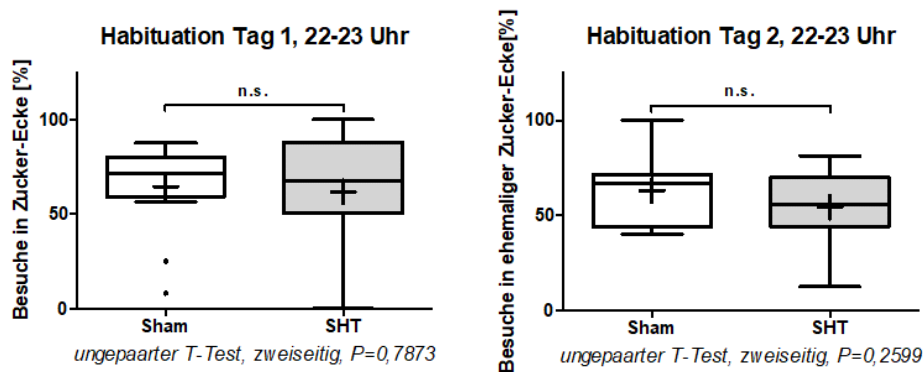


Abbildung 20: Habituation- Vergleich Sham und SHT-Mäuse an Tag 1 und Tag 2
 (Links): Vergleich Besuche in Zucker-Ecke [%] Habituation Tag 1; (Rechts): Vergleich Besuche in ehemaliger Zucker-Ecke [%] an Habituation Tag 2; (Alle): Sham: n=13, SHT: n=14, n.s. nicht signifikant; Graphische Darstellung als Box Plot (Horizontale Linien: Median, + Mittelwert, Boxen 25. und 75. Perzentile, Whiskers 10. und 90. Perzentile).

Was-Wann-Wo

In dieser Phase wurden der Parameter „Besuche in Zucker-Ecke [%]“ untersucht. Analysiert wurde der Zeitraum von 20-21 Uhr.

In den beiden Gruppen zeigten sich keine Unterschiede im Besuchsverhalten gegenüber der Zuckerecke (Besuche in Zucker-Ecke [%]: Tag1: $49,60 \pm 4,622$ in Sham gegenüber $52,45 \pm 6,097$ in Trauma, $P=0,7158$; Tag 2: $58,16 \pm 5,684$ in Sham gegenüber $60,20 \pm 2,818$ in Trauma, $P=0,7521$, Welch-Test; Tag 3: $68,50 \pm 4,140$ in Sham gegenüber $70,88 \pm 5,054$ in Trauma, $P=0,7210$; Tag 4: $58,97 \pm 8,784$ in Sham gegenüber $69,44 \pm 6,721$ in Trauma, $P=0,3486$, Abb. 21).

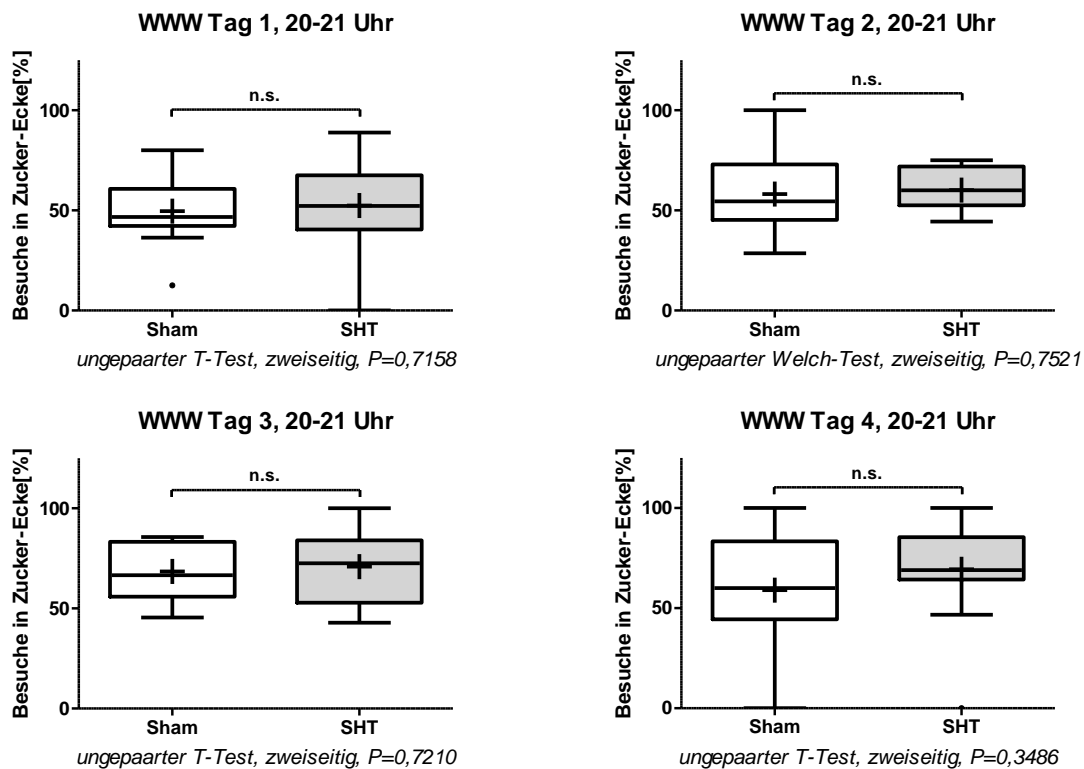


Abbildung 21: Besuche in Zucker-Ecke [%]: Vergleich von Sham und SHT-Tieren an Tag 1, Tag 2, Tag 3 und Tag 4 der Was-Wann-Wo (WWW) Phase

(Links oben): WWW Tag 1; (Rechts oben): WWW Tag 2; (Links unten): WWW Tag 3; (Rechts unten): WWW Tag 4; (Alle): Sham: $n=13$, SHT: $n=14$, n.s. nicht signifikant; Graphische Darstellung als Box Plot (Horizontale Linien: Median, + Mittelwert, Boxen 25. und 75. Perzentile, Whiskers 10. und 90. Perzentile).

Belohnungsentzug

Im Vordergrund der letzten Phase stand das Ersetzen der Zuckerwasserlösung durch eine Wasserlösung. Untersucht werden sollte, ob die Versuchstiere eine Bevorzugung zur ehemaligen Zuckerecke entwickelt hatten und wie lange diese angehalten hatte. Dafür wurden der Parameter „Besuche in ehemaliger Zucker-Ecke [%]“ verwendet. Analysiert wurde der Zeitraum von 20-21 Uhr.

An Tag 1, 2 und 3 konnten keine Unterschiede zwischen den Gruppen in ihrem Verhalten gegenüber der ehemaligen Zuckerwasserecke detektiert werden (Besuche in ehemaliger Zucker-Ecke [%]: Tag 1: $46,04 \pm 4,288$ in Sham gegenüber $44,66 \pm 5,343$ in TBI, $P=0,8445$; Tag 2: $39,91 \pm 5,376$ in Sham gegenüber $44,16 \pm 6,517$ in Trauma, $P=0,6229$; Tag 3: $41,46 \pm 7,298$ in Sham gegenüber $32,92 \pm 5,696$ in Trauma, $P=0,3614$).

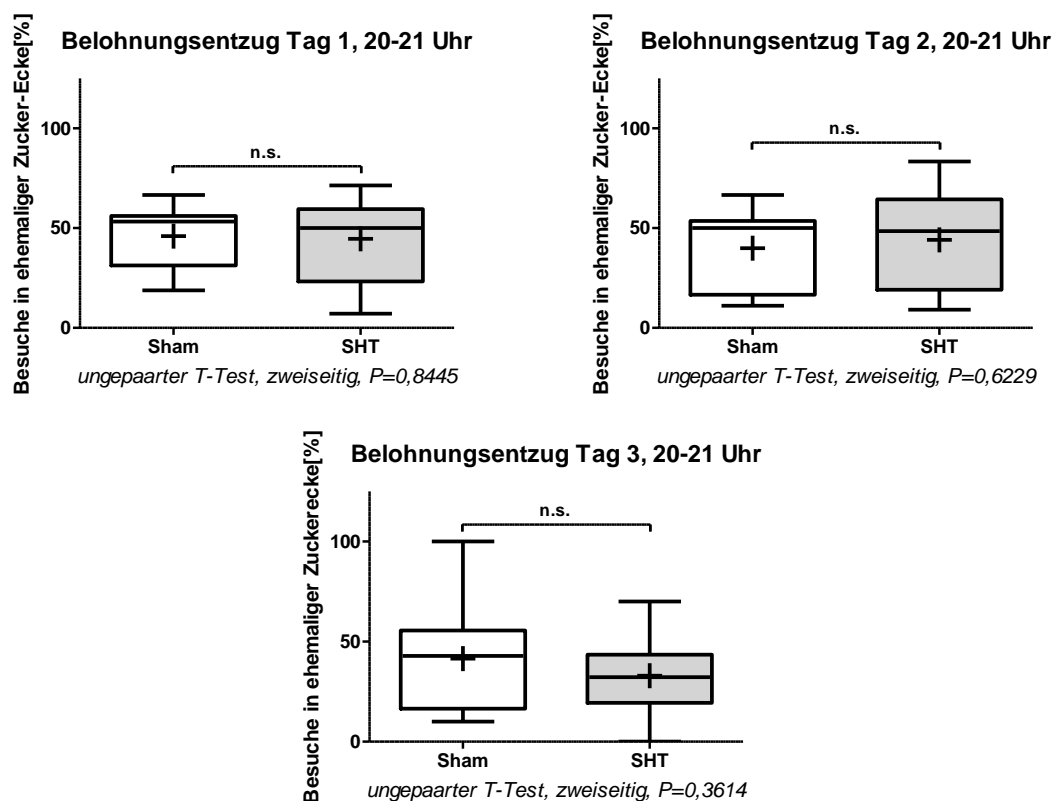


Abbildung 22: Besuche in ehemaliger Zucker-Ecke [%]: Vergleich von Sham und SHT-Tieren an Tag 1, Tag 2 und Tag 3 des Belohnungszuges

(Links oben): Tag 1; (Rechts oben): Tag 2; (Unten): Tag 3; (Alle): Sham: $n=13$, SHT: $n=14$, n.s. nicht signifikant; Graphische Darstellung als Box Plot (Horizontale Linien: Median, + Mittelwert, Boxen 25. und 75. Perzentile, Whiskers 10. und 90. Perzentile).

3.1.2.4 Nosepokes pro Besuch

Als weiterer Parameter wurde die Anzahl der *Nosepokes* pro Besuch gemessen. Um eine Öffnung der Tür zu erreichen, ist ein vorangehender *Nosepoke* nötig. Der Parameter wurde über alle Phasen gemessen.

An Tag 1 und 2 des Räumlichen Lernens zeigte sich, dass die Trauma gegenüber der Sham Gruppe signifikant weniger *Nosepokes* ausführte (*Nosepokes* pro Besuch: an Tag 1: $3,293 \pm 0,3620$ in Sham gegenüber $2,360 \pm 0,1480$ in Trauma, $P=0,0306$, Welch-Test; Tag 2: $2,774 \pm 0,3449$ in Sham gegenüber $1,691 \pm 0,1305$ in Trauma, $P=0,0102$, Welch-Test, Abb. 23). An Tag 3 zeichnete sich ein ähnlicher Trend ab, der knapp nicht mehr signifikant war

(*Nosepokes* pro Besuch: an Tag 3: $2,922 \pm 0,6505$ in Sham gegenüber $1,634 \pm 0,1386$ in Trauma, $P=0,0748$, Welch-Test, Abb. 23).

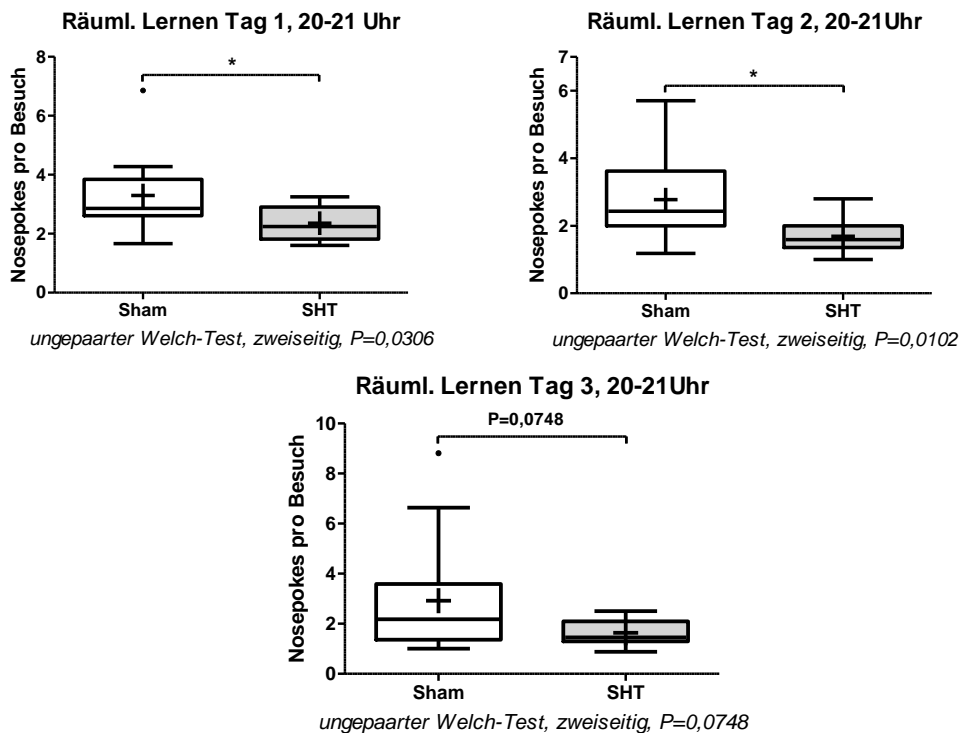


Abbildung 23: *Nosepokes* pro Besuch: Vergleich von Sham und SHT-Tieren an Tag 1, Tag 2 und Tag 3 des Räumlichen Lernens

(Links oben): Tag 1; (Rechts oben): Tag 2; (Unten): Tag 3; (Alle): Sham: $n=13$, SHT: $n=14$; * $P<0,05$; Graphische Darstellung als Box Plot (Horizontale Linien: Median, + Mittelwert, Boxen 25. und 75. Perzentile, Whiskers 10. und 90. Perzentile).

Auch in der zweiten Phase zeigte sich an Tag 1 ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen. Die SHT-Tiere führten gegenüber den Sham-Tieren signifikant weniger *Nosepokes* aus (*Nosepokes* pro Besuch: Tag 1: $3,052 \pm 0,3384$ in Sham gegenüber $2,129 \pm 0,2478$ in Trauma, $P=0,0355$). An Tag 2 war ein ähnlicher Trend zu beobachten. Der Unterschied zwischen beiden Gruppen war allerdings nicht signifikant (*Nosepokes* pro Besuch: Tag 2: $3,194 \pm 0,3584$ in Sham gegenüber $2,281 \pm 0,4293$ in Trauma, $P=0,1181$).

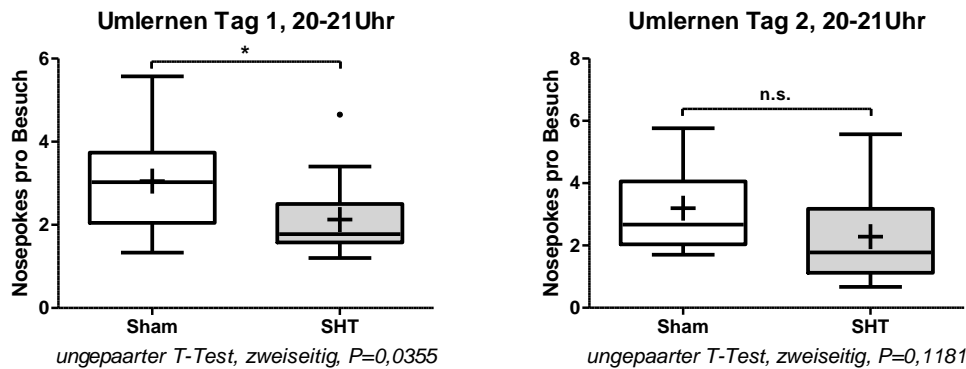


Abbildung 24: Nosepokes pro Besuch: Vergleich von Sham und SHT-Tieren an Tag 1 und Tag 2 des Umlernens

(Links): Tag 1; (Rechts): Tag 2; (Alle): Sham: $n=13$, SHT: $n=14$; n.s. nicht signifikant, $* P<0,05$; Graphische Darstellung als Box Plot (Horizontale Linien: Median, + Mittelwert, Boxen 25. und 75. Perzentile, Whiskers 10. und 90. Perzentile).

In den nachfolgenden Phasen Habituation, Was-Wann-Wo und Belohnungsentzug konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden (*Nosepokes pro Besuch*: Habituation-Tag 1: $2,236 \pm 0,2037$ in Sham gegenüber $2,278 \pm 0,1744$ in Trauma, $P=0,8774$; Habituation Tag 2: $2,590 \pm 0,1764$ in Sham gegenüber $2,203 \pm 0,1412$ in Trauma, $P=0,0965$, Abb. 25; Was-Wann-Wo Tag 1: $2,102 \pm 0,1855$ in Sham gegenüber $1,961 \pm 0,1630$ in Trauma, $P=0,5713$; Was-Wann-Wo Tag 2: $2,155 \pm 0,2098$ in Sham gegenüber $2,378 \pm 0,1423$ in Trauma, $P=0,3814$; Was-Wann-Wo Tag 3: $1,781 \pm 0,1608$ in Sham gegenüber $2,247 \pm 0,2735$ in Trauma, $P=0,1622$, Abb. 26; Belohnungsentzug Tag 1: $2,180 \pm 0,1855$ in Sham gegenüber $2,145 \pm 0,1818$ in Trauma, $P=0,8952$; Belohnungsentzug Tag 2: $3,133 \pm 0,8461$ in Sham gegenüber $2,010 \pm 0,1835$ in Trauma, $P=0,2172$, Welch-Test; Belohnungsentzug Tag 3: $2,236 \pm 0,2498$ in Sham gegenüber $1,909 \pm 0,2624$ in Trauma, $P=0,3767$, Abb. 27).

Lediglich an Tag 4 in der Was-Wann-Wo Phase zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen. Die SHT-Tiere führten, wie in den ersten beiden Phasen, gegenüber den Sham-Tieren weniger *Nosepokes* aus (*Nosepokes pro Besuch*: an Tag 4: $2,539 \pm 0,3530$ in Sham gegenüber $1,670 \pm 0,1535$ in Trauma, $P=0,0383$, Welch-Test, Abb. 26).

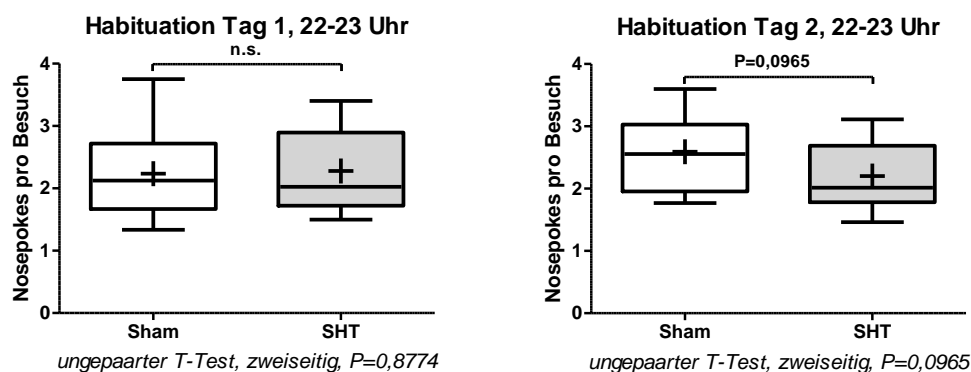


Abbildung 25: Nosepokes pro Besuch: Vergleich von Sham und SHT-Tieren an Tag 1 und Tag 2 der Habituation

(Links): Tag 1; (Rechts): Tag 2; (Alle): Sham: $n=13$, SHT: $n=14$; n.s. nicht signifikant; Graphische Darstellung als Box Plot (Horizontale Linien: Median, + Mittelwert, Boxen 25. und 75. Perzentile, Whiskers 10. und 90. Perzentile).

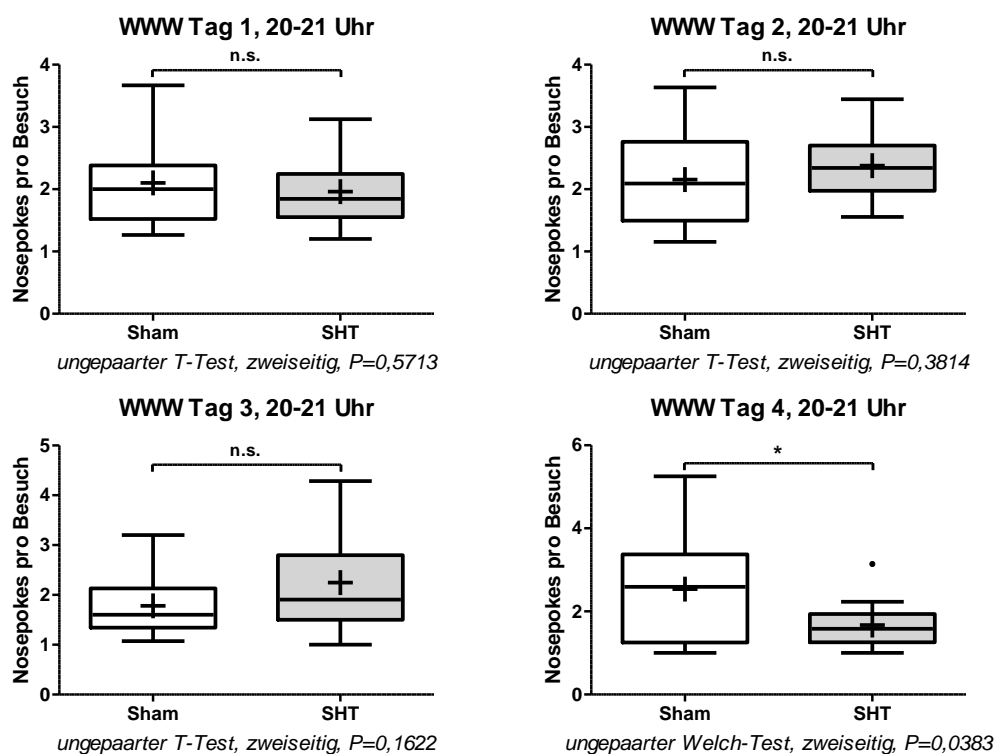


Abbildung 26: Nosepokes pro Besuch: Vergleich von Sham und SHT-Tieren an Tag 1, Tag 2, Tag 3 und Tag 4 der Was-Wann-Wo (WWW) Phase

(Links oben): WWW Tag 1; (Rechts oben): WWW Tag 2; (Links unten): WWW Tag 3; (Rechts unten): WWW Tag 4; (Alle): Sham: $n=13$, SHT: $n=14$, n.s. nicht signifikant; * $P<0,05$; Graphische Darstellung als Box Plot (Horizontale Linien: Median, + Mittelwert, Boxen 25. und 75. Perzentile, Whiskers 10. und 90. Perzentile).

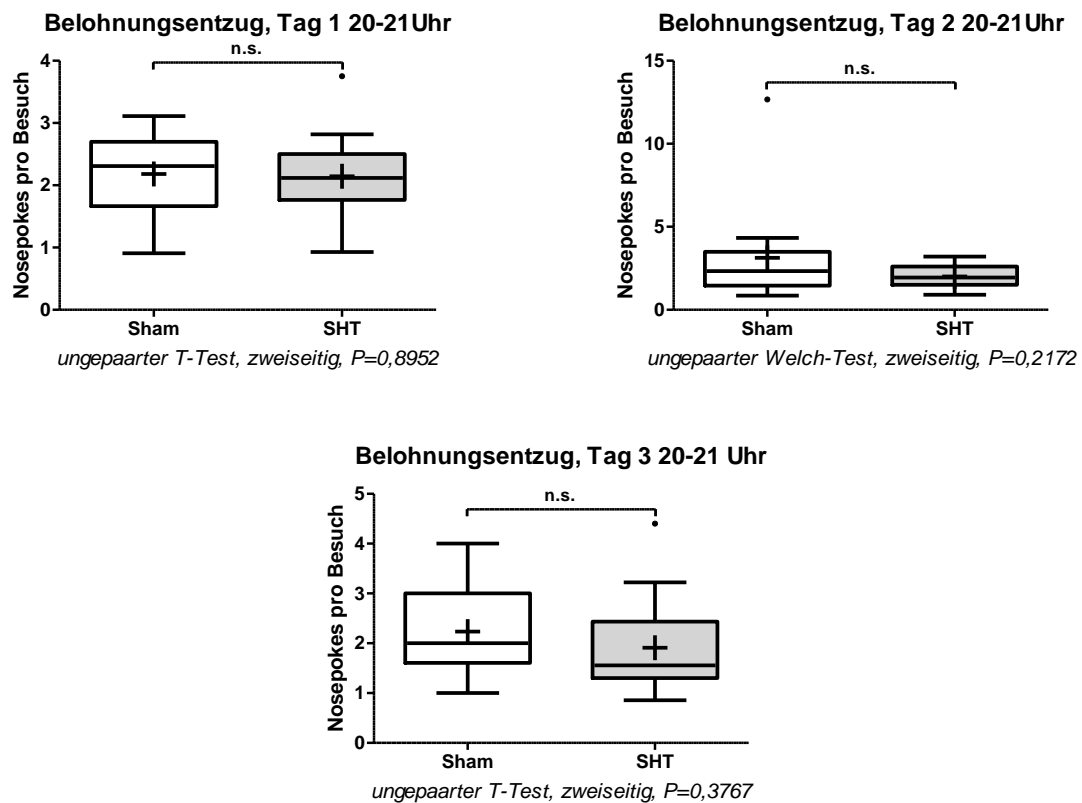


Abbildung 27: Nosepokes pro Besuch: Vergleich von Sham und SHT-Tieren an Tag 1, Tag 2 und Tag 3 des Belohnungsentzuges

(Links oben): Tag 1; (Rechts oben): Tag 2; (Unten): Tag 3; (Alle): Sham: $n=13$, SHT: $n=14$, n.s. nicht signifikant; Graphische Darstellung als Box Plot (Horizontale Linien: Median, + Mittelwert, Boxen 25. und 75. Perzentile, Whiskers 10. und 90. Perzentile).

Daraus ergibt sich die Fragestellung, wie dieser Unterschied in den durchgeführten *Nosepokes* zu interpretieren ist. Daher wird im Folgenden die Einbettung der *Nosepokes* in das Experiment noch einmal kurz erläutert:

Um an die Trinkflaschen in den Ecken des *IntelliCage* zu gelangen, mussten die Tiere einen *Nosepoke* ausführen. Die verschlossene Tür öffnete sich im Anschluss an einen *Nosepoke* nur, wenn das Versuchstier die ihr über den Transponder zugewiesene Ecke aufgesucht hatte. Bei einem Besuch in der korrekten Ecke öffnete sich also die Tür, während sie bei einem *Nosepoke* in einer der übrigen Ecken verschlossen blieb. Um eine Tür zu öffnen, ist somit theoretisch nur ein einziger *Nosepoke* nötig. Die Versuchstiere führten jedoch im Schnitt deutlich mehr *Nosepokes* aus.

Dieses Phänomen lässt sich mit Hilfe des Prinzips der Intermittierenden Verstärkung aus dem Bereich der Operanten Konditionierung erklären (Myers 2014): Die Intermittierende Verstärkung wird in variable und feste Quotenpläne untergliedert. Bei variablen Quotenplänen, wie beispielsweise Glücksspiel oder Angeln, erfolgt die Belohnung nach einer unvorhersehbaren Anzahl von Reaktionen, während bei festen Quotenplänen die Belohnung voraussehbar ist. Im direkten Vergleich von variablen und festen Quotenplänen führt eine variable Belohnung zu einer ausdauernderen Reaktion (Myers 2014). Wendet man dieses Konzept auf den Rahmen des *IntelliCage* an, stellt die Intermittierende Variable Verstärkung eine Erklärung für die erhöhte Anzahl der *Nosepokes* bei Sham-Tieren dar. In den anfänglichen Phasen „Räumliches Lernen“ und „Umlernen“ erfolgten 48,09% aller Besuch in geschlossenen Ecken. Fast jeder zweite Besuch stellte einen Fehlbesuch dar, bei welchem eine Belohnung ausblieb. Für die Tiere entstand so der subjektive Eindruck eines unregelmäßigen Verstärkungsplans, was zu einer Verstärkung der Reaktionen (*Nosepokes*) führte. In den späteren Phasen „Habituation“, „Was, Wann Wo“ und „Belohnungsentzug“ war der Anteil der Besuche in geschlossenen Ecken mit 28,46% signifikant geringer (Besuche in geschlossenen Ecken [%]: $48,09 \pm 3,695$ in „Räumliches Lernen“ und „Umlernen“ gegenüber $28,46 \pm 2,315$ in „Habituation“ und „Was, Wann, Wo“ sowie „Belohnungsentzug“, $P=0,0001$, gepaarter T-Test). In diesen Phasen waren die Tiere mit dem Setting besser vertraut und nahmen ein regelmäßiges Verstärkungsmuster wahr. Dies spiegelte sich auch in der Anzahl an *Nosepokes* wider, welche in diesen Phasen deutlich niedriger lag (*Nosepokes* pro Besuch: $3,047 \pm 0,2545$ in „Räumliches Lernen“ und „Umlernen“ gegenüber $2,328 \pm 0,1652$ in „Habituation“ und „Was, Wann, Wo“ sowie „Belohnungsentzug“, $P=0,0287$, gepaarter T-Test).

Bei den SHT-Tieren zeigte sich hingegen über alle Phasen verteilt eine nahezu konstante Anzahl an *Nosepokes* pro Besuch (*Nosepokes* pro Besuch: $2,179 \pm 0,1304$ in „Räumliches Lernen“ und „Umlernen“ gegenüber $2,144 \pm 0,09244$ in „Habituation“ und „Was, Wann, Wo“ sowie „Belohnungsentzug“, $P=0,8427$, gepaarter T-Test).

Dieser Zusammenhang aus Besuchen in geschlossenen Ecken und der Anzahl an *Nosepokes* pro Besuch wurde über alle Phasen hinweg sowohl für die Sham als auch für die SHT-Tiere näher analysiert. Dabei zeigte sich bei den Sham-Mäusen eine signifikante und stark positive Korrelation. Je höher also der Anteil an Fehlbesuchen war, umso höher fiel auch die Anzahl an *Nosepokes* pro Besuch aus (Besuche in geschlossenen Ecken [%] und *Nosepokes* pro Besuch: Korrelationskoeffizient $r=0,6521$, $P=0,0115$, Pearson, Abb. 29). Bei den SHT-Mäusen zeigte sich hingegen keine Korrelation (Besuche in geschlossenen Ecken [%] und *Nosepokes* pro Besuch: Korrelationskoeffizient $r=0,05503$, $P=0,8518$, Pearson, Abb. 29). Der ausbleibende Reaktionsanstieg in der SHT-Gruppe im Rahmen eines variablen Belohnungsmusters stellt somit ein abnormales Verhaltensmuster dar.

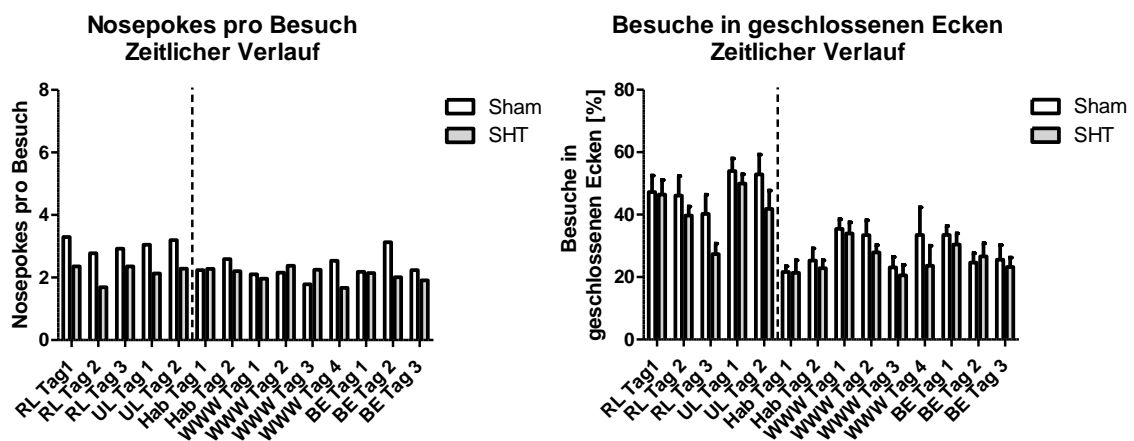


Abbildung 28: Zeitlicher Verlauf: *Nosepokes* pro Besuch und Besuche in geschlossenen Ecken

(Links): graphische Darstellung der *Nosepokes* pro Besuch über alle Phasen des *IntelliCage* für Sham- und SHT Gruppe als Balkendiagramm; (Rechts): graphische Darstellung der Besuche in geschlossenen Ecken [%] über alle Phasen des *IntelliCage* für Sham- und SHT Gruppe als Balkendiagramm; (Alle): gestrichelte Linie Übergang von einer zu zwei zugänglichen Konditionierungsecken; RL: Räumliches Lernen, UL: Umlernen, Hab: Habituation, WWW: Was-Wann-Wo, BE: Belohnungsentzug.

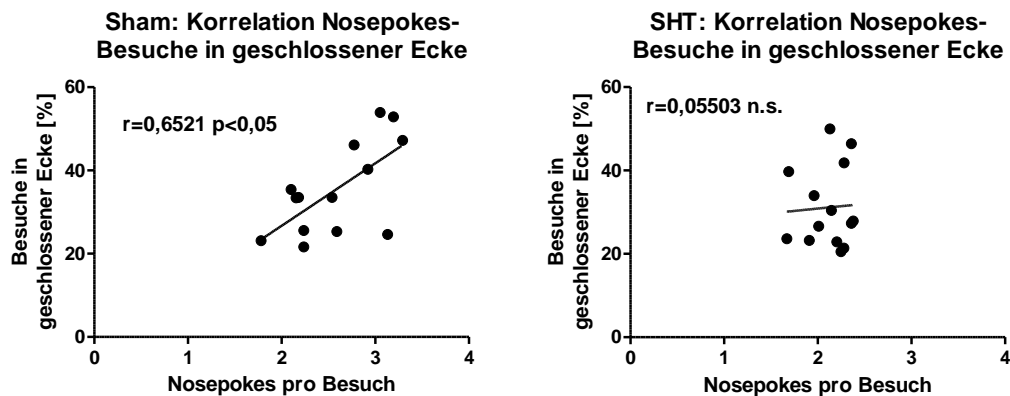


Abbildung 29: Nosepokes Pro Besuch mit Besuchen in geschlossener Ecke im Mittelwert über alle Phasen des IntelliCage für Sham- und SHT-Gruppe

(Links): Korrelation in der Sham-Gruppe von *Nosepokes* pro Besuch mit der Anzahl an Besuchen in der geschlossenen Ecke; (Rechts): Korrelation in der SHT-Gruppe von *Nosepokes* pro Besuch mit der Anzahl an Besuchen in der geschlossenen Ecke; (Alle): ● = Versuchstag im *IntelliCage* z.B. Räumliches Lernen Tag 1 mit Mittelwert der durchgeführten „Besuche in geschlossener Ecke [%]“ und „Nosepokes pro Besuch“ an diesem Tag, n=14; r= Korrelationskoeffizient nach Pearson. Graphische Darstellung als Lineare Regression Analyse.

Weitergehend wurde der Fragestellung nachgegangen, inwieweit die Stärke des Traumas mit diesen beobachteten Verhaltensweisen korreliert. Hierzu wurde die Korrelation zwischen NSS und Anzahl der *Nosepokes* pro Besuch analysiert. Dabei konnte an Tag 1 und Tag 3 des Räumlichen Lernens, sowie an Tag 1 des Umlernens der Trend einer schwachen negativen Korrelation beobachtet werden, welcher jedoch nicht signifikant war (Räumliches Lernen Tag 1: NSS und *Nosepokes* pro Besuch: Korrelationskoeffizient $r = -0,3159$, $P = 0,1085$, Spearman; Räumliches Lernen Tag 3: NSS und *Nosepokes* pro Besuch: Korrelationskoeffizient $r = -0,2977$, $P = 0,1315$, Spearman; Umlernen Tag 1: NSS und *Nosepokes* pro Besuch: Korrelationskoeffizient $r = -0,3284$, $P = 0,0945$, Spearman; Abb. 30).

An Tag 2 des Räumlichen Lernens und Tag 2 des Umlernens konnte jedoch eine signifikante negative Korrelation des NSS mit der Anzahl der *Nosepokes* pro Besuch beobachtet werden. Je höher also die Stärke des Traumas war, umso weniger *Nosepokes* wurden pro Besuch ausgeführt (Räumliches Lernen Tag 2: NSS und *Nosepokes* pro Besuch: Korrelationskoeffizient $r = -0,5164$, $P = 0,0058$, Spearman; Umlernen Tag 2: NSS und *Nosepokes* pro Besuch: Korrelationskoeffizient $r = -0,4751$, $P = 0,0123$, Spearman; Abb. 30).

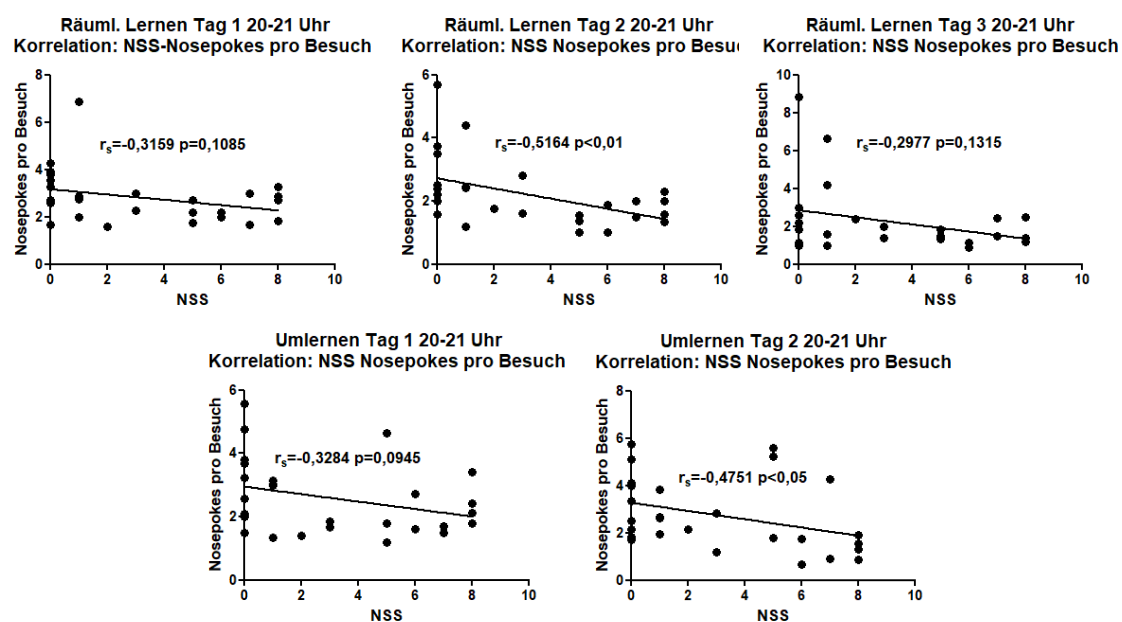


Abbildung 30: Korrelation *Nosepokes pro Besuch* und *Neurological Severity Score (NSS)* für Tag 1, 2 und 3 des räumlichen Lernens sowie Tag 1 und 2 des Umlernens
(Oben links): Räumliches Lernen Tag 1; (Oben mittig): Räumliches Lernen Tag 2; (Oben rechts): Räumliches Lernen Tag 3; (Unten links): Umlernen Tag 1; (Unten rechts): Umlernen Tag 2; (Alle): Sham: $n=13$, SHT: $n=14$; $r_s = Spearman's\ rank\ Rho$. Graphische Darstellung als Lineare Regression Analyse.

3.1.3 *Open Field*

Ziel des *Open Field* Test war es die allgemeine Lokomotion der Sham- und SHT-Tiere zu vergleichen. Analysiert wurden hierzu die Parameter zurückgelegte Strecke und Geschwindigkeit.

Zwischen den beiden Gruppen ließ sich ein signifikanter Unterschied nachweisen. Die Trauma-Gruppe legte eine größere Strecke bei einer höheren Geschwindigkeit zurück (zurückgelegte Strecke in cm: 966.0 ± 67.29 in Sham gegenüber 1200 ± 79.66 in TBI, $P=0,0399$; Geschwindigkeit in cm/s: 3.220 ± 0.2243 in Sham gegenüber 4.000 ± 0.2655 in TBI; Abb. 31). Damit zeigte sich in Woche 6 p. T. erstmals ein hyperaktives Verhaltensmuster der Trauma-Gruppe.

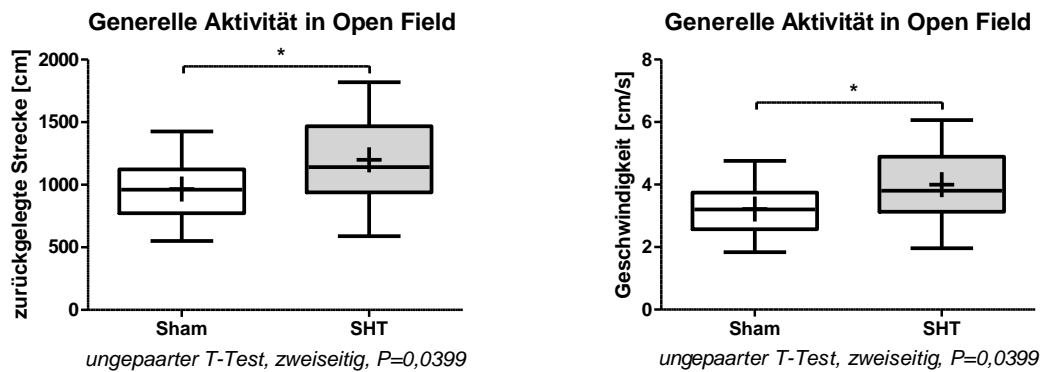


Abbildung 31: Open Field: Vergleich von Sham und SHT-Tieren

(Links): Vergleich der zurückgelegten Strecke in cm; (Rechts): Vergleich der Geschwindigkeit in cm/s; (Alle): Sham: n=13, SHT: n=17, * P<0,05; Graphische Darstellung als Box Plot (Horizontale Linien: Median, + Mittelwert, Boxen 25. und 75. Perzentile, Whiskers 10. und 90. Perzentile).

Im nächsten Schritt wurde untersucht, inwieweit dieses hyperaktive Verhaltensmuster mit der Stärke des Traumas korreliert. Hierzu wurden die beiden Parameter zurückgelegte Strecke und Geschwindigkeit zusammen mit dem NSS analysiert. Daraus ergab sich für beide Parameter eine signifikante positive Korrelation mit dem NSS. Je größer die Stärke des Traumas war, umso mehr neigten die Tiere zu hyperaktiven Verhaltensmustern (NSS und zurückgelegte Strecke in cm: Korrelationskoeffizient $r_s=0,4134$, $P=0,0232$, Spearman; NSS und Geschwindigkeit in cm/s: Korrelationskoeffizient $r_s=0,4134$, $P=0,0232$, Spearman; Abb. 32).

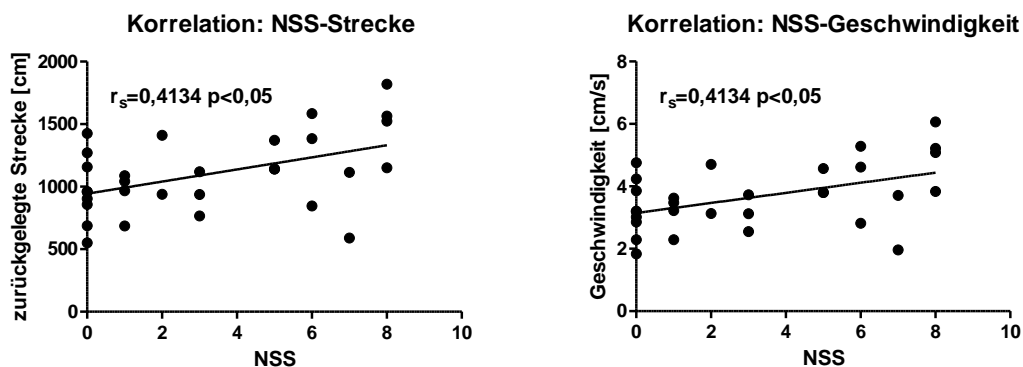


Abbildung 32: Open Field: Korrelation Hyperaktives Verhalten mit Neurological Severity Score (NSS)

(Links): Korrelation des NSS mit der zurückgelegten Strecke in cm; (Rechts): Korrelation des NSS mit der Geschwindigkeit in cm/s; (Alle): Sham: n=13, SHT: n=17; r_s = Spearman's rank Rho. Graphische Darstellung als Lineare Regression Analyse.

3.1.4 Elevated Plus Maze

Der *Elevated Plus Maze* Test wurde eingesetzt, um Unterschiede im Angstverhalten zwischen beiden Gruppen zu detektieren. Hierbei wurden die in den offenen Armen verbrachte Zeit, sowie die Häufigkeit, mit welcher die offenen Arme betreten wurden, gemessen und ins Verhältnis zur gesamten Zeit in allen Armen beziehungsweise das Betreten aller Arme gesetzt.

Zwischen der Sham und der Trauma Gruppe zeigte sich kein signifikanter Unterschied im Angstverhalten in beiden Parametern (Zeit in offenen Armen/insgesamte Zeit in %: $10,24 \pm 2,726$ in Sham gegenüber $8,737 \pm 1,855$ in Trauma, $P=0,6405$; Betreten offener Arme/ Betreten aller Arme in %: $36,03 \pm 2,877$ in Sham-Tieren gegenüber $37,28 \pm 2,983$ in Trauma, $P=0,7699$; Abb. 33). Beide Gruppen zeigten also das gleiche Vermeidungsverhalten gegenüber den offenen Armen.

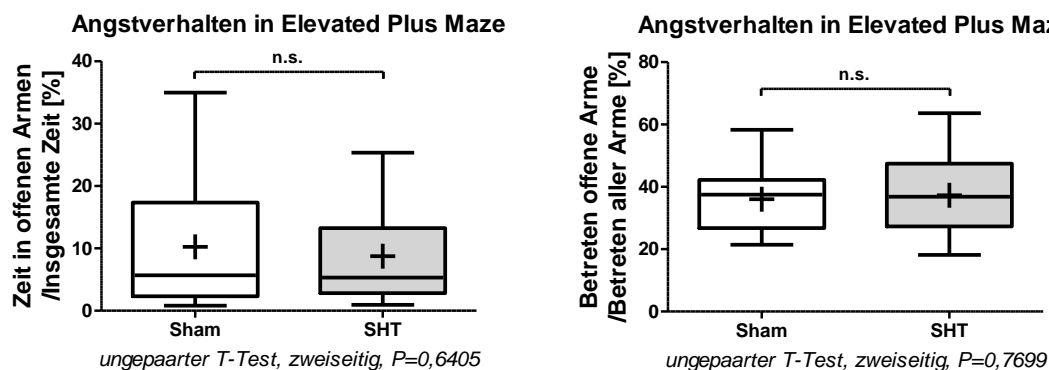


Abbildung 33: *Elevated Plus Maze*: Vergleich von Sham und SHT-Tieren

(Links): Vergleich der in offenen Armen verbrachten Zeit anteilig an der insgesamten Zeit in %; Rechts): Vergleich des Betretens offener Arme anteilig am Betreten aller Arme in % Alle): (Alle): Sham: n=13, SHT: n=17, n.s. nicht signifikant; Graphische Darstellung als Box Plot (Horizontale Linien: Median, + Mittelwert, Boxen 25. und 75. Perzentile, Whiskers 10. und 90. Perzentile).

Ausgewertet wurde darüber hinaus als Parameter der generellen Aktivität die zurückgelegte Strecke, sowie die Geschwindigkeit der Tiere während des Versuchs. Die Trauma-Gruppe wies ein signifikant aktiveres Verhalten auf,

sowohl die Geschwindigkeit als auch die zurückgelegte Strecke betreffend (Geschwindigkeit in cm/s: $4,834 \pm 0,3255$ in Sham gegenüber $8,137 \pm 1,298$ Trauma, $P=0,0245$, Welch-Test; zurückgelegte Strecke in cm: $1362 \pm 93,50$ in Sham gegenüber $2299 \pm 368,6$ in Trauma, $P=0,0241$, Welch-Test; Abb. 34).

In Woche 7 p. T. wurde somit erneut ein hyperaktives Verhaltensmuster nachgewiesen.

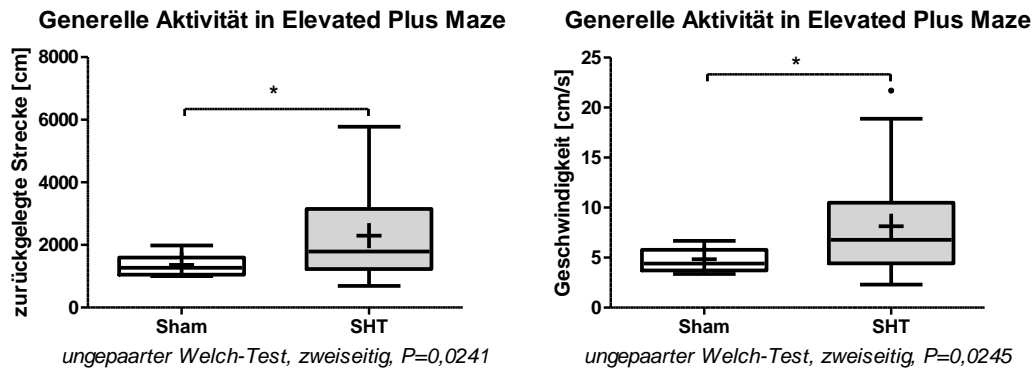


Abbildung 34: Elevated Plus Maze: Vergleich von Sham und SHT-Tieren

(Links): Vergleich der zurückgelegten Strecke in cm; (Rechts): Vergleich der Geschwindigkeit in cm/s; (Alle): Sham: $n=13$, SHT: $n=17$, * $P<0,05$; Graphische Darstellung als Box Plot (Horizontale Linien: Median, + Mittelwert, Boxen 25. und 75. Perzentile, Whiskers 10. und 90. Perzentile).

Nachfolgend wurde untersucht, inwieweit auch dieses hyperaktive Verhalten mit der Stärke des Traumas korreliert. Dazu erfolgte eine Analyse der Parameter Geschwindigkeit, zurückgelegte Strecke und NSS. Hierbei zeigte sich für beide Parameter eine schwache positive Korrelation mit dem *Neurological Severity Score*, welche jedoch knapp nicht mehr signifikant war (NSS und zurückgelegte Strecke in cm: Korrelationskoeffizient $r=0,3301$, $P=0,0749$, Spearman; NSS und Geschwindigkeit in cm/s: Korrelationskoeffizient $r=0,3040$, $P=0,1024$, Spearman, Abb. 35).

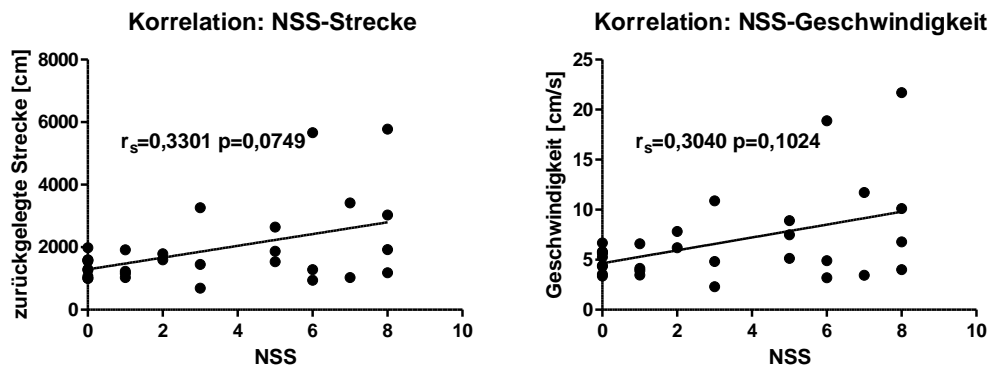


Abbildung 35: Elevated Plus Maze: Korrelation Hyperaktives Verhalten mit Neurological Severity Score (NSS)

(Links): Korrelation des NSS mit der zurückgelegten Strecke in cm; (Rechts): Korrelation des NSS mit der Geschwindigkeit in cm/s; (Alle): Sham: n=13, SHT: n=17; r_s = Spearman's rank Rho. Graphische Darstellung als Lineare Regression Analyse.

3.2 Zelluläre Veränderungen

Um die zellulären Veränderungen nach Schädel-Hirn Trauma zu charakterisieren, wurden histologische Färbungen im Hinblick auf strukturelle Prozesse, wie axonale Schädigung, Demyelinisierung und chronische Blutung durchgeführt. Des Weiteren erfolgte eine Untersuchung neuroinflammatorischer Prozesse im Sinne einer Astrozytose, einer Infiltration von Mikroglia und Monozyten sowie einer Einwanderung von B-Zellen.

Hierbei wurden zum einen die lokalen Veränderungen im Bereich der Läsion und zum anderen generalisierte Veränderungen im Bereich des gesamten Cortex untersucht. Darüber hinaus lag ein weiterer Fokus unserer Analyse auf der Region des Hippocampus, welcher eine zentrale Rolle in Lernprozessen spielt und daher im Hinblick auf kognitive Lerndefizite von besonderem Interesse ist.

3.2.1 Im Bereich der Läsion

Zur Untersuchung lokaler Prozesse wurden Färbungen mit GFAP, Iba1 und Berliner Blau an Kohorte 1 und Berliner Blau, Red Oil O und Luxol Fast Blue an Kohorte 2 durchgeführt. Die *Region of Interest* (ROI) lag auf der rechten Gehirnhemisphäre im Bereich der durch das SHT gesetzten Läsion bzw. in einer entsprechenden Region des Cortex der Sham Gruppe. Die Aufnahmen entstanden in zehnfacher Vergrößerung am Lichtmikroskop. Daraus ergab sich eine Größe der ROI von 1,28mm x 0,96mm.

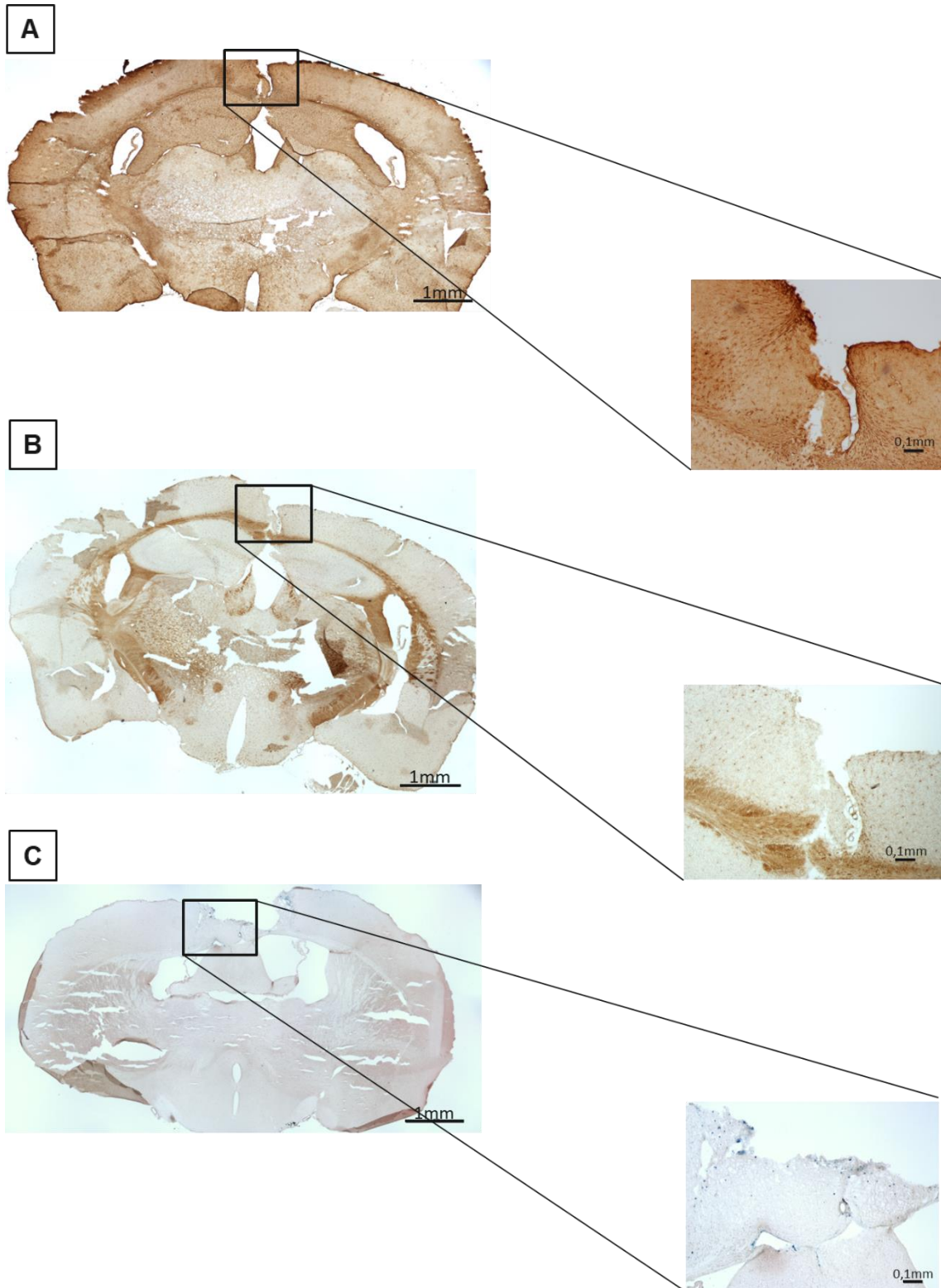


Abbildung 36: Übersichtsaufnahmen von GFAP, Iba1 und Berliner Blau mit ROI im Bereich der Läsion
 (A): GFAP; (B) Iba1; (C): Berliner Blau; (Alle): (Links) Übersichtsaufnahme mit Maßstab 1mm und ROI als Rechteckmarkierung; (Rechts): ROI-Aufnahme mit Maßstab 0,1 mm.

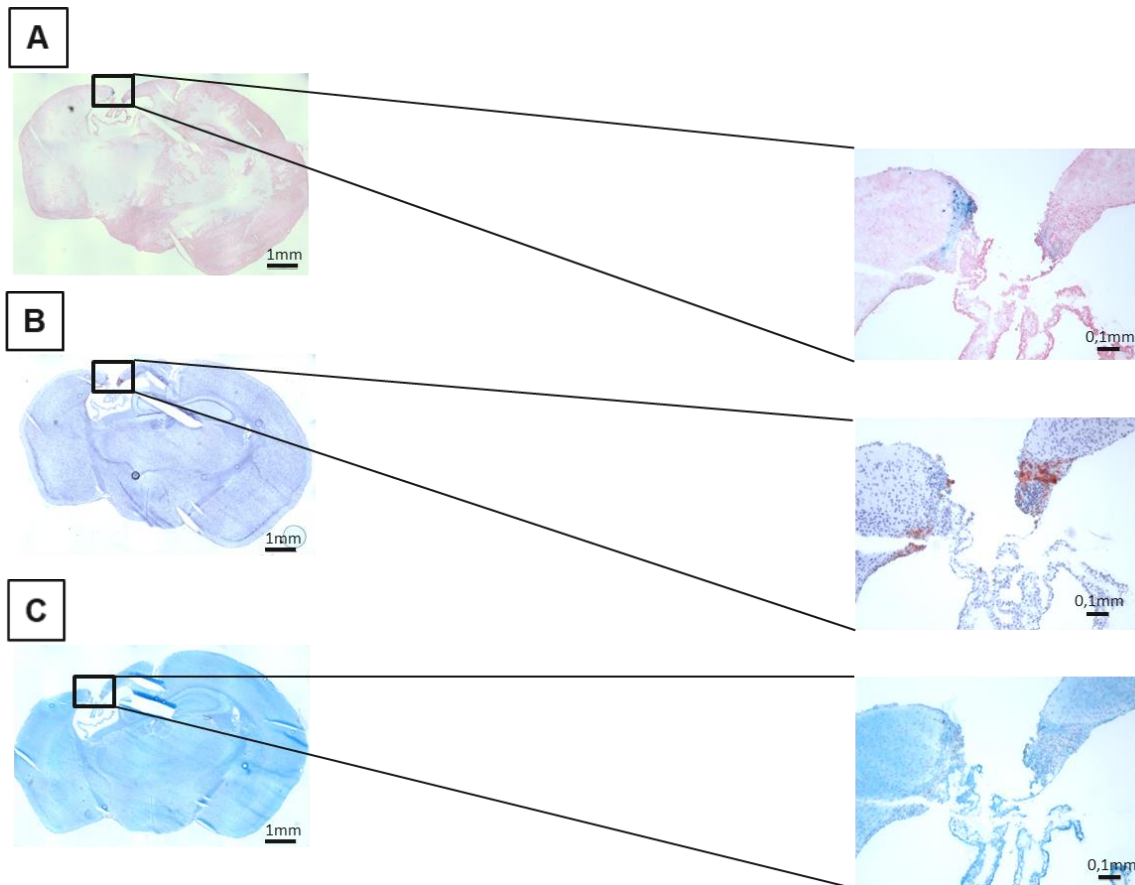


Abbildung 37: Übersichtsaufnahmen von Berliner Blau, Red Oil O und Luxol Fast Blue mit ROI im Bereich der Läsion

(A): Berliner Blau; (B): Red Oil O; (C) Luxol Fast Blue; (Alle): (Links) Übersichtsaufnahme mit Maßstab 1mm und ROI als Rechteckmarkierung; (Rechts): ROI-Aufnahme mit Maßstab 0,1mm.

3.2.1.1 GFAP+ Zellen

Die Trauma-Gruppe (n=7) wies im Bereich der Läsion eine signifikant höhere Anzahl GFAP+Zellen auf als die Sham Gruppe (n=6) im Bereich des intakten Cortex (Anzahl GFAP+ Zellen: $79,83 \pm 2,676$ in Sham gegenüber $246,3 \pm 34,19$ in Trauma, $P=0,0028$, Welch-Test, Abb. 39). Es sind also 3 Monate nach Trauma eine reaktive astroglotische Prozesse im Defektareal zu beobachten.

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob eine Korrelation zwischen der Stärke des Traumas und der astroglotischen Veränderungen zu beobachten ist. Dabei zeigte sich eine signifikante und starke positive Korrelation zwischen den beiden Parametern. Je stärker das initiale Trauma war, umso mehr Astrozyten konnten

im Bereich der Läsion entdeckt werden (NSS und Anzahl GFAP+ Zellen: Korrelationskoeffizient $r=0,7739$, $P=0,0019$, Spearman, Abb. 39).

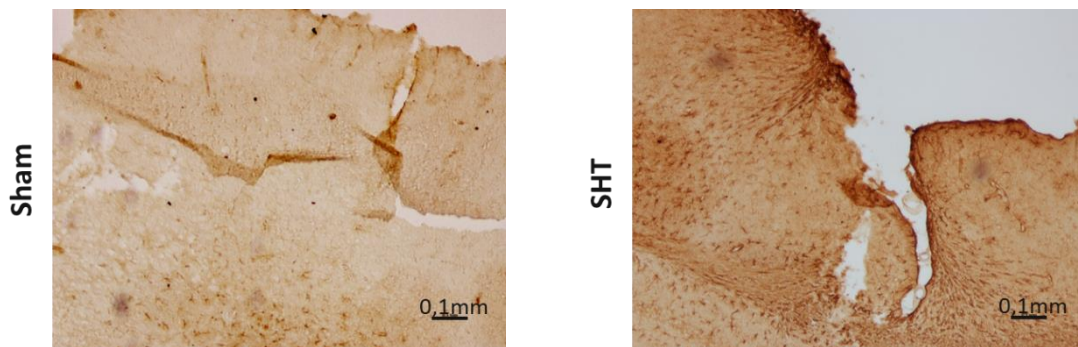


Abbildung 38: Fotografische Darstellung der Region of Interest in Sham und SHT
(Links): Sham (Rechts) SHT; (Alle): Maßstab 0,1mm.

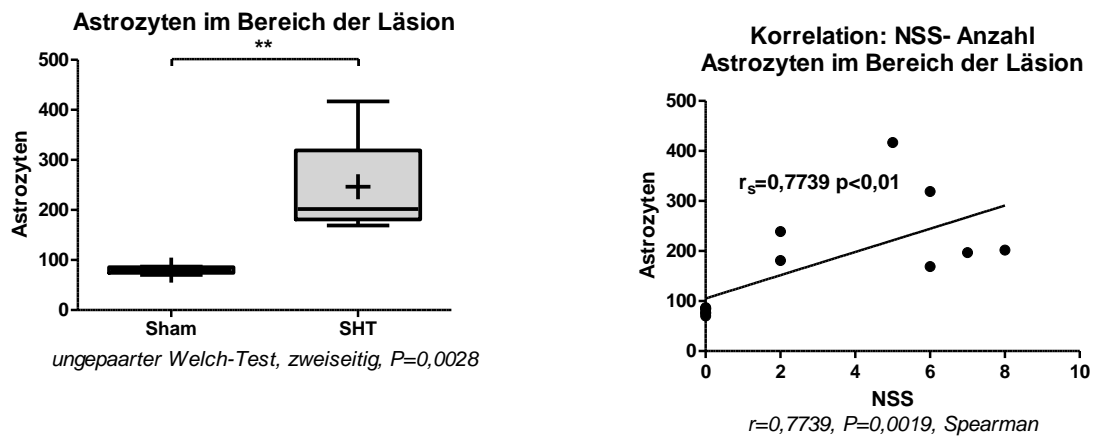


Abbildung 39: Graphen zur statistischen Auswertung von GFAP im Bereich der Läsion
(Links): Vergleich der Anzahl an Astrozyten im Bereich der Läsion in der Sham und SHT-Gruppe; ** $P<0,01$; Graphische Darstellung als Box Plot (Horizontale Linien: Median, + Mittelwert, Boxen 25. und 75. Perzentile, Whiskers 10. und 90. Perzentile); (Rechts): Korrelation der Anzahl an Astrozyten im Bereich der Läsion mit dem *Neurological Severity Score* (NSS) $r_s = Spearman's rank Rho$. Graphische Darstellung als Lineare Regression Analyse; (Alle): Sham: $n=6$, SHT: $n=7$.

3.2.1.2 Iba1+ Zellen

Neben der Astrozytenreaktion wurde auch nach einer vermehrten lokalen Infiltration von Mikroglia und Monozyten gesucht. In der durchgeführten Iba1-Färbung zeigte sich in den SHT-Tieren eine signifikant erhöhte Anzahl von Iba1+ Zellen im Bereich der Läsion (Anzahl Iba1+ Zellen: $148,3 \pm 5,327$ in Sham gegenüber $187,9 \pm 8,224$ in Trauma, $P=0,0026$, Abb. 41). Im Defektareal konnte somit 3 Monate nach Trauma eine vermehrte Infiltration mit Iba1+ Mikroglia und Monozyten festgestellt werden.

Daraus ergab sich die Fragestellung, inwieweit die Mikroglia-infiltration mit der Stärke des Traumas korreliert. Hierfür wurde die Anzahl der Iba1+ Zellen und der NSS analysiert. Es zeigte sich der Trend einer positiven Korrelation, welcher jedoch nicht signifikant war (NSS und Anzahl Iba1+ Zellen: Korrelationskoeffizient $r=0,4783$, $P=0,0983$, Spearman, Abb. 41).

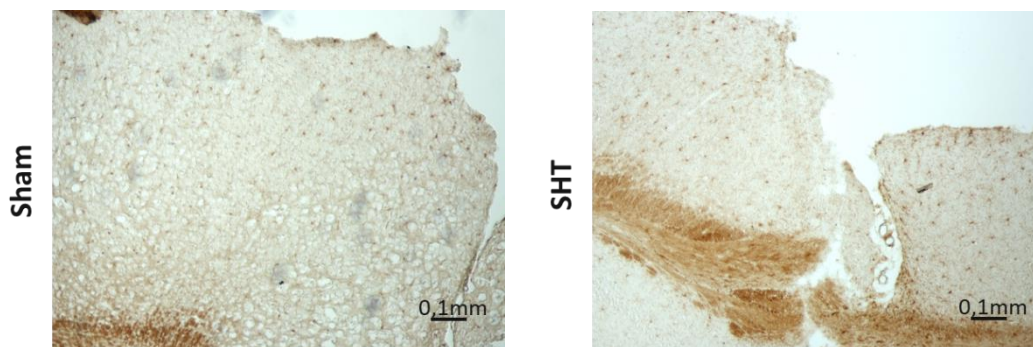


Abbildung 40: Photographische Darstellung der Region of Interest in Sham und SHT (Links): Sham (Rechts) SHT; (Alle): Maßstab 0,1mm.

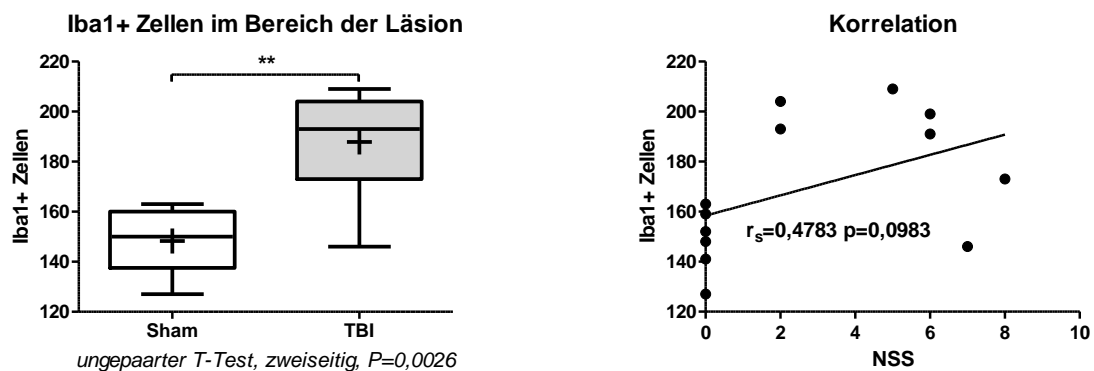


Abbildung 41: Graphen zur statistischen Auswertung von Iba1 im Bereich der Läsion (Links): Vergleich der Mikroglia- und Monozyten Infiltration im Bereich der Läsion in der Sham und SHT-Gruppe; ** $P<0,01$; Graphische Darstellung als Box Plot (Horizontale Linien: Median, + Mittelwert, Boxen 25. und 75. Perzentile, Whiskers 10. und 90. Perzentile); (Rechts): Korrelation der Mikroglia- und Monozyten Infiltration im Bereich der Läsion mit dem *Neurological Severity Score* (NSS) $r_s = \text{Spearman's rank Rho}$. Graphische Darstellung als Lineare Regression Analyse; (Alle): Sham: $n=6$, SHT: $n=7$.

3.2.1.3 Siderophagen

Mittels Berliner Blau Färbung konnten eisenhaltige Zellen im Gehirn nachgewiesen werden. Die Färbung wurde sowohl in Kohorte 1 ($n=13$: Sham $n=6$, Trauma $n=7$) als auch Kohorte 2 ($n=9$: Sham $n=4$; Trauma $n=5$) durchgeführt. Im Bereich des Gewebedefektes zeigte sich in beiden Kohorten eine signifikante Erhöhung eisenhaltiger Zellen im Bereich der Läsion (Anzahl eisenhaltiger Zellen: Kohorte 1: $0,00 \pm 0,00$ in Sham gegenüber $20,57 \pm 12,99$ in

Trauma, $P=0,0210$, *Fisher's Exact Test*, Abb. 43; Kohorte 2: $0,00 \pm 0,00$ in Sham gegenüber $62,00 \pm 16,12$ in Trauma, $P=0,0079$, *Fisher's Exact Test*, Abb. 46). Dabei dürfte es sich am ehesten um Siderophagen, Makrophagen, welche eisenhaltige Partikel phagozytieren, handeln. Diese Anwesenheit von Siderophagen 3 Monate nach Trauma deutet auf stattgehabte Blutungen hin.

Daraus ergab sich die Fragestellung, inwieweit die Anzahl der Siderophagen mit der Stärke des Traumas korreliert. Dazu wurde der Parameter mit dem NSS analysiert. Hierbei zeigte sich eine signifikante und stark positive Korrelation. Je größer die Stärke des Traumas umso mehr Siderophagen konnten nachgewiesen werden (NSS und Anzahl eisenhaltiger Zellen: Kohorte1: Korrelationskoeffizient $r=0,7089$, $P=0,0067$, Spearman, Abb. 43; Kohorte 2: Korrelationskoeffizient $r=0,9266$, $P=0,0007$, Spearman, Abb. 47).

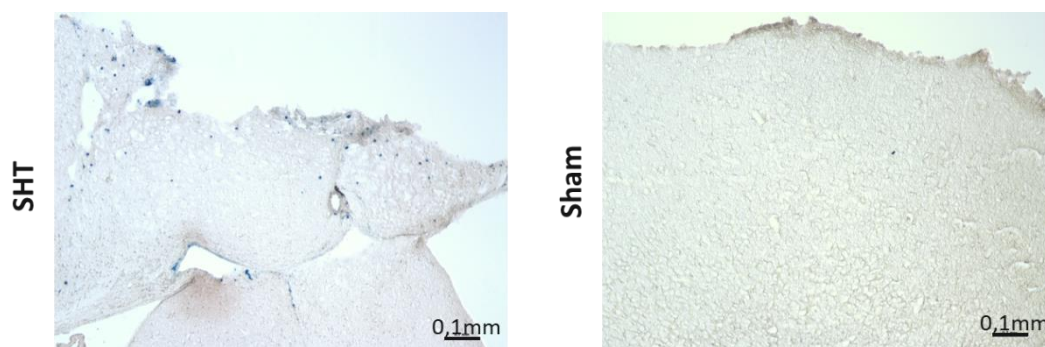


Abbildung 42: Photographische Darstellung der *Region of Interest* in Sham und SHT (Links): Sham (Rechts) SHT; (Alle): Maßstab 0,1mm.

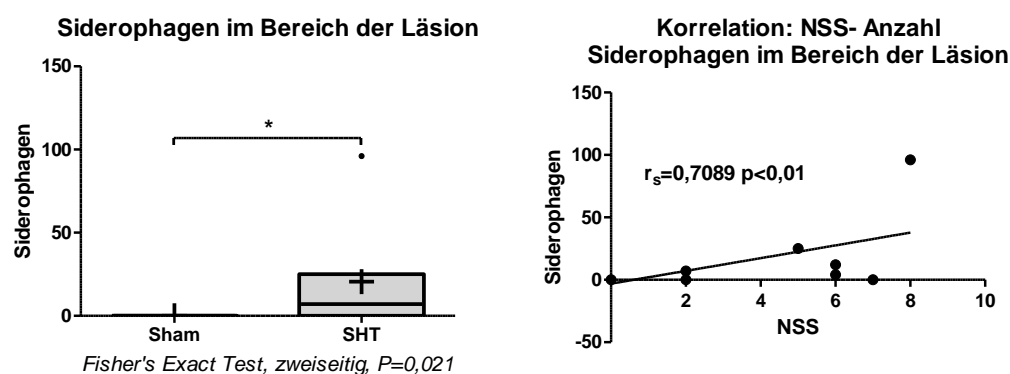


Abbildung 43: Graphen zur statistischen Auswertung von Siderophagen im Bereich der Läsion

(Links): Vergleich der Anzahl an Siderophagen im Bereich der Läsion in der Sham und SHT-Gruppe; ** $P<0,01$; Graphische Darstellung als Box Plot (Horizontale Linien: Median, + Mittelwert, Boxen 25. und 75. Perzentile, Whiskers 10. und 90. Perzentile); (Rechts): Korrelation der Anzahl an Siderophagen im Bereich der Läsion mit dem *Neurological Severity Score* (NSS) $r_s = Spearman's rank Rho$. Graphische Darstellung als Lineare Regression Analyse; (Alle): Sham: $n=6$, SHT: $n=7$.

3.2.1.4 Red Oil O

Red Oil O ist ein fettlöslicher Farbstoff zum Anfärben von Triglyceriden und Lipiden, welcher zum Nachweis von demyelinisierenden Prozessen eingesetzt wurde. Abbauprodukte der Myelinscheiden wurden dabei erfasst, intaktes Myelin jedoch nicht. Im Bereich der Läsion konnten in 5 von 5 Mäusen der Trauma-Gruppe *Lipid Droplets* nachgewiesen werden, in der Sham-Gruppe in keiner der 4 Mäuse (*Lipid Droplets*: $0,00 \pm 0,00$ in Sham gegenüber $35,00 \pm 16,27$ in Trauma, $P=0,0079$, *Fisher's Exact Test*, Abb. 46). Diese Ergebnisse deuten auf eine stattgefundene Demyelinisierung hin drei Monate nach Trauma.

Weitergehend wurde analysiert, inwieweit die Stärke des Traumas mit der Anzahl an *Lipid Droplets* zusammenhängt. Dabei ergab sich eine signifikante und stark positive Korrelation (NSS und *Lipid Droplets*: Korrelationskoeffizient $r=0,8257$, $P=0,0083$, Spearman, Abb. 47).

3.2.1.5 Luxol Fast Blue

Luxol Fast Blue färbt Myelin an und wurde zum Nachweis von Demyelinisierung angewendet. In 4 von 5 Mäusen der Trauma-Gruppe konnte eine Abblasung des Myelins im Bereich der Läsion festgestellt werden, was auf einen stattgehabten Prozess der Demyelinisierung hindeutet. Diese Beobachtung konnte in keiner der Sham-Mäuse gemacht werden (Demyelinisierung: 0 von 4 Mäusen in Sham gegenüber 4 von 5 Mäusen in Trauma, $P=0,0476$, *Fisher's Exact Test*, Abb. 46).

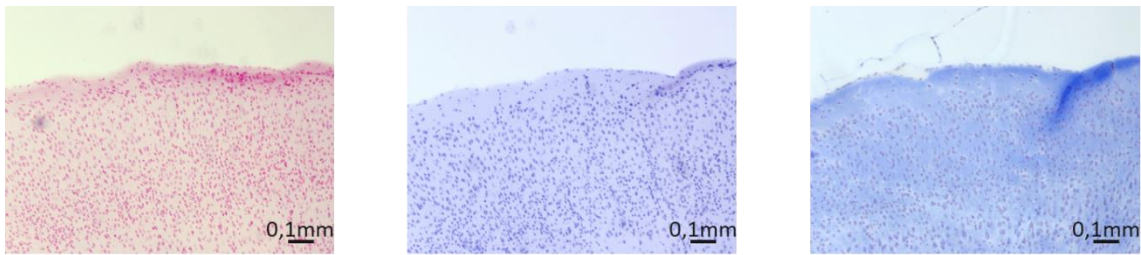


Abbildung 44: Photographische Darstellung der *Region of Interest* in Sham
(Links): Berliner Blau; (Mitte): Red Oil O; (Rechts) Luxol Fast Blue; (Alle): Maßstab 0,1mm.

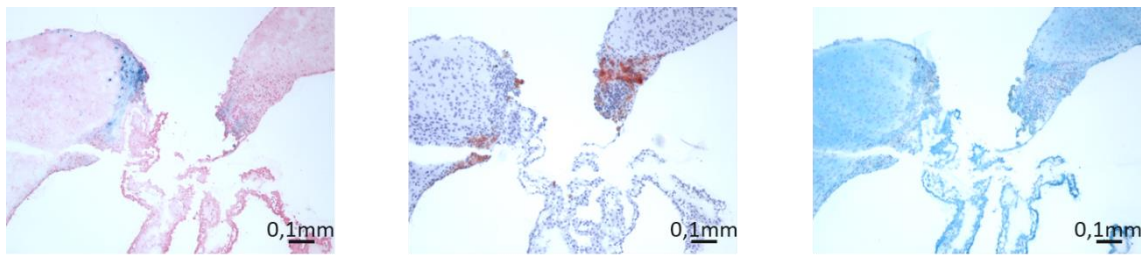


Abbildung 45: Photographische Darstellung der *Region of Interest* in SHT
(Links): Berliner Blau; (Mitte): Red Oil O; (Rechts) Luxol Fast Blue; (Alle): Maßstab 0,1mm.

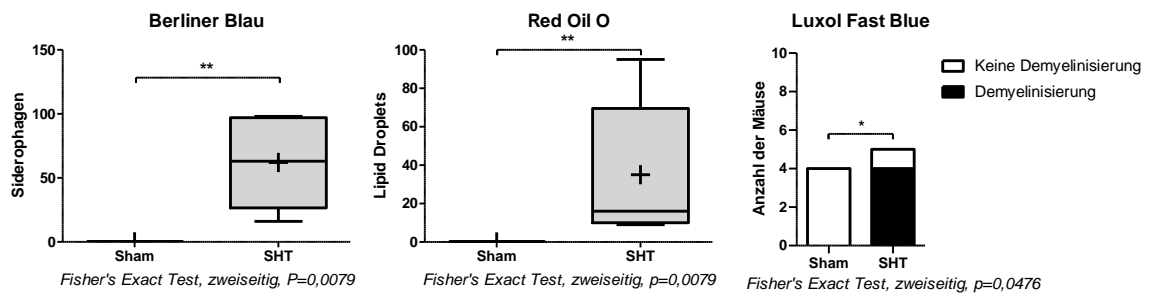


Abbildung 46: Vergleich von Siderophagen, *Lipid Droplets* und Demyelinisierung im Bereich der Läsion in Sham und SHT-Gruppe

(Links): Vergleich der Anzahl an Siderophagen im Bereich der Läsion in der Sham und SHT-Gruppe; (Mitte): Vergleich der Anzahl an *Lipid Droplets* im Bereich der Läsion in der Sham und SHT-Gruppe; (Links und Mitte): ** $P<0,01$; Graphische Darstellung als Box Plot (Horizontale Linien: Median, + Mittelwert, Boxen 25. und 75. Perzentile, Whiskers 10. und 90. Perzentile); (Rechts): Vergleich von Demyelinisierung im Bereich der Läsion in der Sham und SHT-Gruppe; * $P<0,05$; Graphische Darstellung als *Contingency Graph* mit Balkendarstellung; Schwarz: Nachweis Demyelinisierung, Weiß: keine Demyelinisierung nachweisbar; (Alle): Sham: $n=4$, SHT: $n=5$.

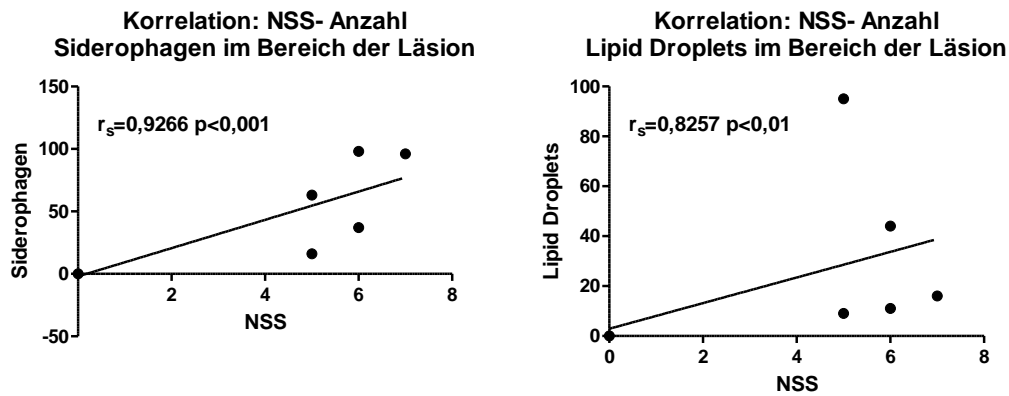


Abbildung 47: Korrelation von Siderophagen und *Lipid Droplets* im Bereich der Läsion mit dem *Neurological Severity Score* (NSS)

(Links): Korrelation der Anzahl an Siderophagen mit dem NSS; (Rechts): Korrelation der Anzahl an *Lipid Droplets* mit dem NSS; (Alle): $r_s = Spearman's\ rank\ Rho$. Graphische Darstellung als Lineare Regression Analyse; (Alle): Sham: n=6, SHT: n=7.

3.2.2 Im Cortex

Neben lokalen zellulären Prozessen wurde ebenfalls nach generalisierten Veränderungen im gesamten Cortex gesucht. Hierzu erfolgten Färbungen in Kohorte 1 (n=13: Sham n=6, Trauma n=7) mit SMI 32, zum Nachweis axonale Schädigung, mit GFAP zur Erfassung von Astrozytose und Iba1 zur Untersuchung von Mikroglia und Monozyten. In Kohorte 2 (n=9: Sham n=4; Trauma n=5) wurde mit CD19 außerdem nach einer möglichen B-Zell-Infiltration gesucht.

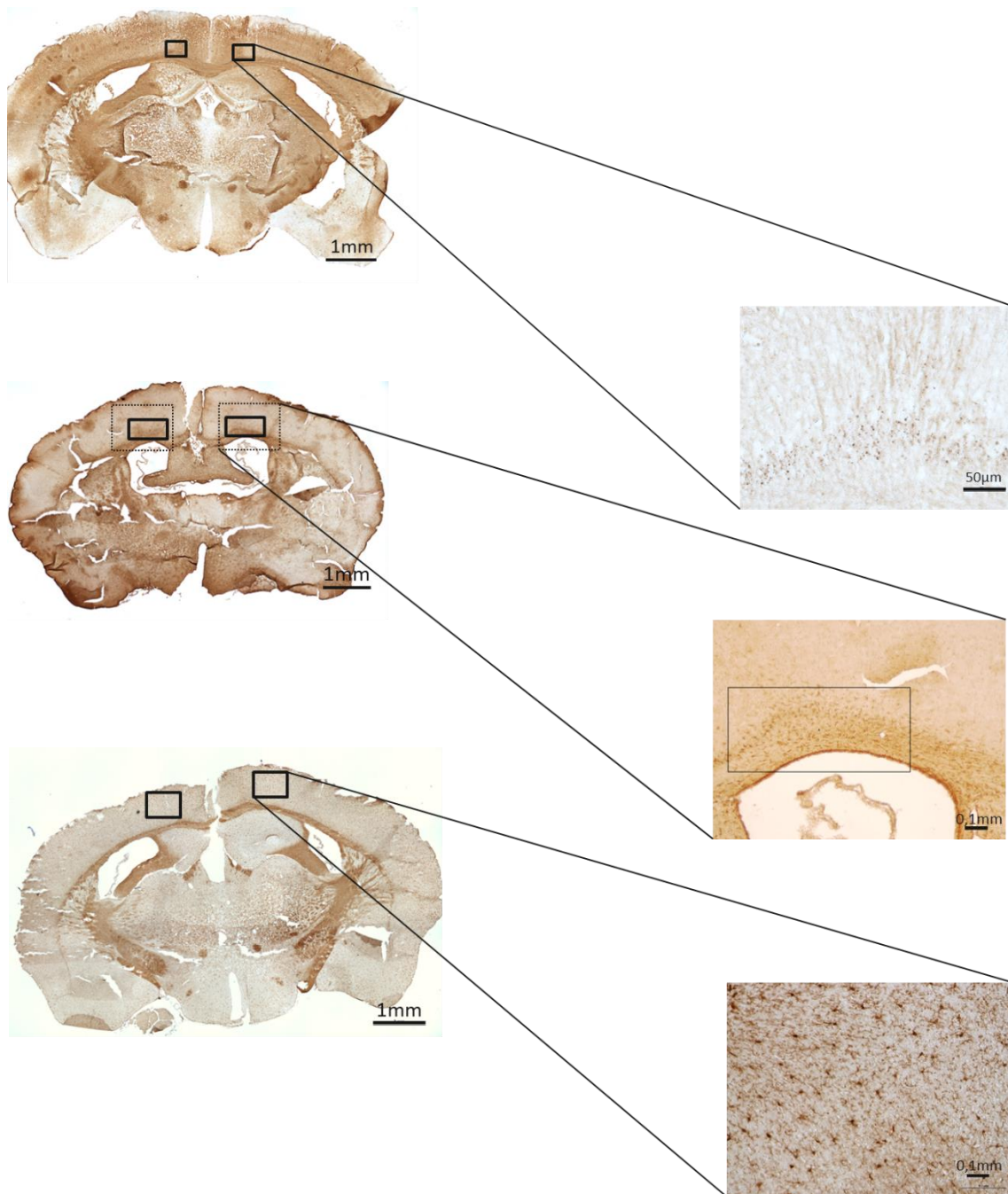


Abbildung 48: Übersichtsaufnahmen von SMI 32, GFAP und Iba1 mit ROI im Bereich der Läsion

(A): SMI 32; (B) GFAP; (C): Iba1; (Alle): (Links) Übersichtsaufnahme mit Maßstab 1mm und ROI als Rechteckmarkierung; (Rechts): ROI-Aufnahme mit Maßstab 50µm bzw. 0,1 mm.

3.2.2.1 SMI 32+ Axone

Die ROI lag knapp oberhalb des Corpus Callosums und Cingulum Bündels im Bereich des somatomotorischen Areals des Isocortex. Die Aufnahmen entstanden in vierzigfacher Vergrößerung am Lichtmikroskop. Daraus ergab sich

eine Größe der ROI von 0,32mm x 0,24mm. Axonale Schädigung wurde quantifiziert durch die Anzahl an Axonen, welche innerhalb der ROI durch SMI 32 angefärbt wurden. Es erfolgte eine Untersuchung sowohl der linken als auch rechten Hemisphäre. Die untersuchten Schnitte entsprachen im Median Position 70 und im Mittelwert Position 70,9 des *Allen Mouse Brain Atlas*.

Zum einen wurde innerhalb der Trauma-Mäuse die ROI der linken mit der ROI der rechten Hemisphäre verglichen, um zu eruieren ob nach Induktion des Schädel-Hirn Traumas auf der rechten Hemisphäre eine einseitige oder eine bi-hemisphärische Schädigung vorlag. Zum anderen erfolgte ein Vergleich der Sham Gruppe mit der Trauma Gruppe. Hierbei wurde die Zählung der linken und rechten ROI addiert und anschließend zwischen Sham und SHT-Tieren verglichen. Der Auswertung der linken und rechten Hemisphäre ergab keine signifikanten Unterschiede, wodurch wir auf einen globalen Effekt der axonalen Schädigung schlossen (SMI 32+ Axone: $93,57 \pm 20,62$ in der linken Hemisphäre gegenüber $112,0 \pm 28,74$ in der rechten Hemisphäre, $P=0,6118$, Abb. 49).

In der Trauma-Gruppe zeigte sich im Vergleich zur Sham-Gruppe ein signifikant höheres Ausmaß an axonaler Schädigung (SMI 32+ Axone: $17,17 \pm 3,544$ in Sham gegenüber $205,6 \pm 48,38$ in Trauma, $P=0,0081$, Welch-Test, Abb. 49).

Darüber hinaus wurde analysiert, inwieweit die Stärke des Traumas mit der axonalen Schädigung zusammenhängt. Dabei ergab sich eine signifikante und stark positive Korrelation zwischen NSS und der Anzahl an SMI 32+ Axonen. Je größer die Stärke des Traumas war, umso mehr axonale Schädigung war zu beobachten (NSS und SMI 32+ Axone: Korrelationskoeffizient $r=0,9056$, $P<0,0001$, Spearman, Abb. 50).

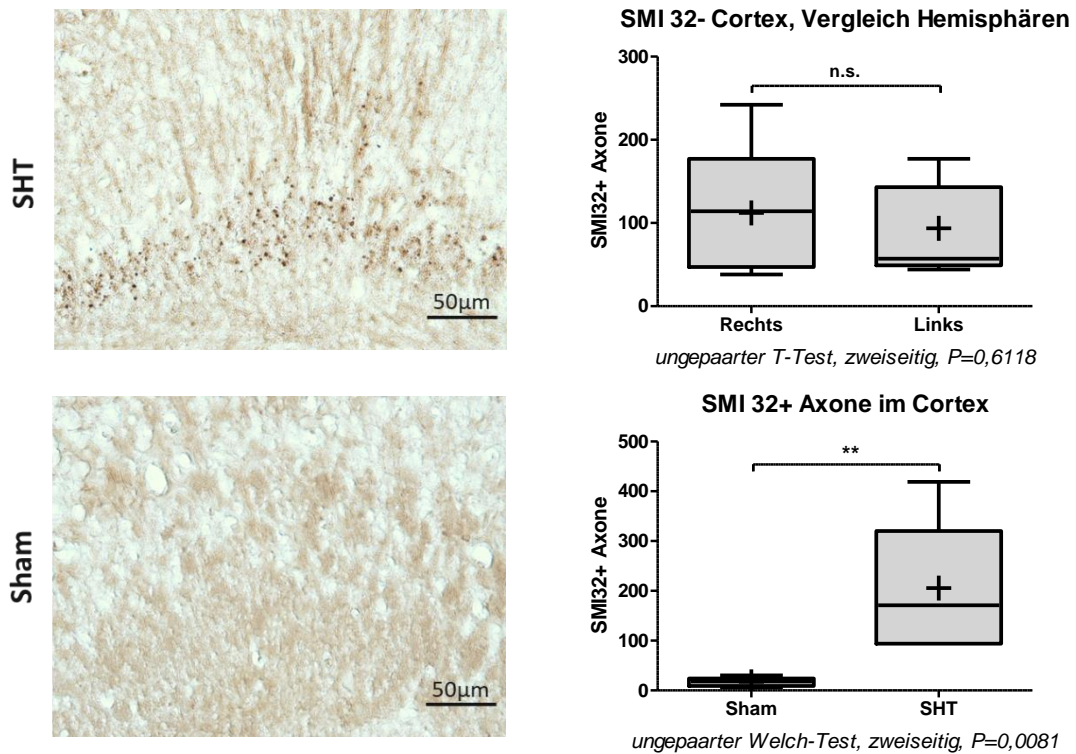


Abbildung 49: Fotografische Darstellung der *Region of Interest* in Sham und SHT und Graphen zur statistischen Auswertung von Siderophagen im Bereich der Läsion
(Oben links): ROI der SHT-Gruppe; Maßstab 50µm; (Unten links): ROI der Sham; Maßstab 50µm; (Oben rechts): Vergleich der Anzahl an SMI32+ Axone in der linken und rechten Hemisphäre in SHT-Tieren; n=7; (Unten rechts): Vergleich der Anzahl an SMI32+ Axone im Cortex in der Sham und SHT-Gruppe; Sham: n=6, SHT: n=7; (Rechts oben und unten): ** $P<0,01$; n.s. nicht signifikant; Graphische Darstellung als Box Plot (Horizontale Linien: Median, + Mittelwert, Boxen 25. und 75. Perzentile, Whiskers 10. und 90. Perzentile).

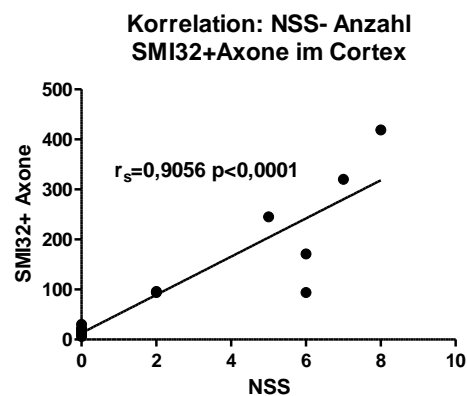


Abbildung 50: Korrelation von SMI32+ Axonen mit dem *Neurological Severity Score* (NSS)
 $r_s = Spearman's\ rank\ Rho$. Graphische Darstellung als Lineare Regression Analyse; (Alle): Sham: n=6, SHT: n=7.

3.2.2.2 GFAP+ Zellen

Neben einer lokalen Vermehrung von Astrozyten wurde ebenso nach einem generalisierten Anstieg von Astrozyten im Bereich des Isocortex gesucht. Dazu wurden an jeder Maus drei unterschiedliche Positionen nach *Allen Mouse Brain Atlas* untersucht. Position 1 entsprach im Median Position 46 und im Mittelwert Position 46,1 des *Allen Mouse Brain Atlas*. Die ROI lag beidseits im medialen Isocortex oberhalb des lateralen Ventrikels im Bereich des Somatomotorischen Areals mit medialen Anteilen des Anterioren Cingulären Cortex und kaudalen Anteilen des Genu des Corpus Callosums, sowie des Cingulum Bündels. Position 2 entsprach im Median Position 57 und im Mittelwert Position 56 des *Allen Mouse Brain Atlas*. Die ROI lag beidseits im medialen Isocortex knapp oberhalb des lateralen Ventrikels im Bereich des Somatomotorischen Areals mit medialen Anteilen des Anterioren Cingulären Cortex, lateralen Anteilen des Somatosensorischen Areals und kaudalen Anteilen des Corpus Callosums und Cingulum Bündels. Position 3 entsprach im Median Position 65 und im Mittelwert Position 66,5 des *Allen Mouse Brain Atlas*. Die ROI lag beidseits im medialen Isocortex knapp oberhalb des Hippocampus und lateralen Ventrikels im Bereich des Somatomotorischen Areals mit medialen Anteilen des Anterioren Cingulären Cortex, lateralen Anteilen des Somatosensorischen Areals und kaudalen Anteilen des Corpus Callosums und Cingulum Bündels. Alle Aufnahmen entstanden in zehnfacher Vergrößerung am Lichtmikroskop. Die Größe der ROI wurde auf 0,8mm x 0,4mm festgelegt. Die GFAP+ Zellen innerhalb der ROI wurden gezählt und aus den Zählungen der Position 1, 2 und 3 ein Mittelwert gebildet.

Zum einen erfolgte ein Vergleich der Sham-Gruppe mit der Trauma-Gruppe. Dazu wurden die oben genannten Mittelwerte der linken und rechten Hemisphäre addiert und zwischen den Gruppen verglichen. In der Trauma-Gruppe zeigte sich im Vergleich zu Sham-Gruppe eine signifikant erhöhte Anzahl an Astrozyten (GFAP+ Zellen: $309,8 \pm 9,859$ in Sham gegenüber $441,7 \pm 17,14$ in Trauma, $P < 0,0001$, Abb. 53).

Zum anderen erfolgte ein Vergleich der linken mit der rechten Hemisphäre innerhalb der SHT-Tiere. Die Fragestellung war hierbei, ob nach Induktion des

Schädel-Hirn Traumas auf der rechten Hemisphäre auch eine vermehrte Rekrutierung von Astrozyten auf der rechten Seite vorliegt oder eine bi-hemisphärische Rekrutierung mit einem diffusen, globalen Effekt des Traumas. Hierzu wurde der Mittelwert der ROI der linken Hemisphäre mit dem der rechten Hemisphäre verglichen. Dabei ergaben sich keine signifikanten Unterschiede, wodurch wir auf einen globalen Effekt der Astrozytose schließen (GFAP+ Zellen: $230,9 \pm 9,680$ in der linken Hemisphäre gegenüber $210,8 \pm 8,424$ in der rechten Hemisphäre, $P=0,1425$, Abb. 53).

Aus beiden Analysen erfolgt die Schlussfolgerung, dass ein einseitiges Schädel-Hirn Trauma einen diffus globalen Effekt hat und eine bi-hemisphärische reaktive Astrozytose im Bereich des Isocortex zur Folge hat.

Anschließend wurde untersucht, inwieweit die Stärke des Traumas die Rekrutierung von Astrozyten beeinflusst. Dabei zeigte sich eine signifikante und stark positive Korrelation zwischen NSS und der Anzahl an Astrozyten (NSS und GFAP+ Zellen: Korrelationskoeffizient $r=0,7913$, $P=0,0013$, Spearman, Abb. 54).

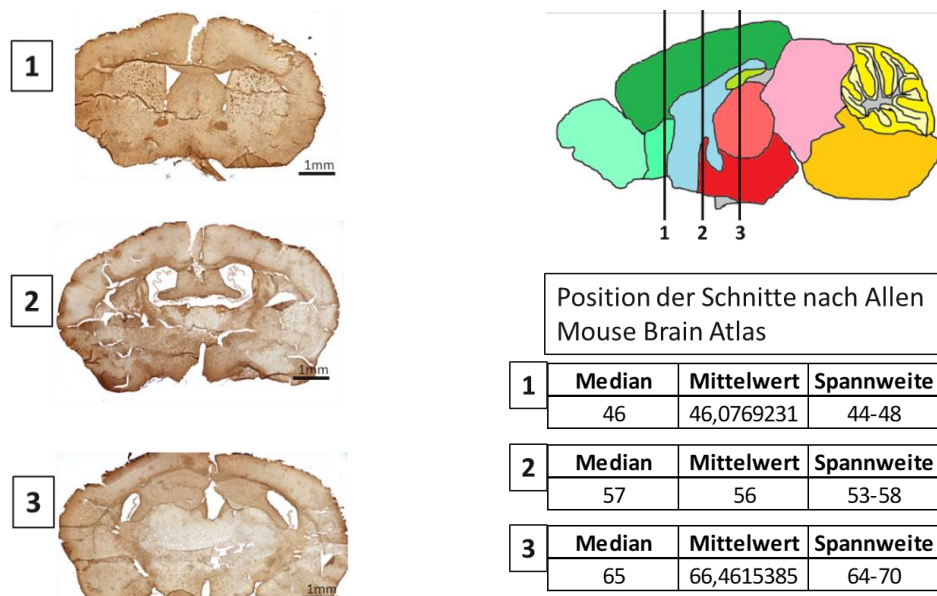


Abbildung 51: Übersicht GFAP Positionen 1-3

Positionen 1-3 in Übersichtsabbildungen mit Angabe der Positionen nach *Allen Mouse Brain Atlas* und Abbildung zum anatomischen Längsschnitt modifiziert nach *Allen Mouse Brain Atlas*, *Image credit: Allen Institute*. Eine Druckerlaubnis liegt nach Bestimmungen des *Allen Institute* (<https://alleninstitute.org/legal/terms-use/>) vor.

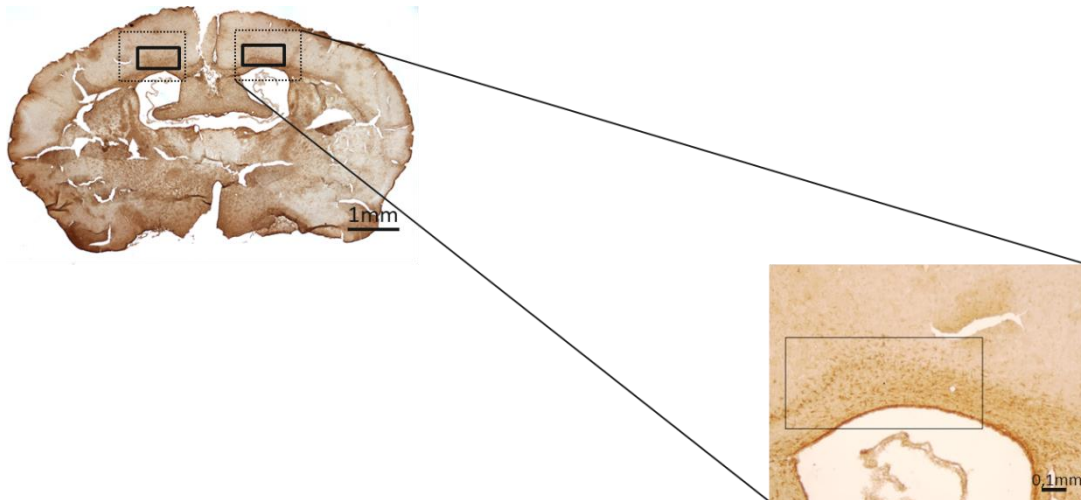
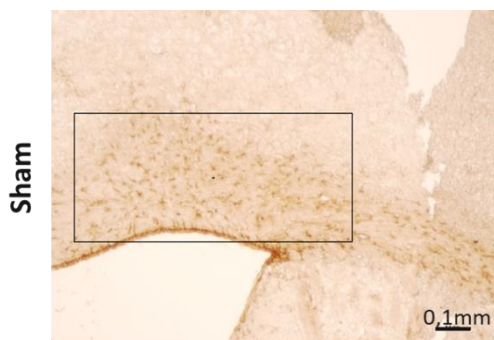
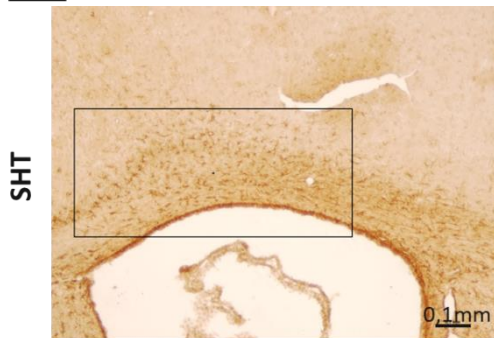
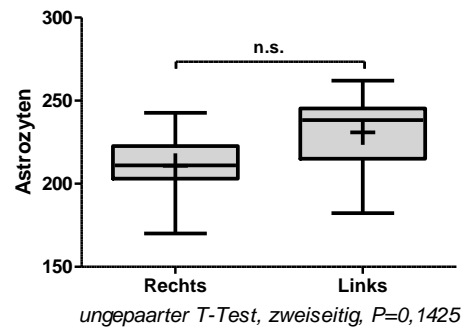


Abbildung 52: Übersichtsaufnahmen von GFAP mit ROI im Bereich der Läsion
 (Links) Übersichtsaufnahme mit Maßstab 1mm und neuroanatomische Position der ROI als Rechteckmarkierung; (Rechts): ROI-Aufnahme mit Maßstab 0,1 mm und Markierung ROI mit Rechteck.

C

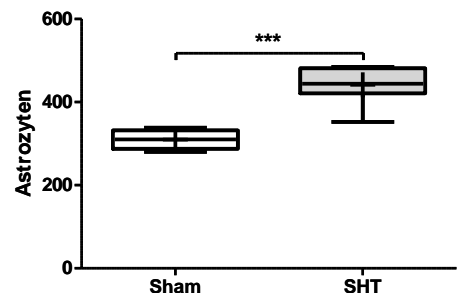


GFAP- Cortex, Vergleich Hemisphären



ungepaarter T-Test, zweiseitig, $P=0,1425$

Astrozyten im Cortex



ungepaarter T-Test, zweiseitig, $P<0,0001$

Abbildung 53: Fotografische Darstellung der Region of Interest in Sham und SHT und Graphen zur statistischen Auswertung von GFAP im Cortex

(Links oben): Fotografische Abbildung der ROI eines SHT-Tieres in 10x Vergrößerung; (Links unten): Fotografische Abbildung der ROI eines Sham-Tieres in 10x Vergrößerung; (Rechts oben): Vergleich der rechten und linken Hemisphäre in SHT-Tieren; $n=7$, n.s. nicht signifikant; (Rechts unten): Vergleich der Anzahl an Astrozyten in Sham und SHT-Tieren Sham: $n=6$, SHT: $n=7$, *** $P<0,001$); (Rechts oben und unten): Graphische Darstellung als Box Plot (Horizontale Linien: Median, + Mittelwert, Boxen 25. und 75. Perzentile, Whiskers 10. und 90. Perzentile).

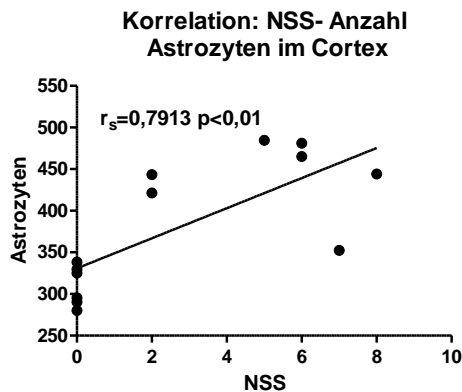


Abbildung 54: Korrelation von Astrozyten im Cortex mit dem *Neurological Severity Score* (NSS)

$r_s = \text{Spearman's rank Rho}$. Graphische Darstellung als Lineare Regression Analyse; (Alle): Sham: n=6, SHT: n=7.

3.2.2.3 Iba1+ Zellen

Neben Axonalen Schädigung und Astrozyten war auch die Anwesenheit von Mikroglia und eingewanderten Monozyten von besonderem Interesse. Nach der nachgewiesenen lokalen Vermehrung im Bereich der Läsion stellte sich die Frage, ob im übrigen Cortex auch außerhalb des Defektareals eine reaktive Rekrutierung von Mikroglia und ein vermehrter Einstrom von peripheren Monozyten vorliegt. Hierfür wurden an jeder Maus fünf unterschiedliche Positionen nach *Allen Mouse Brain Atlas* untersucht.

Position 1 entsprach im Median Position 49 und im Mittelwert Position 49,7 nach *Allen Mouse Brain Atlas*. Die ROI lag im medialen Isocortex oberhalb des Genu des Corpus Callosums und des Cingulum Bündels im Bereich des Somatomotorischen Areals mit medialen Anteilen des Anterioren Cingulären Cortex.

Position 2 entsprach im Median Position 53 und im Mittelwert Position 53,5 nach *Allen Mouse Brain Atlas*. Die ROI lag oberhalb des Corpus Callosums und des Cingulum Bündels im medialen Isocortex im Bereich des Somatomotorischen Areals mit medialen Anteilen des Anterioren Cingulären Cortex.

Position 3 entsprach im Median und im Mittelwert Position 59 nach *Allen Mouse Brain Atlas*. Die ROI lag oberhalb des Corpus Callosums und des Cingulum

Bündels im medialen Isocortex im Bereich des Somatomotorischen Areal mit medialen Anteilen des Anterioren Cingulären Cortex.

Position 4 entsprach im Median Position 63 und im Mittelwert Position 63,2 nach *Allen Mouse Brain Atlas*. Die ROI lag oberhalb des Corpus Callosums und des Cingulum Bündels im medialen Isocortex im Bereich des Somatomotorischen Areal mit medialen Anteilen des Anterioren Cingulären Cortex.

Position 5 entsprach im Median Position 71 und im Mittelwert Position 72 nach *Allen Mouse Brain Atlas*. Die ROI lag oberhalb des Corpus Callosums und des Cingulum Bündels im medialen Isocortex im Bereich des Somatomotorischen Areal mit medialen Anteilen des Anterioren Cingulären Cortex.

Alle Aufnahmen entstanden in zwanzigfacher Vergrößerung am Lichtmikroskop. Daraus ergab sich eine Größe der ROI von 0,64mm x 0,48mm. Die Iba1+ Zellen innerhalb der ROI wurden gezählt und aus den Zählungen der Position 1 bis 5 ein Mittelwert gebildet.

Zum einen wurden die Sham- mit der SHT-Gruppe verglichen. Dafür wurden die oben genannten Mittelwerte der linken und rechten Hemisphäre addiert und zwischen den Gruppen einander gegenübergestellt. In der Trauma-Gruppe zeigte sich hierbei eine signifikant erhöhte Anzahl an Mikroglia im Isocortex (Iba1+ Zellen: $83,30 \pm 1,014$ in Sham gegenüber $141,6 \pm 4,648$ in Trauma, $P < 0,0001$, Welch-Test, Abb. 57).

Zum anderen erfolgte ein Vergleich der linken mit der rechten Hemisphäre innerhalb der SHT-Tiere. Die Fragestellung war hierbei, ob nach Induktion des Schädel-Hirn Traumas auf der rechten Hemisphäre eine vermehrte Infiltration von Mikroglia und Monozyten auf der rechten Seite nachweisbar ist oder eine bihemisphärische Infiltration mit einem diffusen, globalen Effekt des Traumas vorliegt. Hierfür erfolgte ein Vergleich des Mittelwertes der ROI der linken Hemisphäre mit dem der rechten Hemisphäre. Es konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden, woraus der Rückschluss auf einen globalen Effekt des Traumas folgte (Iba1+ Zellen: $71,29 \pm 2,167$ in der

linken Hemisphäre gegenüber $70,31 \pm 2,584$ in der rechten Hemisphäre, $P=0,7782$, Abb. 57).

Aus diesen Beobachtungen folgte die Schlussfolgerung, dass ein einseitiges Schädel-Hirn Trauma zu einem diffus globalen Effekt führt und in beiden Hemisphären eine reaktive Rekrutierung von Mikroglia und Monozyten im Bereich des Isocortex zur Folge hat.

Weitergehend wurde untersucht, inwieweit die Anzahl der Mikroglia und Monozyten mit der Stärke des Traumas im Zusammenhang steht. Dabei zeigte sich eine signifikante und stark positive Korrelation zwischen NSS und der Anzahl an Iba1+ Zellen (NSS und Iba1+ Zellen: Korrelationskoeffizient $r=0,7043$, $P=0,0072$, Spearman, Abb. 58).

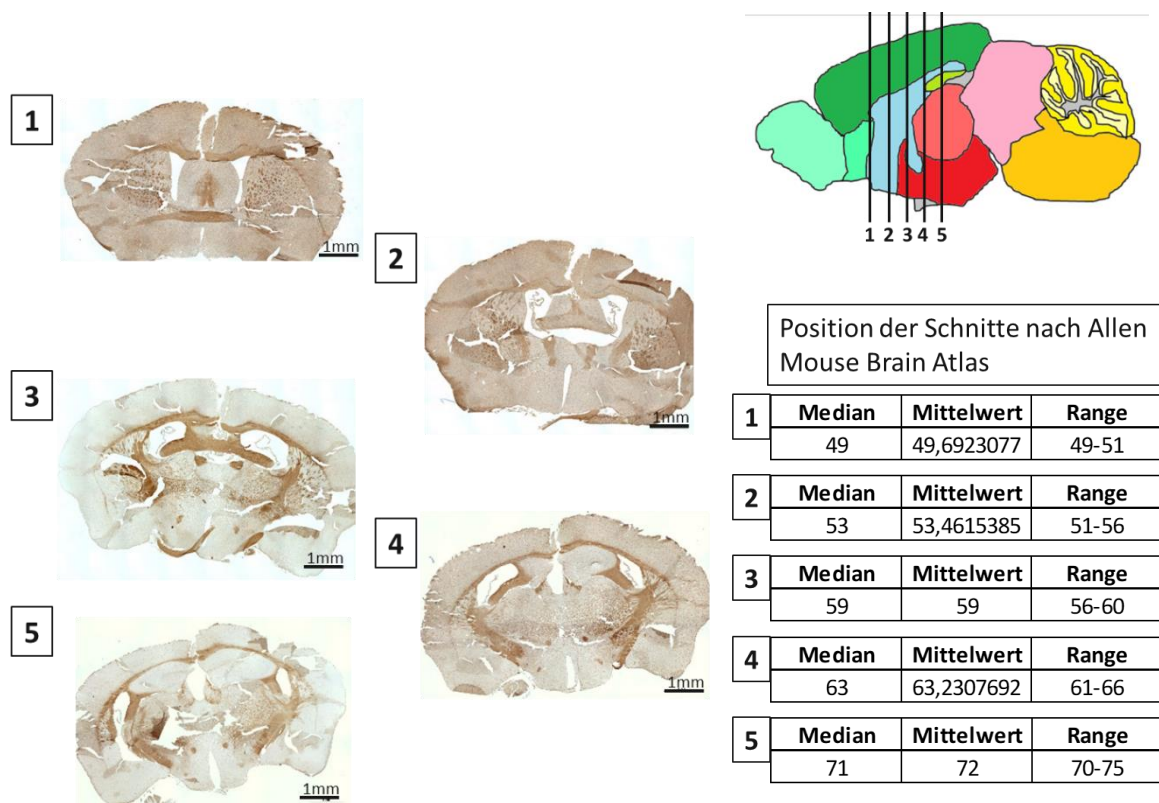


Abbildung 55: Übersichtsabbildung Position 1-5

(Links): Positionen 1-5 in Übersichtsabbildungen; (Rechts): Angabe der Positionen nach *Allen Mouse Brain Atlas* und Abbildung zum anatomischen Längsschnitt modifiziert nach *Allen Mouse Brain Atlas*, *Image credit: Allen Institute*. Eine Druckerlaubnis liegt nach Bestimmungen des *Allen Institute* (<https://alleninstitute.org/legal/terms-use/>) vor.

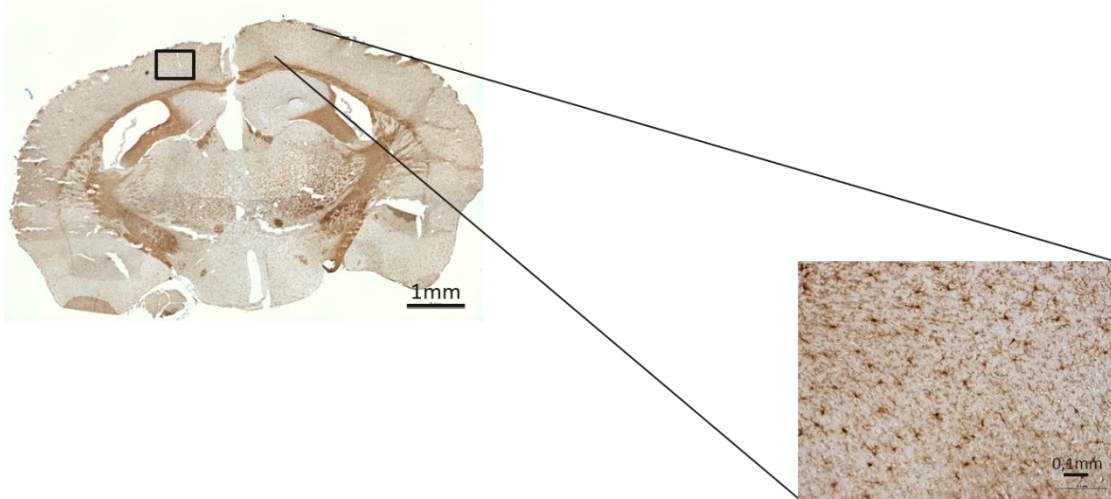


Abbildung 56: Übersichtsaufnahmen von Iba1 mit ROI im Bereich der Läsion
 (Links): Übersichtsaufnahme mit Maßstab 1mm und neuroanatomische Position der ROI als Rechteckmarkierung; (Rechts): ROI-Aufnahme mit Maßstab 0,1 mm.

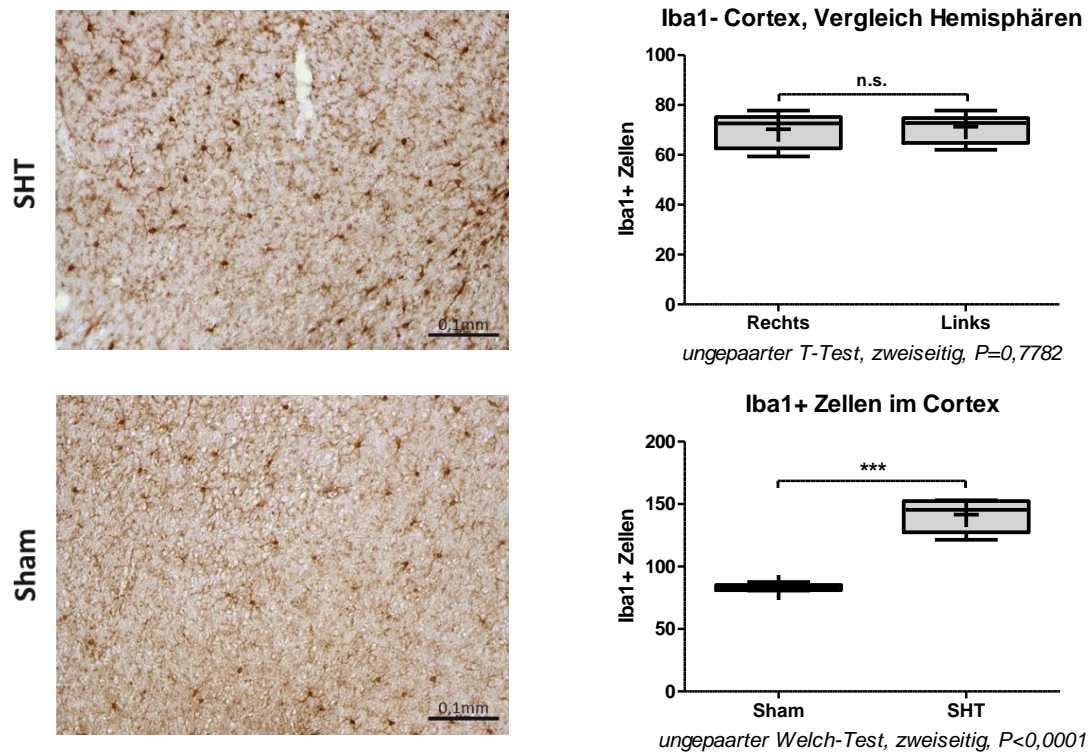


Abbildung 57: Fotografische Darstellung der Region of Interest in Sham und SHT und Graphen zur statistischen Auswertung von Iba1 im Cortex

(Links oben): Fotografische Abbildung der ROI eines SHT-Tieres in 20x Vergrößerung; (Links unten): Fotografische Abbildung der ROI eines Sham-Tieres in 20x Vergrößerung; (Rechts oben): Vergleich der rechten und linken Hemisphäre in SHT-Tieren; $n=7$, n.s. nicht signifikant; (Rechts Unten): Vergleich der Anzahl an Iba1+ Zellen im Cortex in Sham und SHT-Tieren; Sham: $n=6$, SHT: $n=7$, *** $P<0,001$; (Rechts oben und unten): Graphische Darstellung als Box Plot (Horizontale Linien: Median, + Mittelwert, Boxen 25. und 75. Perzentile, Whiskers 10. und 90. Perzentile).

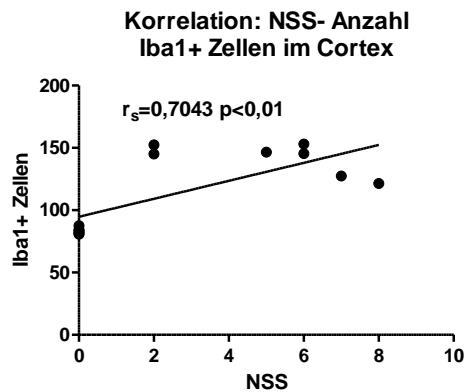


Abbildung 58: Korrelation von Anzahl an Mikroglia und Monozyten im Cortex und Neurological Severity Score (NSS)

r_s = Spearman's rank Rho. Graphische Darstellung als Lineare Regression Analyse; (Alle): Sham: n=6, SHT: n=7.

3.2.2.4 CD 19+ Zellen

Als Oberflächenmarker von B-Lymphozyten wurde ein Antikörper gegen CD-19 verwendet, um eingewanderte B-Zellen im Cortex nachzuweisen. In der Literatur ist eine Einwanderung immunologischer Zellen nach Schlaganfall und SHT durch die beschädigte Blut-Hirn-Schranke bereits beschrieben (Filiano, Gadani, and Kipnis 2017; Daglas et al. 2019). Dabei wird insbesondere die Rolle von B-Zellen diskutiert. Es verhärteten sich die Hinweise, dass B-Zellen eine wichtige Rolle in der Neuroregeneration spielen (Daglas et al. 2019). Aus diesem Grund war es von besonderem Interesse, ob B-Lymphozyten auch drei Monate nach Trauma noch nachzuweisen sind.

Hierzu wurde der gesamte Isocortex an 3 unterschiedlichen Positionen nach *Allen Mouse Brain Atlas* auf beiden Hemisphären untersucht und die Anzahl an CD19+ Zellen erfasst. Aus diesen drei Positionen wurde ein Mittelwert errechnet, welcher zwischen Sham und Trauma-Gruppe verglichen wurde. Position 1 entsprach im Median Position 71 und im Mittelwert Position 67,8 nach *Allen Mouse Brain Atlas*. Position 2 entsprach im Median Position 74 und im Mittelwert Position 72,2 nach *Allen Mouse Brain Atlas*. Position 3 entsprach im Median Position 76 und im Mittelwert Position 74,9 nach *Allen Mouse Brain Atlas*.

Dabei konnten in 4 von 5 SHT-Tieren B-Zellen im Cortex nachgewiesen werden, jedoch in keinem der 4 Sham-Tieren (CD19+ Zellen: $0,00 \pm 0,00$ in Sham gegenüber $94,07 \pm 33,35$ in Trauma, $P=0,0476$, *Fisher's Exact Test*, Abb. 59).

Nachfolgend wurde untersucht, inwieweit die Stärke des initialen Traumas mit der Anzahl an B-Zellen in Zusammenhang steht. Dabei zeigte sich eine signifikante und stark positive Korrelation (NSS und CD19+ Zellen: Korrelationskoeffizient $r=0,7794$, $P=0,0172$, Abb. 59).

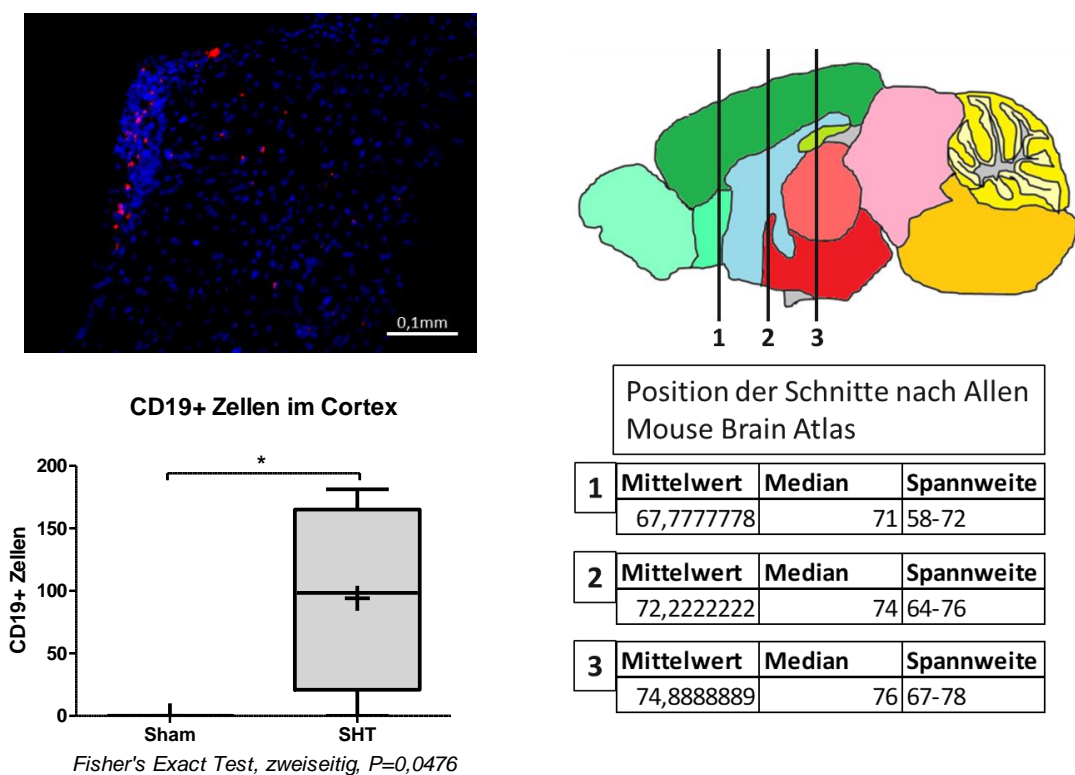


Abbildung 59: Fotografische Darstellung der *Region of Interest*, Vergleich der Anzahl an CD19+ Zellen in Sham und SHT-Tieren, Übersichtsabbildung Position 1-3

(Links oben): Fotografische Abbildung der ROI eines SHT-Tieres mit Maßstab 0,1 mm; (Links unten): Vergleich der Anzahl an CD19+ Zellen in Sham und SHT-Tieren; Sham: $n=4$, SHT: $n=5$, * $P<0,05$; (Rechts oben und unten): Graphische Darstellung als Box Plot (Horizontale Linien: Median, + Mittelwert, Boxen 25. und 75. Perzentile, Whiskers 10. und 90. Perzentile); (Rechts): Angabe der Positionen nach *Allen Mouse Brain Atlas* und Abbildung zum anatomischen Längsschnitt modifiziert nach *Allen Mouse Brain Atlas*, *Image credit: Allen Institute*. Eine Druckerlaubnis liegt nach Bestimmungen des *Allen Institute* (<https://alleninstitute.org/legal/terms-use/>) vor.

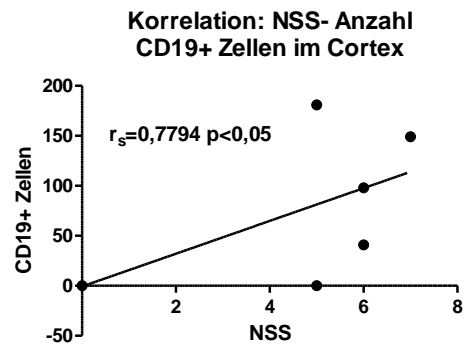


Abbildung 60: Korrelation von CD19+ Zellen im Cortex und *Neurological Severity Score* (NSS)

r_s = Spearman's rank *Rho*. Graphische Darstellung als Lineare Regression Analyse; (Alle): Sham: n=4, SHT: n=5.

3.2.3 Im Hippocampus

Dem Hippocampus kommt eine zentrale Rolle in der Verarbeitung von Lernprozessen zu. Nachdem bereits eine reaktive Vermehrung von Astrozyten und Mikroglia im Bereich des Isocortex nachgewiesen werden konnte, stellte sich nun die Frage, ob sich in der Region des Hippocampus ähnliche reaktive Prozesse abspielten.

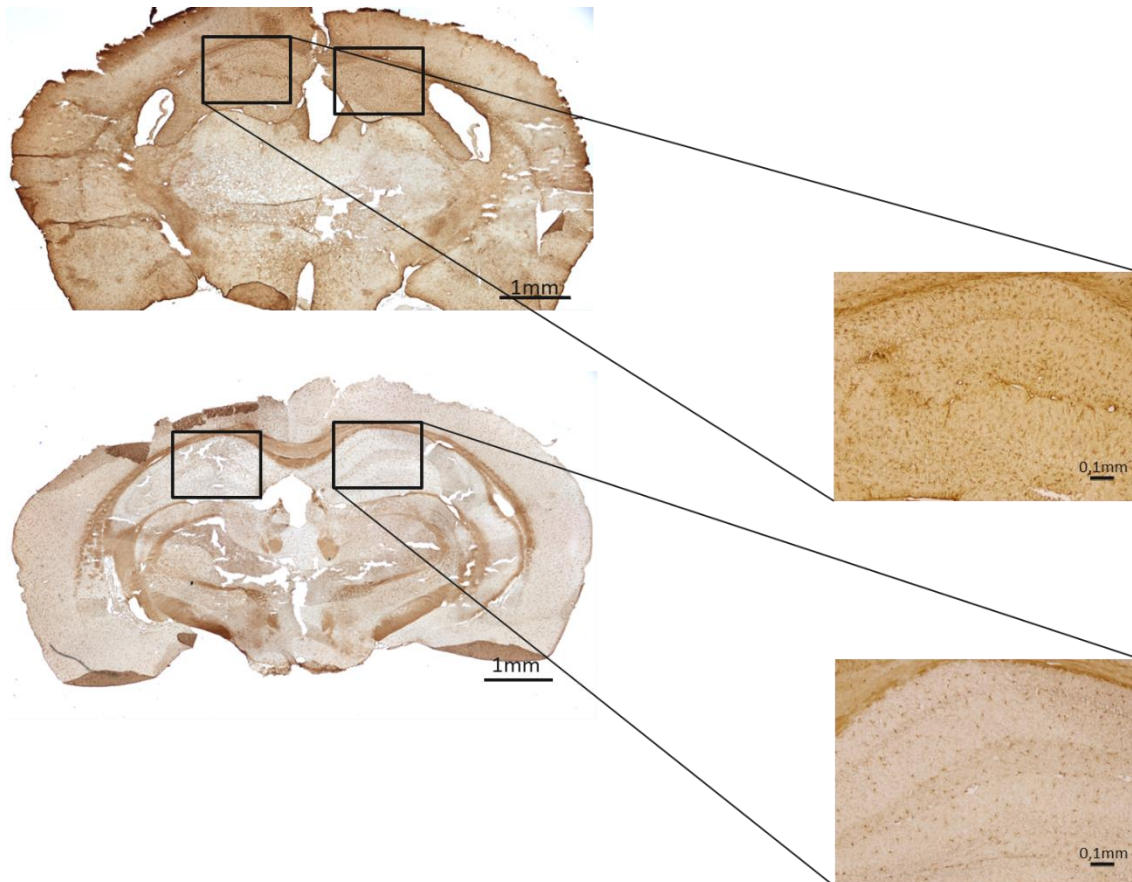


Abbildung 61: Übersichtsaufnahmen von GFAP und Iba1 mit ROI im Bereich des Hippocampus

(Oben): GFAP; (Unten): Iba1; (Alle): (Links): Übersichtsaufnahme mit Maßstab 1mm und ROI als Rechteckmarkierung; (Rechts): ROI-Aufnahme mit Maßstab 0,1 mm.

3.2.3.1 GFAP+ Zellen

Für die oben genannte Fragestellung wurde die *Region of Interest* in den Bereich des Hippocampus gelegt. Die Aufnahmen erfolgten mit einem Lichtmikroskop in zehnfacher Vergrößerung. Daraus ergab sich eine Größe von 1,28mmx 0,96mm. Untersucht wurden abermals beide Hemisphären. Die Position der Schnitte entsprach im Median Position 65 und im Mittelwert 66,5 des *Allen Mouse Brain Atlas*.

Es erfolgte eine Zählung aller GFAP+ Zellen im Bereich der ROI. Zum einen wurde untersucht, ob es in den SHT-Tieren zu einer Vermehrung GFAP+ Zellen gekommen war. Zum anderen erfolgte eine Untersuchung, ob eine stärkere Vermehrung innerhalb der Trauma Seite vorliegt oder ein globaler Effekt auf beide Hemisphären entstanden war. Für den Vergleich zwischen der Sham- und Trauma-Gruppe wurden die Werte der linken und rechten Hemisphäre addiert und anschließend verglichen. Beim Vergleich der Hemisphären wurden die linke und rechte ROI separat betrachtet.

In den SHT-Tieren zeigte sich dabei eine signifikante Erhöhung an Astrozyten in der Region des Hippocampus (GFAP+ Zellen: $623,3 \pm 21,10$ in Sham gegenüber $961,1 \pm 44,52$, $P < 0,0001$, Abb. 63).

Beim Vergleich der linken mit der rechten Hemisphäre ließ sich kein signifikanter Unterschied feststellen (GFAP+ Zellen: $485,3 \pm 22,37$ in der linken Hemisphäre gegenüber $475,9 \pm 29,39$ in der rechten Hemisphäre, $P = 0,8029$, Abb. 63).

Nachfolgend wurde der Fragestellung nachgegangen inwieweit die Stärke des Traumas mit der Anzahl an Astrozyten im Hippocampus zusammenhängt. Dabei zeigte sich eine signifikante und starke positive Korrelation zwischen NSS und der Anzahl an GFAP+ Zellen (NSS und GFAP+ Zellen: Korrelationskoeffizient $r = 0,6783$, $P = 0,0108$, Spearman, Abb. 64).

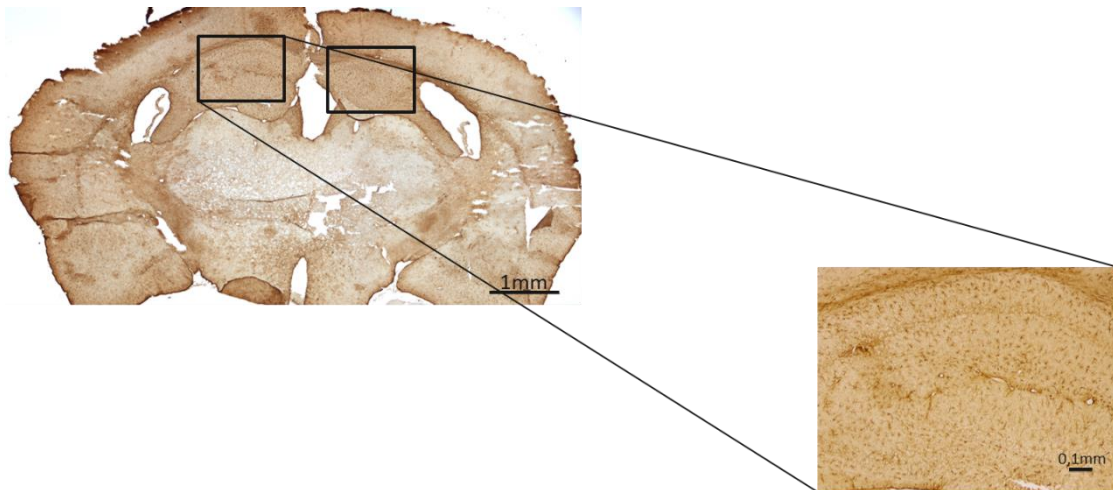


Abbildung 62: Übersichtsaufnahmen von GFAP mit ROI im Bereich der Läsion
 (Links): Übersichtsaufnahme mit Maßstab 1mm und neuroanatomische Position der ROI als Rechteckmarkierung; (Rechts): ROI-Aufnahme mit Maßstab 0,1mm.

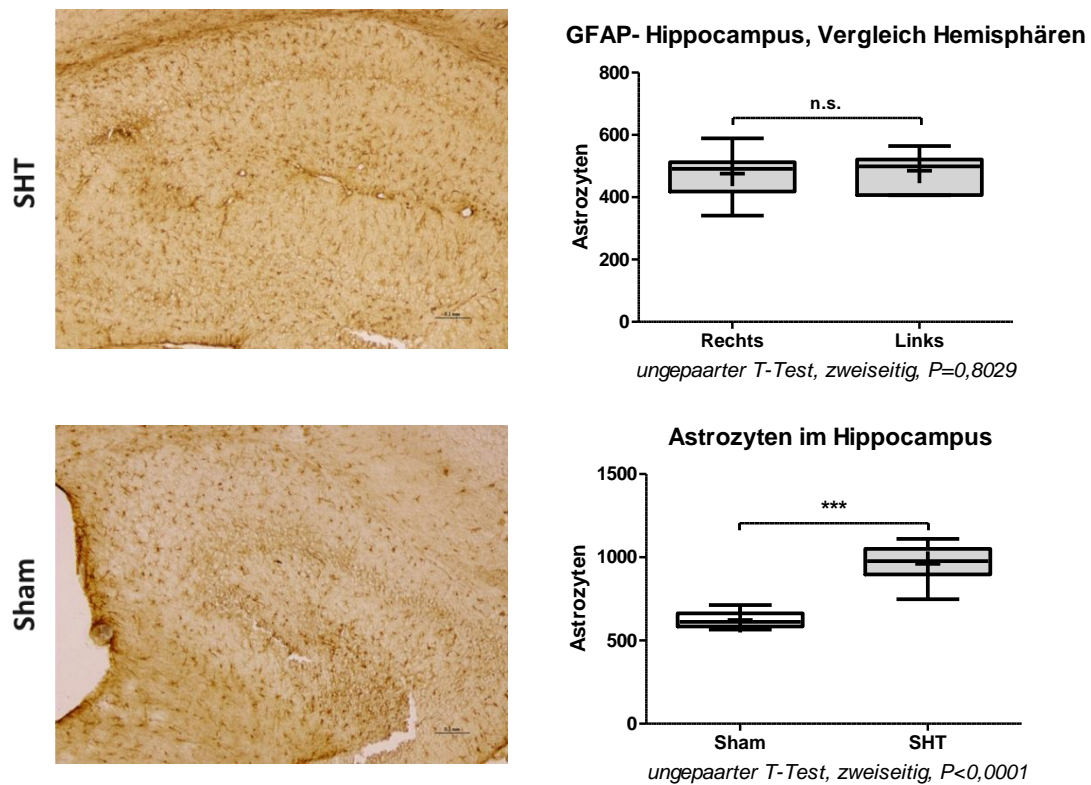


Abbildung 63: Fotografische Darstellung der *Region of Interest* in Sham und SHT und Graphen zur statistischen Auswertung von GFAP im Hippocampus
 (Links oben): Fotografische Abbildung der ROI eines SHT-Tieres in 10x Vergrößerung; (Links unten): Fotografische Abbildung der ROI eines Sham-Tieres in 10x Vergrößerung; (Rechts oben): Vergleich der rechten und linken Hemisphäre in SHT-Tieren; $n=7$, n.s. nicht signifikant; (Rechts Unten): Vergleich der Anzahl an Astrozyten im Hippocampus in Sham und SHT-Tieren; Sham: $n=6$, SHT: $n=7$, $*** P<0,001$; (Rechts oben und unten): Graphische Darstellung als Box Plot (Horizontale Linien: Median, + Mittelwert, Boxen 25. und 75. Perzentile, Whiskers 10. und 90. Perzentile).

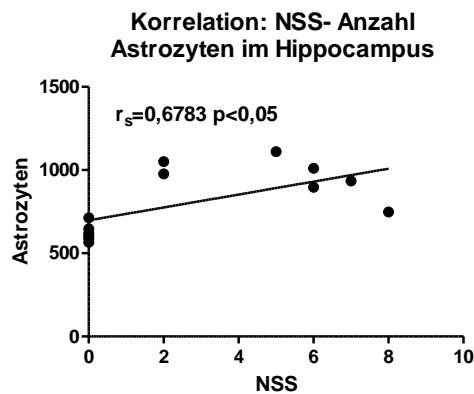


Abbildung 64: Korrelation von Astrozyten im Hippocampus und *Neurological Severity Score* (NSS)

r_s = Spearman's rank *Rho*. Graphische Darstellung als Lineare Regression Analyse; (Alle): Sham: n=6, SHT: n=7.

3.2.3.2 Iba1+ Zellen

Ebenfalls im Fokus dieser Fragestellung stand die Infiltration mit Mikroglia und Monozyten. Hierzu wurde die ROI auf den Hippocampus festgelegt. Die lichtmikroskopischen Aufnahmen entstanden in zehnfacher Vergrößerung. Draus ergab sich eine Größe der ROI von 1,28mm x 0,96mm. Die Position der Schnitte nach *Allen Mouse Brain Atlas* betrug im Median 71 und im Mittelwert 72. Gezählt wurden alle Iba1+ Zellen innerhalb der ROI. Einerseits erfolgt eine Untersuchung der Sham und Trauma Gruppe. Dazu wurden die Werte der linken und rechten Hemisphäre addiert und innerhalb der beiden Gruppen verglichen. Andererseits wurden Unterschiede zwischen den beiden Hemisphären innerhalb der SHT-Tiere untersucht. Hierfür wurden die Zählungen der linken mit denen der rechten ROI verglichen.

Im Hippocampus der SHT-Tiere zeigte sich eine signifikant erhöhte Anzahl an Iba1+Zellen (Iba1+Zellen: $314,8 \pm 18,55$ in Sham gegenüber $453,4 \pm 22,51$ in Trauma, $P=0,0007$, Abb. 66).

In der Untersuchung der beiden Hemisphären konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Iba1+ Zellen: $236,9 \pm 14,26$ in der linken Hemisphäre gegenüber $216,6 \pm 11,22$ in der rechten Hemisphäre, $P=0,5748$, Abb. 66).

Darüber hinaus wurde untersucht, inwieweit die Stärke des Traumas mit der Anzahl der Mikroglia im Hippocampus zusammenhängt. Dabei zeigte sich eine signifikante positive Korrelation (NSS und Iba1+ Zellen: Korrelationskoeffizient $r=0,5942$, $P=0,0322$, Spearman, Abb.67).

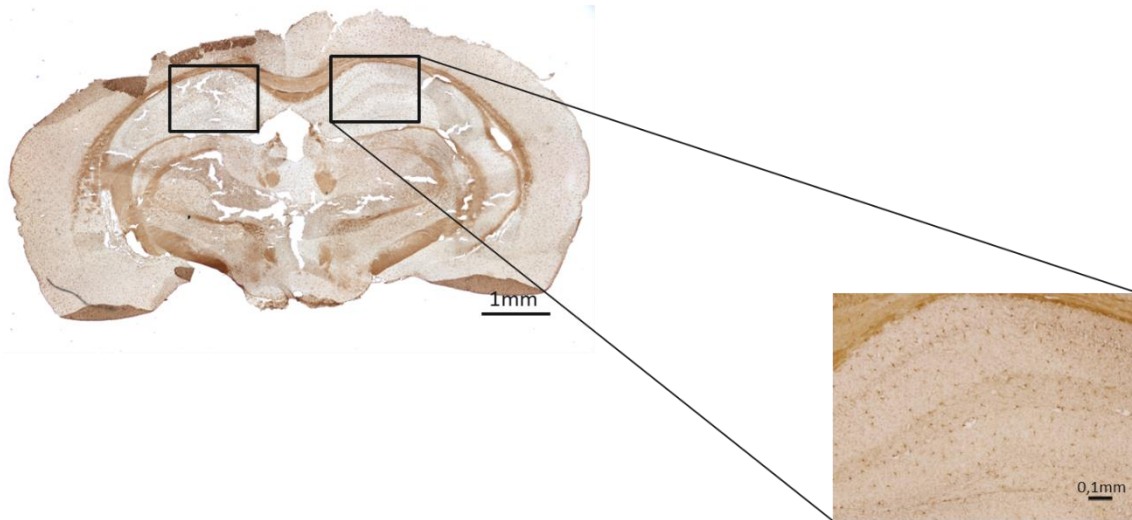


Abbildung 65: Übersichtsaufnahmen von Iba1 mit ROI im Bereich der Läsion
(Links): Übersichtsaufnahme mit Maßstab 1mm und neuroanatomische Position der ROI als Rechteckmarkierung; (Rechts): ROI-Aufnahme mit Maßstab 0,1mm.

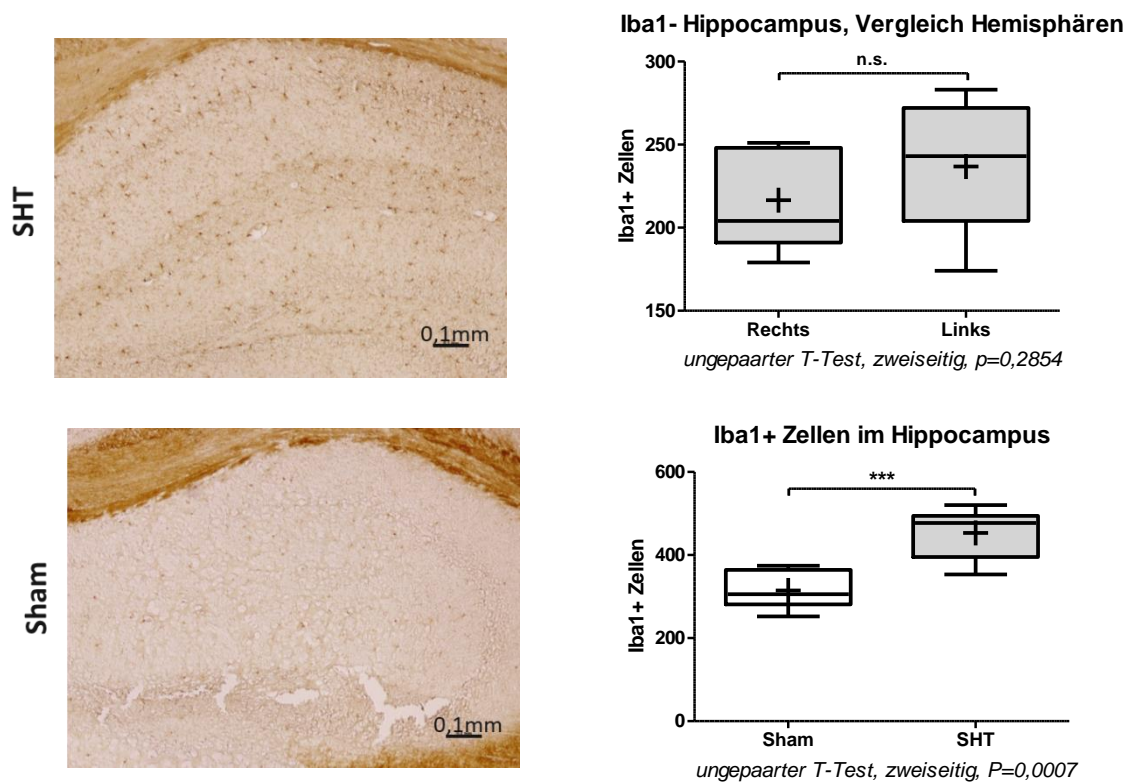


Abbildung 66: Fotografische Darstellung der *Region of Interest* in Sham und SHT und Graphen zur statistischen Auswertung von Iba1 im Hippocampus

(Links oben): Fotografische Abbildung der ROI eines SHT-Tieres in 10x Vergrößerung; (Links unten): Fotografische Abbildung der ROI eines Sham-Tieres in 10x Vergrößerung; (Rechts oben): Vergleich der rechten und linken Hemisphäre in SHT-Tieren; n=7, n.s. nicht signifikant; (Rechts unten): Vergleich der Anzahl an Iba1+ Zellen im Hippocampus in Sham und SHT-Tieren; Sham: n=6, SHT: n=7, *** P<0,001; (Rechts oben und unten): Graphische Darstellung als Box Plot (Horizontale Linien: Median, + Mittelwert, Boxen 25. und 75. Perzentile, Whiskers 10. und 90. Perzentile).

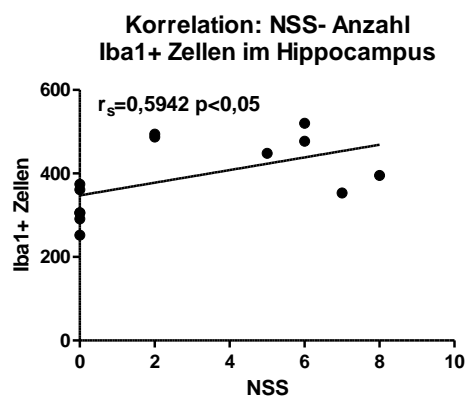


Abbildung 67: Korrelation der Anzahl an Mikroglia und Monozyten im Hippocampus und *Neurological Severity Score* (NSS)

r_s = Spearman's rank *Rho*. Graphische Darstellung als Lineare Regressionsanalyse; (Alle): Sham: n=6, SHT: n=7.

3.2.4 Korrelation zellulärer Veränderungen

3.2.4.1 Korrelation von Neuroinflammation und axonaler Schädigung

In den histologischen Färbungen ließen sich in beiden Kohorten zelluläre Veränderungen 3 Monate nach Trauma nachweisen. Dabei zeigte sich sowohl eine lokale Infiltration von Mikroglia, Astrozyten und Siderophagen im Bereich der Läsion als auch eine generalisierte erhöhte Anzahl von Mikroglia oder Makrophagen und Astrozyten im Bereich des Cortex und Hippocampus. Darüber hinaus konnte eine axonale Schädigung nachgewiesen werden. Damit ergab sich die nachfolgende Fragestellung, inwieweit diese nachgewiesene Neuroinflammation mit der axonalen Schädigung korrelierte.

Dabei zeigte sich eine positive Korrelation der Anzahl an Mikroglia und Makrophagen im Bereich des Cortex mit der axonalen Schädigung, welche knapp nicht mehr signifikant war (Iba1+ Zellen und SMI 32+-Axone: Korrelationskoeffizient $r=0,5927$, $P=0,0547$, Pearson, Abb. 68).

Ebenso konnte eine positive Korrelation der Anzahl an Astrozyten im Bereich des Cortex mit der axonalen Schädigung nachgewiesen, welche knapp nicht mehr signifikant war (GFAP+ Zellen und SMI 32+-Axone: Korrelationskoeffizient $r=0,6015$, $P=0,0503$, Pearson, Abb. 68).

Auch die Anzahl an Siderophagen wies eine starke positive und signifikante Korrelation mit der axonalen Schädigung auf (Anzahl eisenhaltiger Zellen und SMI 32+-Axone: Korrelationskoeffizient $r=0,7658$, $P=0,0060$, Pearson, Abb. 68).

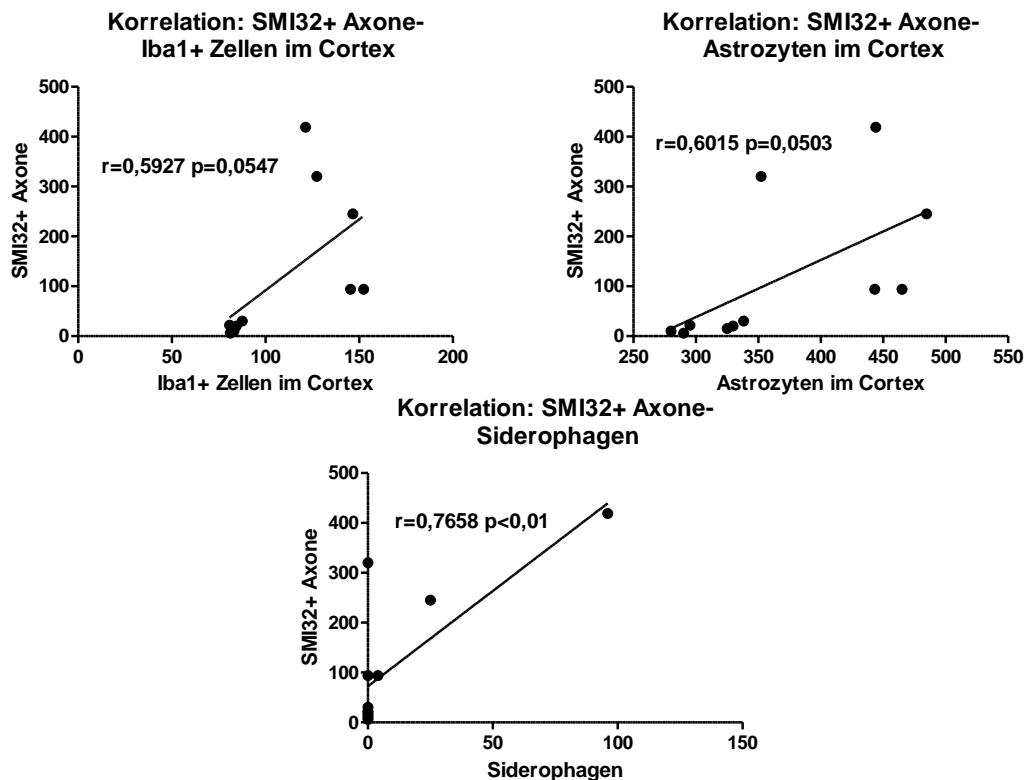


Abbildung 68: Korrelation von Neuroinflammation und axonaler Schädigung
(Oben links): Korrelation von Mikroglia und Monozyten mit axonaler Schädigung; (Oben rechts): Korrelation von Astrozyten mit axonaler Schädigung; (Unten): Korrelation der Anzahl an Siderophagen mit axonaler Schädigung; (Alle): r = Korrelationskoeffizient nach Pearson; Graphische Darstellung als Lineare Regression Analyse; Sham: $n=6$, SHT: $n=7$.

3.2.4.2 Korrelation lokaler neuroinflammatorischer Prozesse

untereinander

Weiterführend wurde auch der Fragestellung nachgegangen, inwieweit im Bereich der lokalen Inflammation die Anzahl von Astrozyten, Mikroglia und Siderophagen miteinander korreliert.

Dabei ergab sich, dass die Anzahl an Mikroglia und Makrophagen im Bereich der Läsion stark positiv und äußerst signifikant mit der Anzahl an Astrozyten korrelierte (Iba1+ Zellen und GFAP+ Zellen: Korrelationskoeffizient $r=0,9155$, $P<0.0001$, Pearson, Abb. 69).

Die Anzahl an Siderophagen zeigte jedoch nur eine schwache positive und nicht signifikante Korrelation mit der Anzahl an Astrozyten, Mikroglia und Makrophagen (Iba1+ Zellen und Anzahl eisenhaltiger Zellen:

Korrelationskoeffizient $r=0,2902$, $P=0,3867$, Pearson; GFAP+ Zellen und Anzahl eisenhaltiger Zellen: Korrelationskoeffizient $r=0,3922$, $P=0,2328$, Pearson, Abb. 69).

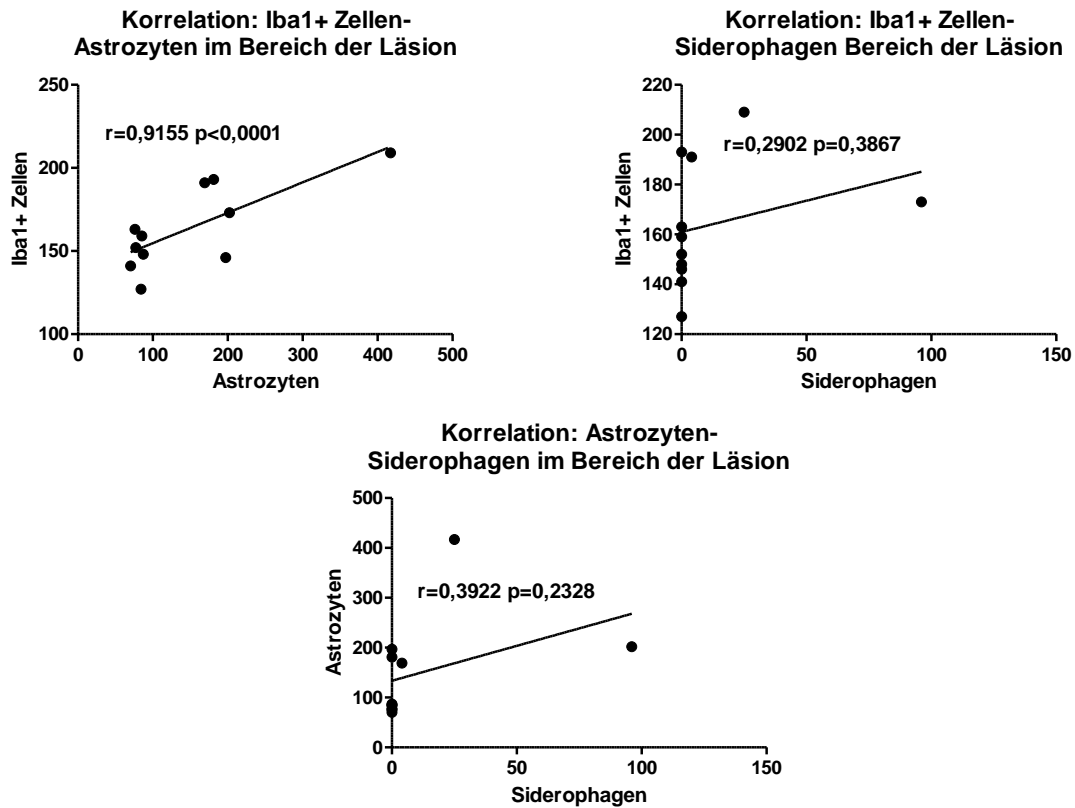


Abbildung 69: Korrelation lokaler neuroinflammatorischer Prozesse untereinander
(Oben links): Korrelation von Mikroglia und Monozyten im Bereich der Läsion mit Astrozytose;
(Oben rechts): Korrelation von Mikroglia und Monozyten mit Siderophagen; (Unten): Korrelation der Anzahl an Siderophagen mit der Anzahl an Astrozyten; (Alle): r = Korrelationskoeffizient nach Pearson; Graphische Darstellung als Lineare Regression Analyse; Sham: $n=6$, SHT: $n=7$.

3.2.4.3 Korrelation von lokaler und generalisierter

Neuroinflammation

Ebenso ergab sich die Fragestellung inwieweit eine lokale und eine generalisierte Neuroinflammation miteinander korrelierten. Dazu wurde die Anzahl an Mikroglia/Makrophagen und Astrozyten im Bereich der Läsion mit der Anzahl an Mikroglia/Makrophagen und Astrozyten im Bereich des Cortex und Hippocampus verglichen. Dabei ergab sich für die Anzahl an Mikroglia und Makrophagen eine starke positive und äußerst signifikante Korrelation (Iba1+ Zellen: im Bereich der

Läsion und Cortex: Korrelationskoeffizient $r=0,8171$, $P=0,0021$, Pearson; im Bereich der Läsion und Hippocampus: Korrelationskoeffizient $r=0,6986$, $P=0,0168$, Pearson, Abb. 70).

Auch für die Anzahl an Astrozyten ergab sich eine starke positive und äußerst signifikante Korrelation (GFAP+ Zellen: im Bereich der Läsion und Cortex: Korrelationskoeffizient $r=0,8366$, $P=0,0013$, Pearson; im Bereich der Läsion und Hippocampus: Korrelationskoeffizient $r=0,8057$, $P=0,0028$, Pearson, Abb. 71).

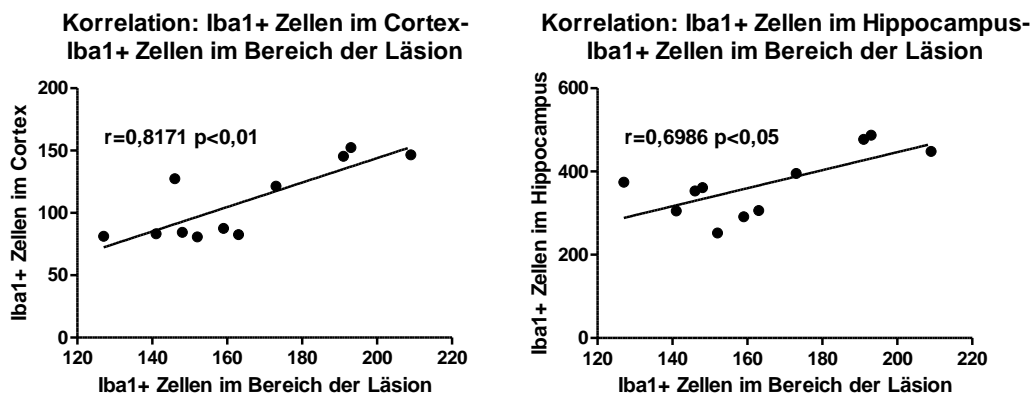


Abbildung 70: Korrelation Iba1+ Zellen im Bereich der Läsion mit Cortex und Hippocampus (Links): Korrelation der Anzahl an Mikroglia und Monozyten im Bereich der Läsion mit der Anzahl im Cortex; (Rechts): Korrelation der Anzahl an Mikroglia und Monozyten im Bereich der Läsion mit der Anzahl im Hippocampus; (Alle): r = Korrelationskoeffizient nach Pearson; Graphische Darstellung als Lineare Regression Analyse; Sham: $n=6$, SHT: $n=7$.

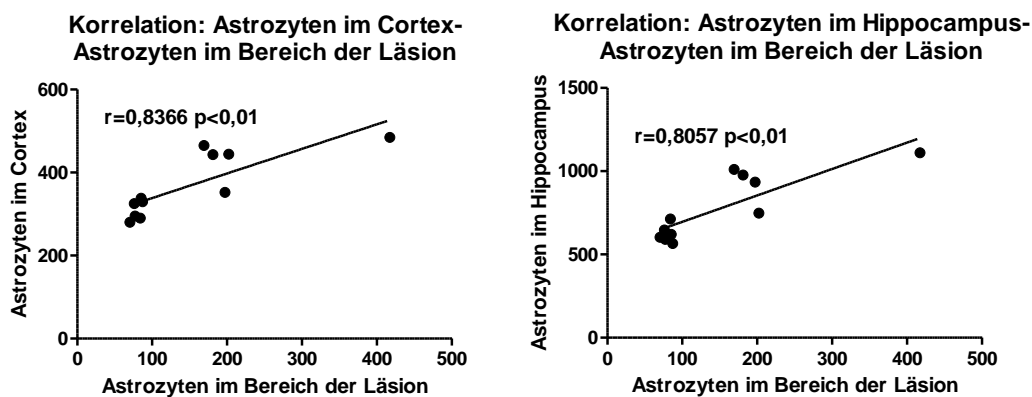


Abbildung 71: Korrelation Astrozyten im Bereich der Läsion mit Cortex und Hippocampus (Links): Korrelation der Anzahl an Astrozyten im Bereich der Läsion mit der Anzahl im Cortex; (Rechts): Korrelation der Anzahl an Astrozyten im Bereich der Läsion mit der Anzahl im Hippocampus; (Alle): r = Korrelationskoeffizient nach Pearson; Graphische Darstellung als Lineare Regression Analyse; Sham: $n=6$, SHT: $n=7$.

3.2.4.4 Korrelation von Siderophagen und Demyelinisierung

In der zweiten Kohorte, in welcher sich die Färbungen auf lokale zelluläre Prozesse im Bereich der Läsion konzentrierten, konnte ebenfalls eine erhöhte Anzahl an Siderophagen festgestellt werden, welche von einer erhöhten Anzahl an *Lipid Droplets* und einer Abnahme der Myelindichte begleitet wurde. Wir gingen daher der Fragestellung nach, inwieweit eine lokale Siderophageninfiltration mit demyelinisierenden Prozessen korrelierte. Dabei ergab sich eine positive Korrelation, welche nur beinahe nicht signifikant war (Siderophagen und *Lipid Droplets*: Korrelationskoeffizient $r=0,6057$, $P=0,0838$, Pearson, Abb. 72).

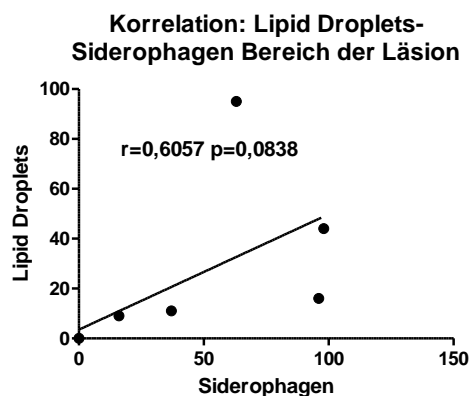


Abbildung 72: Korrelation von Siderophagen und Demyelinisierung

r = Korrelationskoeffizient nach Pearson; Graphische Darstellung als Lineare Regression Analyse; Sham: $n=4$, SHT: $n=5$.

3.3 Korrelation von zellulären Veränderungen und Verhalten

Nachdem sich in den Verhaltensexperimenten kognitive Defizite und Verhaltensauffälligkeiten ergeben hatten, wurde untersucht, inwieweit diese mit den zellulären Veränderungen im Zusammenhang stehen.

3.3.1 Räumliches Lernen

Im *IntelliCage* Versuch in der Phase des Räumlichen Lernens führten die Trauma Mäuse an Tag 2 signifikant weniger *Nosepokes* bei einem Besuch in der geöffneten Ecke aus. Dieser Parameter „*Nosepokes* pro Besuch in geöffneten Ecke“ wurde nun zusammen mit den in Kapitel 3.2. aufgeführten zellulären Veränderung untersucht. Daraus ergab sich eine signifikante und starke negative

Korrelation mit der Anzahl an Astrozyten im Bereich der Läsion, des Cortex und des Hippocampus sowie mit der Anzahl an Mikroglia im Bereich der Läsion, des Cortex und des Hippocampus (vgl. Tabelle 7 und Abb. 73 und 74). Mit der Anzahl an SMI32+ Axonen zeigte sich der Trend einer negativen Korrelation, welcher jedoch nicht signifikant war (vgl. Tabelle 7).

Tabelle 7: Korrelation vermindertes Räumliches Lernen mit zellulären Veränderungen

Nosepokes pro Besuch in geöffneter Ecke	Korrelationskoeffizient r nach Pearson	P-Wert
Iba1- Läsion	-0,6328	0,0366
GFAP- Läsion	-0,7066	0,0151
Berliner Blau-Läsion	-0,3881	0,2383
SMI 32- Cortex	-0,4530	0,1618
Iba1- Cortex	-0,7767	0,0049
GFAP Cortex	-0,8058	0,0027
Iba1- HPC	-0,8770	0,0004
GFAP-HPC	-0,7742	0,0052

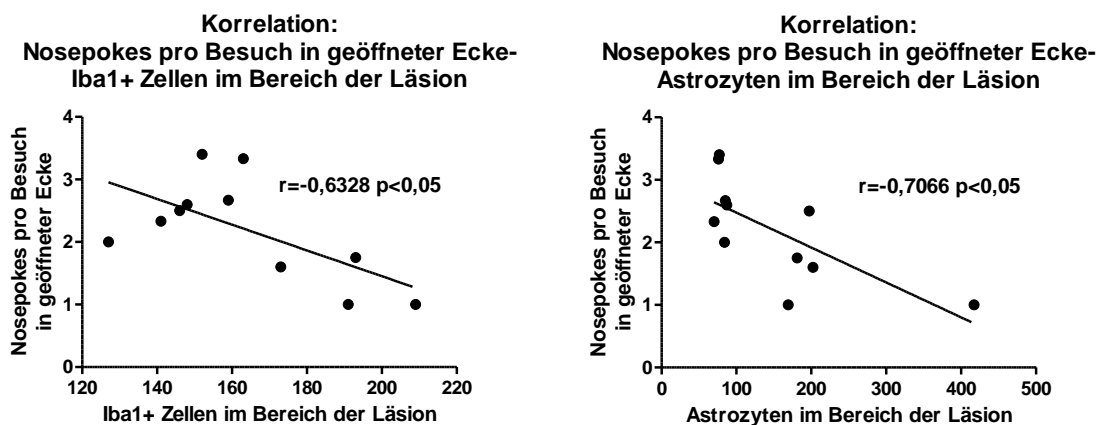


Abbildung 73: Korrelation vermindertes Räumliches Lernen mit zellulären Veränderungen (Links): Korrelation von *Nosepokes* pro Besuch in geöffneter Ecke mit der Anzahl an Mikroglia/Monozyten im Bereich der Läsion; (Rechts): *Nosepokes* pro Besuch in geöffneter Ecke mit der Anzahl an Astrozyten im Bereich der Läsion; (Alle): r = Korrelationskoeffizient nach Pearson; Graphische Darstellung als Lineare Regression Analyse; Sham: $n=6$, SHT: $n=7$.

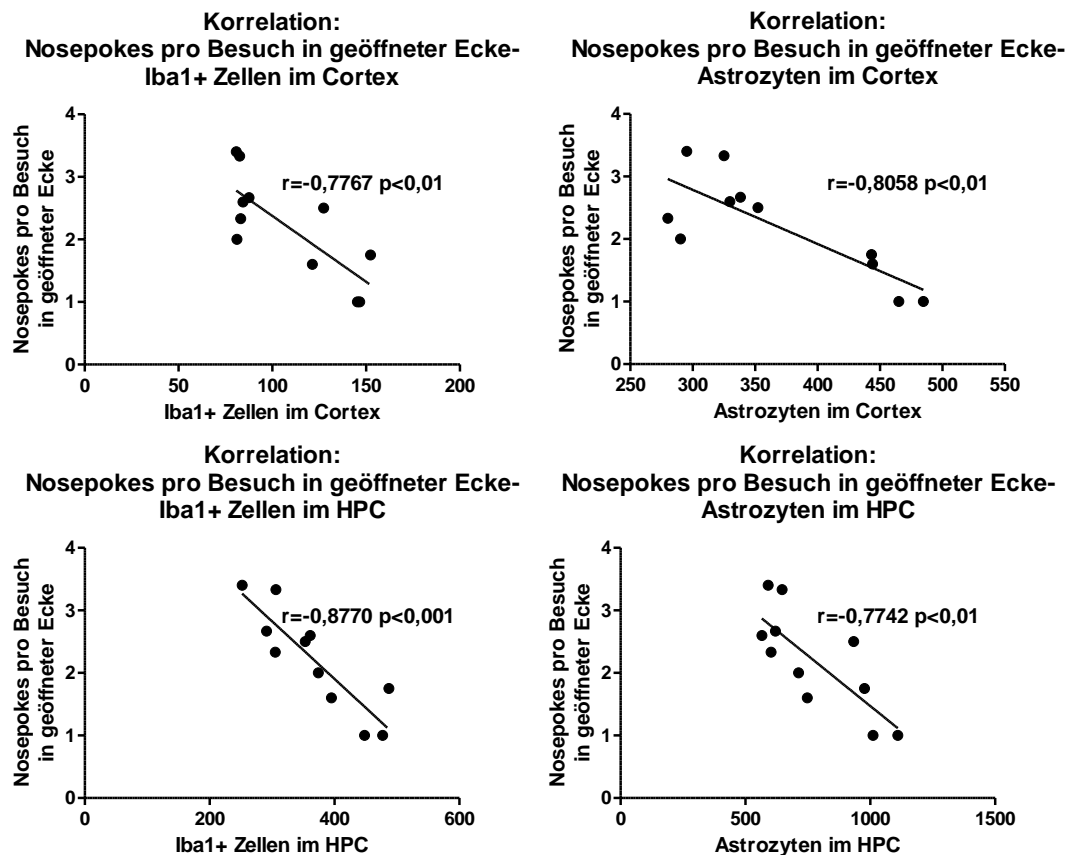


Abbildung 74: Korrelation vermindertes Räumliches Lernen mit zellulären Veränderungen (Oben links): Korrelation von *Nosepokes* pro Besuch in geöffneter Ecke mit der Anzahl an Mikroglia/Monozyten im Cortex; (Oben rechts): *Nosepokes* pro Besuch in geöffneter Ecke mit der Anzahl an Astrozyten im Cortex; (Unten links): Korrelation von *Nosepokes* pro Besuch in geöffneter Ecke mit der Anzahl an Mikroglia/Monozyten im Hippocampus; (Unten rechts): *Nosepokes* pro Besuch in geöffneter Ecke mit der Anzahl an Astrozyten im Hippocampus; (Alle): r = Korrelationskoeffizient nach Pearson; Graphische Darstellung als Lineare Regression Analyse; Sham: $n=6$, SHT: $n=7$.

3.3.2 Räumliches Umlernen

An Tag 1 der „Umlernen“ Phase im *IntelliCage* Versuch zeigten die SHT-Mäuse einen höheren Anteil an Besuchen in der nun geschlossen, aber in der Phase zuvor geöffneten Ecke. Auch hier erfolgte eine Untersuchung des Parameters zusammen mit den beobachteten zellulären Veränderungen. Dabei ergaben sich jedoch keine signifikanten Korrelationen (vgl. Tabelle 8).

Tabelle 8: Korrelation verlangsamtes Umlernen an Tag 1 mit zellulären Veränderungen

Besuche in ehemals geöffnete Ecke [%]	Korrelationskoeffizient r nach Pearson	P-Wert
Iba1- Läsion	0,1589	0,6408
GFAP- Läsion	0,2144	0,5267
Berliner Blau-Läsion	0,3364	0,3364
SMI 32- Cortex	0,05835	0,8647
Iba1- Cortex	-0,05263	0,8779
GFAP Cortex	0,01069	0,9751
Iba1- HPC	-0,03593	0,9165
GFAP-HPC	0,009112	0,9788

Darüber hinaus führten die SHT-Mäuse an Tag 1 und 2 signifikant weniger *Nosepokes* in der geöffneten Ecke aus. Weitergehend wurde auch hier analysiert, welcher Zusammenhang mit den nachgewiesenen zellulären Veränderungen besteht. An Tag 1 konnte eine annähernd signifikante und negative Korrelation mit der Anzahl an Mikroglia/Monozyten im Bereich der Läsion, des Cortex und des Hippocampus sowie mit der Anzahl an Mikroglia im Bereich des Cortex und des Hippocampus nachgewiesen werden (vgl. Tabelle 9 und Abb. 75). Mit der Anzahl an SMI32+ Axonen, sowie der Anzahl an Astrozyten im Bereich der Läsion, des Cortex und des Hippocampus zeigte sich der Trend einer negativen Korrelation, welcher jedoch nicht signifikant war (vgl. Tabelle 9).

Tabelle 9: Korrelation verlangsamtes Umlernen an Tag 1 mit zellulären Veränderungen

Nosepokes pro Besuch in geöffneter Ecke	Korrelationskoeffizient r nach Pearson	P-Wert
Iba1- Läsion	-0,3140	0,3471
GFAP- Läsion	-0,4957	0,1210
Berliner Blau-Läsion	-0,3809	0,2477
SMI 32- Cortex	-0,5094	0,1095
Iba1- Cortex	-0,5824	0,0601
GFAP Cortex	-0,5042	0,1138
Iba1- HPC	-0,5923	0,0549
GFAP-HPC	-0,4862	0,1294

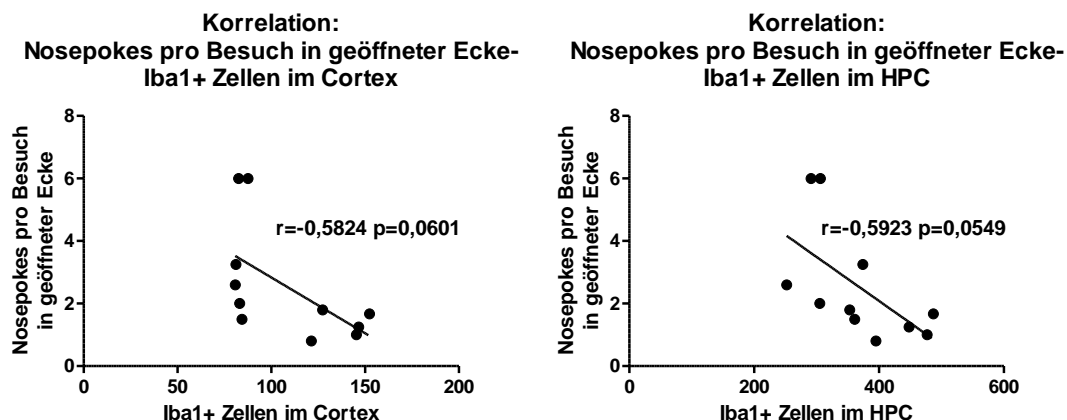


Abbildung 75: Korrelation verlangsamtes Umlernen an Tag 1 mit zellulären Veränderungen (Links): Korrelation von *Nosepokes* pro Besuch in geöffneter Ecke mit der Anzahl an Mikroglia/Monozyten im Cortex; (Rechts): *Nosepokes* pro Besuch in geöffneter Ecke mit der Anzahl an Mikroglia/Monozyten im Hippocampus; (Alle): r = Korrelationskoeffizient nach Pearson; Graphische Darstellung als Lineare Regression Analyse; Sham: $n=6$, SHT: $n=7$.

An Tag 2 konnte eine signifikante und starke negative Korrelation mit der Anzahl an Mikroglia/Monozyten im Bereich der Läsion und des Cortex, sowie der Anzahl an Astrozyten im Bereich des Cortex nachgewiesen werden (vgl. Tabelle 10 und Abb. 76 und 77). Außerdem konnte eine negative Korrelation, welche annähernd signifikant war, mit der Anzahl an Mikroglia/Monozyten im Bereich des Hippocampus gezeigt werden. Mit der Anzahl an SMI32+ Axonen, der Anzahl an Siderophagen, sowie der Anzahl an Astrozyten im Bereich der Läsion und des

Hippocampus zeigte sich der Trend einer negativen Korrelation, welche jedoch nicht signifikant war (vgl. Tabelle 10).

Tabelle 10: Korrelation verlangsamtes Umlernen an Tag 2 mit zellulären Veränderungen

Nosepokes pro Besuch in geöffneter Ecke	Korrelationskoeffizient r nach Pearson	P-Wert
Iba1- Läsion	-0,6765	0,0223
GFAP- Läsion	-0,4947	0,1219
Berliner Blau-Läsion	-0,4393	0,1765
SMI 32- Cortex	-0,4784	0,1366
Iba1- Cortex	-0,6241	0,0401
GFAP Cortex	-0,7292	0,0109
Iba1- HPC	-0,5869	0,0577
GFAP-HPC	-0,4506	0,1642

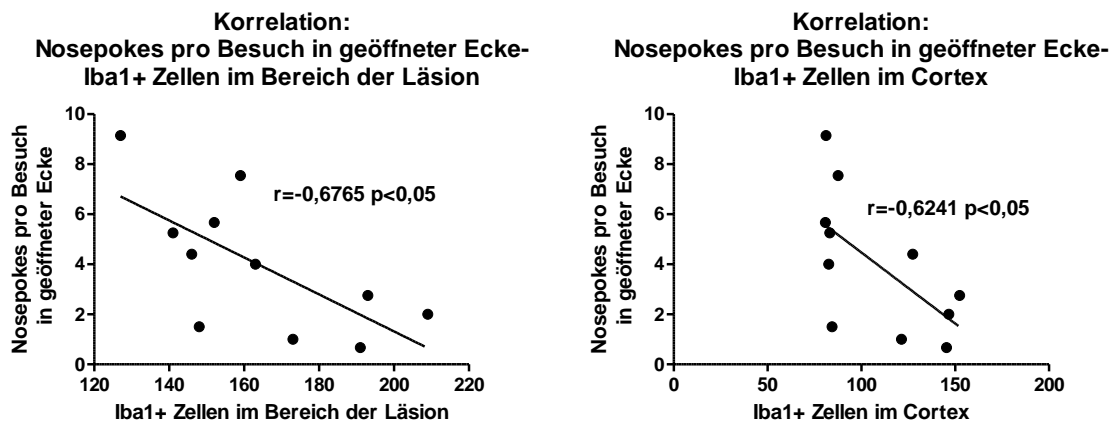


Abbildung 76: Korrelation verlangsamtes Umlernen an Tag 2 mit zellulären Veränderungen (Links): Korrelation von *Nosepokes* pro Besuch in geöffneter Ecke mit der Anzahl an Mikroglia/Monozyten im Bereich der Läsion; (Rechts): Korrelation von *Nosepokes* pro Besuch in geöffneter Ecke mit der Anzahl an Mikroglia/Monozyten im Cortex; (Alle): r = Korrelationskoeffizient nach Pearson; Graphische Darstellung als Lineare Regression Analyse; Sham: $n=6$, SHT: $n=7$.

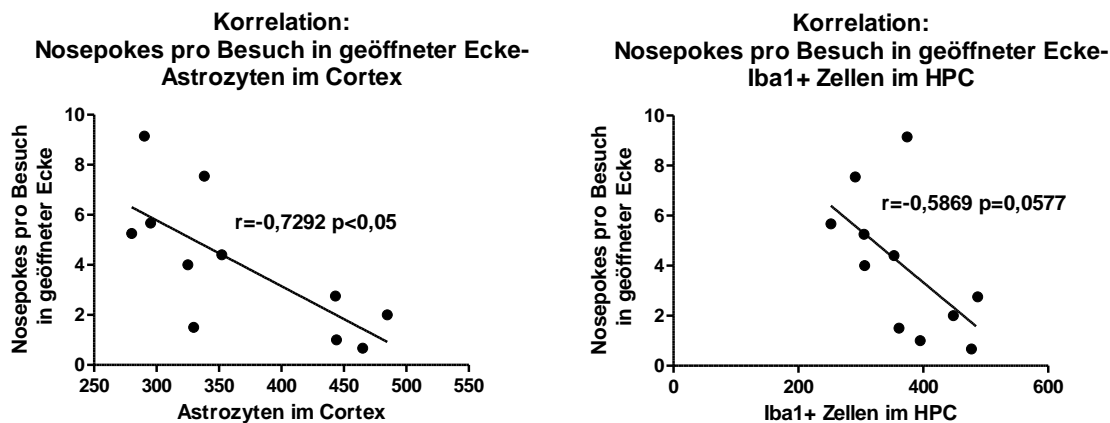


Abbildung 77: Korrelation verlangsamtes Umlernen an Tag 2 mit zellulären Veränderungen (Links): Korrelation von *Nosepokes* pro Besuch in geöffneter Ecke mit der Anzahl an Astrozyten im Cortex; (Rechts): Korrelation von *Nosepokes* pro Besuch in geöffneter Ecke mit der Anzahl an Mikroglia/Monozyten im Hippocampus; (Alle): r = Korrelationskoeffizient nach Pearson; Graphische Darstellung als Lineare Regression Analyse; Sham: $n=6$, SHT: $n=7$.

3.3.3 Auffälligkeiten im belohnungsmotivierten Handeln

In den ersten beiden Phasen des *IntelliCage* Versuchs führten die SHT-Tiere gegenüber der Vergleichsgruppe signifikant weniger *Nosepokes* aus. Nachfolgend wurde nun untersucht, ob die zellulären Veränderungen und die beschriebene Verhaltensauffälligkeit im Zusammenhang stehen. Dabei zeigte sich an Tag 1 des räumlichen Lernens eine signifikante und starke negative Korrelation mit der Anzahl an Astrozyten im Bereich der Läsion, des Cortex und des Hippocampus sowie mit der Anzahl an Mikroglia im Bereich des Cortex und des Hippocampus (vgl. Tabelle 11 und Abb. 78 und 79). Mit der Anzahl an Mikroglia im Bereich der Läsion zeigte sich der Trend einer negativen Korrelation, welcher jedoch nicht signifikant war (vgl. Tabelle 11 und Abb. 78).

Tabelle 11: Räumliches Lernen Tag1: Korrelation *Nosepokes* pro Besuch mit zellulären Veränderungen

Räumliches Lernen Tag 1 <i>Nosepokes</i> pro Besuch	Korrelationskoeffizient r nach Pearson	P-Wert
Iba1- Läsion	-0,5402	0,0862
GFAP- Läsion	-0,6509	0,0301
Berliner Blau-Läsion	0,08256	0,8093
SMI 32- Cortex	-0,3931	0,2317
Iba1- Cortex	-0,8007	0,0031
GFAP Cortex	-0,6262	0,0393
Iba1- HPC	-0,6704	0,0240
GFAP-HPC	-0,8865	0,0003

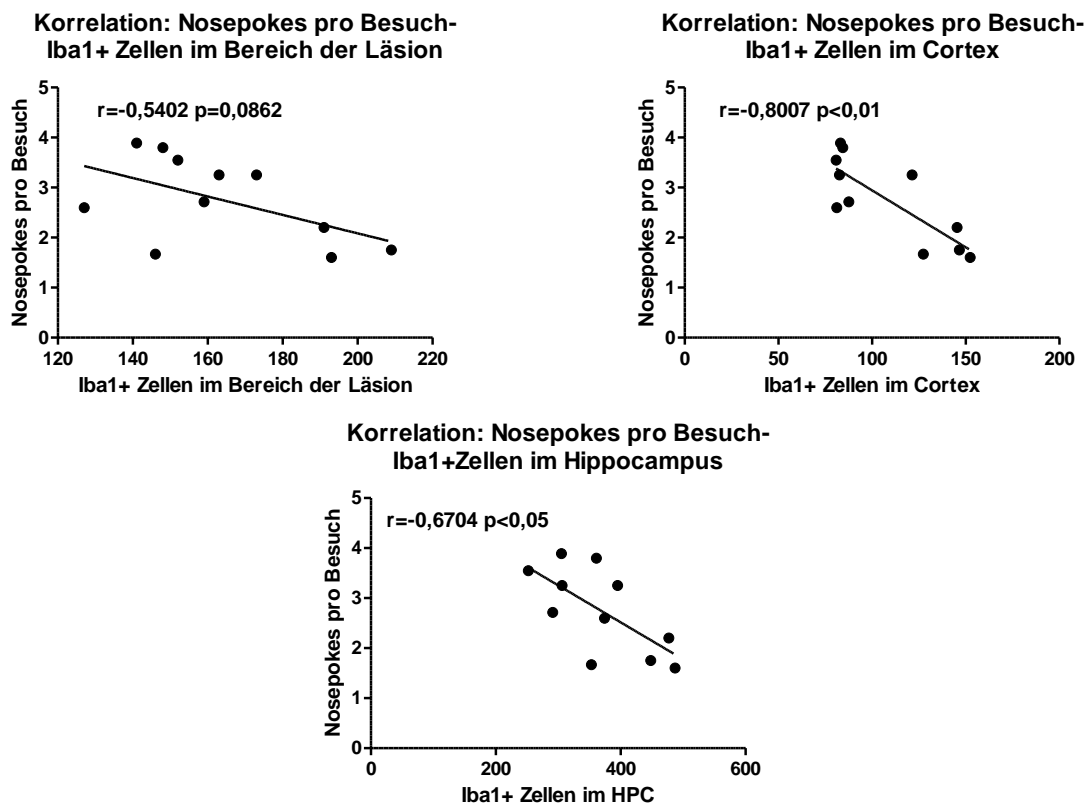


Abbildung 78: Räumliches Lernen Tag 1: Korrelation *Nosepokes* pro Besuch mit der Anzahl an Iba1+ Zellen im Bereich der Läsion, des Cortex und des Hippocampus

(Links oben): Korrelation von *Nosepokes* pro Besuch mit der Anzahl an Iba1+ Zellen im Bereich der Läsion; (Rechts oben): Korrelation von *Nosepokes* pro Besuch mit der Anzahl an Iba1+ Zellen im Cortex; (Unten): Korrelation von *Nosepokes* pro Besuch mit der Anzahl an Iba1+ Zellen im Hippocampus; (Alle): r = Korrelationskoeffizient nach Pearson; Graphische Darstellung als Lineare Regression Analyse; Sham: $n=6$, SHT: $n=7$.

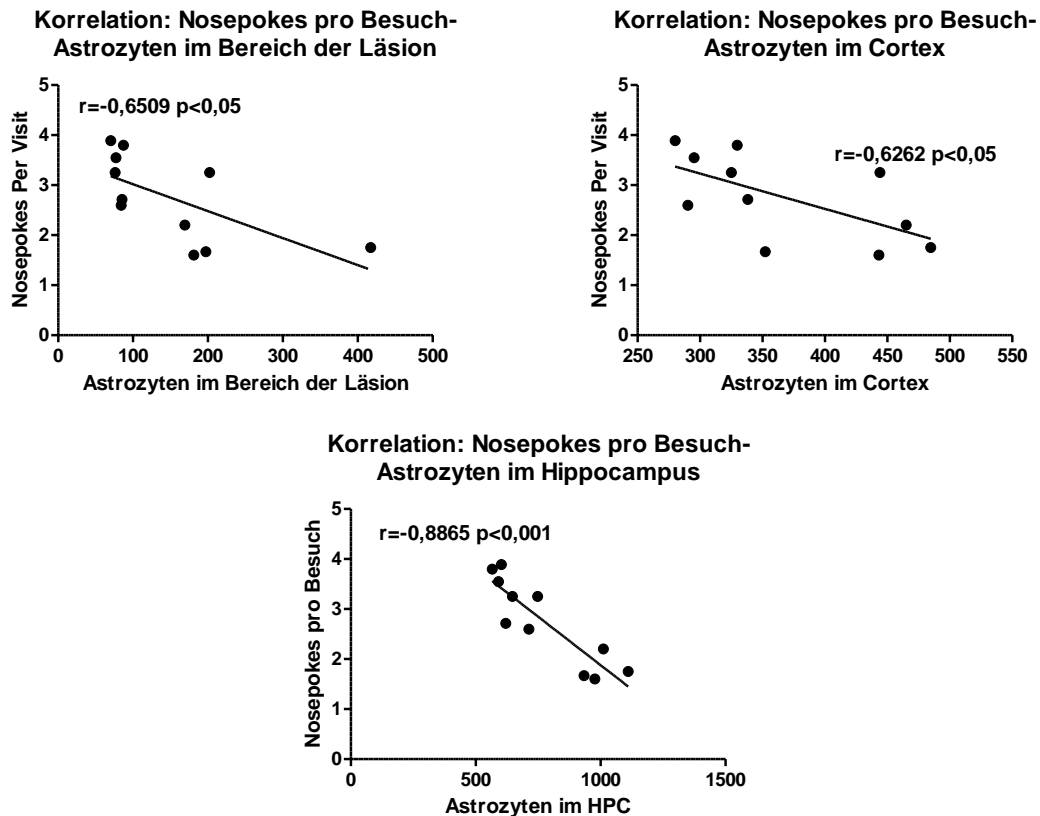


Abbildung 79: Räumliches Lernen Tag 1: Korrelation *Nosepokes* pro Besuch mit der Anzahl an Astrozyten im Bereich der Läsion, des Cortex und des Hippocampus

(Links oben): Korrelation von *Nosepokes* pro Besuch mit der Anzahl an Astrozyten im Bereich der Läsion; (Rechts oben): Korrelation von *Nosepokes* pro Besuch mit der Anzahl Astrozyten im Cortex; (Unten): Korrelation von *Nosepokes* pro Besuch mit der Anzahl an Astrozyten im Hippocampus; (Alle): r = Korrelationskoeffizient nach Pearson; Graphische Darstellung als Lineare Regression Analyse; Sham: $n=6$, SHT: $n=7$.

An Tag 2 des räumlichen Lernens zeigte sich ebenfalls eine signifikante und stark negative Korrelation mit der Anzahl an Astrozyten im Bereich der Läsion, des Cortex und des Hippocampus sowie mit der Anzahl an Mikroglia und Monozyten im Bereich des Cortex und des Hippocampus (vgl. Tabelle 12 und Abb. 80 und 81). Mit der Anzahl an Mikroglia und Monozyten im Bereich der Läsion zeigte sich der Trend einer negativen Korrelation, welcher jedoch nicht signifikant war (vgl. Tabelle 12 und Abb. 80).

Tabelle 12: Räumliches Lernen Tag 2: Korrelation *Nosepokes* pro Besuch mit zellulären Veränderungen

Räumliches Lernen Tag 2 <i>Nosepokes</i> pro Besuch	Korrelationskoeffizient r nach Pearson	P-Wert
Iba1- Läsion	-0,4645	0,1500
GFAP- Läsion	-0,6218	0,0411
Berliner Blau-Läsion	-0,1784	0,5996
SMI 32- Cortex	-0,3606	0,2760
Iba1- Cortex	-0,6912	0,0185
GFAP Cortex	-0,6638	0,0259
Iba1- HPC	-0,7952	0,0034
GFAP-HPC	-0,7406	0,0091

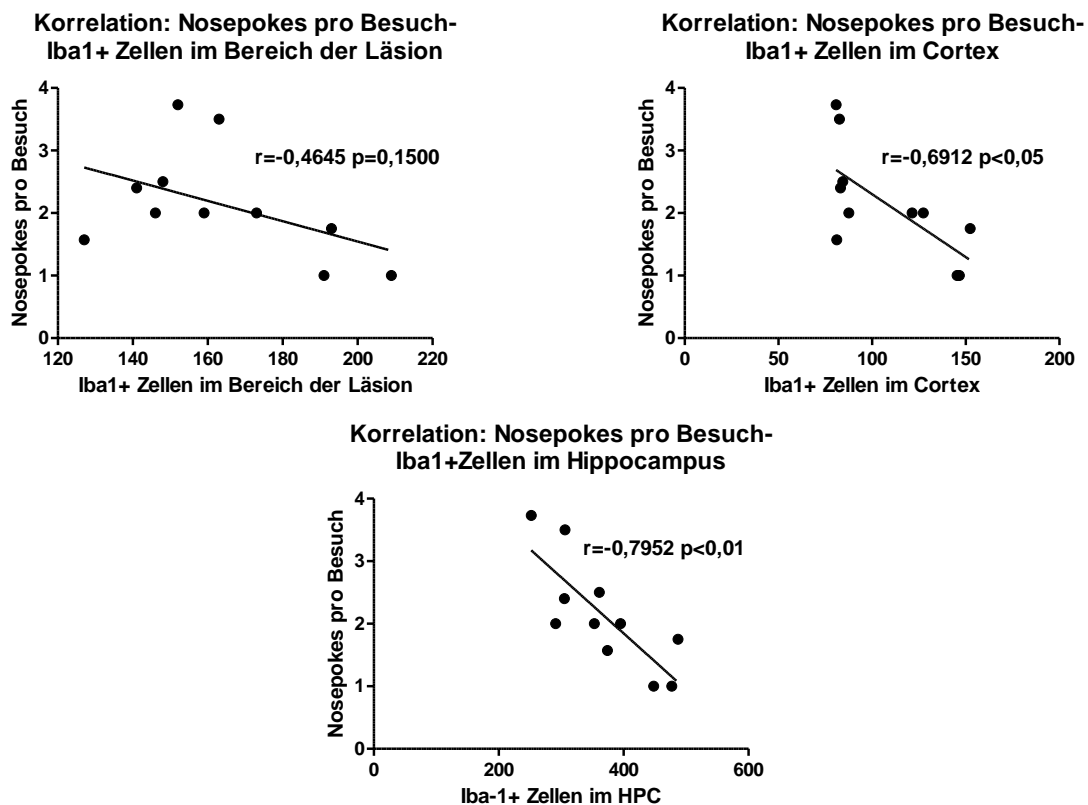


Abbildung 80: Räumliches Lernen Tag 2: Korrelation *Nosepokes* pro Besuch mit der Anzahl an Iba1+ Zellen im Bereich der Läsion, des Cortex und des Hippocampus

(Links oben): Korrelation von *Nosepokes* pro Besuch mit der Anzahl an Iba1+ Zellen im Bereich der Läsion; (Rechts oben): Korrelation von *Nosepokes* pro Besuch mit der Anzahl an Iba1+ Zellen im Cortex; (Unten): Korrelation von *Nosepokes* pro Besuch mit der Anzahl an Iba1+ Zellen im Hippocampus; (Alle): r = Korrelationskoeffizient nach Pearson; Graphische Darstellung als Lineare Regression Analyse; Sham: $n=6$, SHT: $n=7$.

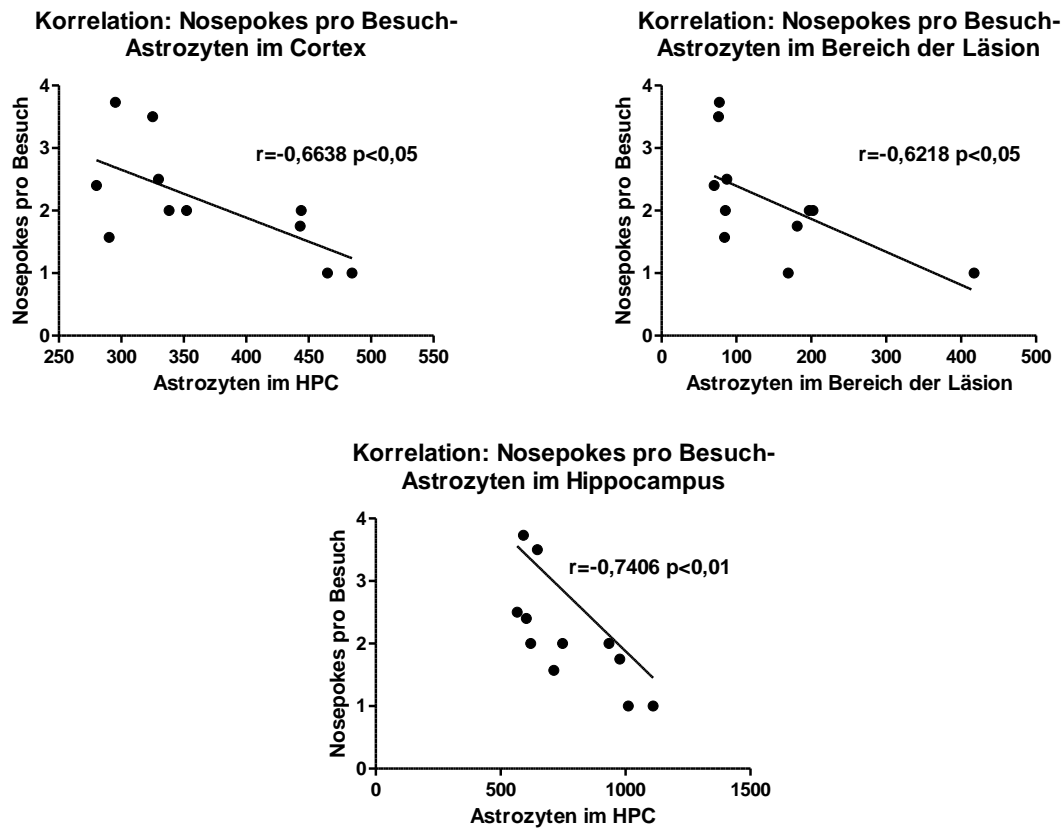


Abbildung 81: Räumliches Lernen Tag 2: Korrelation *Nosepokes* pro Besuch mit der Anzahl an Astrozyten im Bereich der Läsion, des Cortex und des Hippocampus

(Links oben): Korrelation von *Nosepokes* pro Besuch mit der Anzahl an Astrozyten im Bereich der Läsion; (Rechts oben): Korrelation von *Nosepokes* pro Besuch mit der Anzahl Astrozyten im Cortex; (Unten): Korrelation von *Nosepokes* pro Besuch mit der Anzahl an Astrozyten im Hippocampus; (Alle): r = Korrelationskoeffizient nach Pearson; Graphische Darstellung als Lineare Regression Analyse; Sham: $n=6$, SHT: $n=7$.

An Tag 3 des Räumlichen Lernens ergab sich keine signifikante Korrelation mit zellulären Veränderungen. Lediglich mit der Anzahl an Mikroglia und Monozyten im Bereich der Läsion zeigte sich der Trend einer negativen Korrelation (vgl. Tabelle 13 und Abb. 82).

Tabelle 13: Räumliches Lernen Tag 3: Korrelation *Nosepokes* pro Besuch mit zellulären Veränderungen

Räumliches Lernen Tag 3 <i>Nosepokes</i> pro Besuch	Korrelationskoeffizient <i>r</i> nach Pearson	P-Wert
Iba1- Läsion	-0,5187	0,1020
GFAP- Läsion	-0,2655	0,4301
Berliner Blau-Läsion	-0,3630	0,2725
SMI 32- Cortex	-0,2380	0,4810
Iba1- Cortex	-0,2593	0,4413
GFAP Cortex	-0,4489	0,1660
Iba1- HPC	-0,02991	0,9304
GFAP-HPC	-0,1597	0,6390

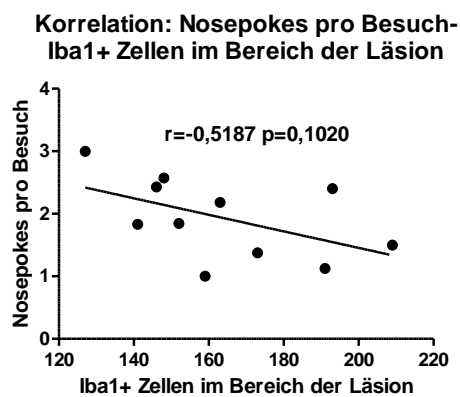


Abbildung 82: Räumliches Lernen Tag 3: Korrelation *Nosepokes* pro Besuch mit der Anzahl an Iba1+ Zellen im Bereich der Läsion

r = Korrelationskoeffizient nach Pearson; Graphische Darstellung als Lineare Regression Analyse; Sham: *n*=6, SHT: *n*=7.

An Tag 1 des Umlernens war ebenfalls keine signifikante Korrelation mit zellulären Veränderungen zu beobachten (vgl. Tabelle 14).

Tabelle 14: Umlernen Tag 1: Korrelation Nosepokes pro Besuch mit zellulären Veränderungen

Umlernen Tag 1 Nosepokes pro Besuch	Korrelationskoeffizient r nach Pearson	P-Wert
Iba1- Läsion	-0,1729	0,6112
GFAP- Läsion	-0,3649	0,2699
Berliner Blau-Läsion	0,08393	0,8062
SMI 32- Cortex	-0,1998	0,5558
Iba1- Cortex	-0,4291	0,1878
GFAP Cortex	-0,2279	0,5003
Iba1- HPC	-0,3669	0,2671
GFAP-HPC	-0,3653	0,2692

An Tag 2 des Umlernens zeigte sich eine signifikante und stark negative Korrelation mit den Astrozyten im Bereich des Cortex sowie der Anzahl an Mikroglia und Monozyten im Bereich der Läsion. Darüber hinaus war der Trend einer negativen Korrelation mit der Anzahl an Mikroglia und Monozyten im Bereich des Cortex und des Hippocampus zu beobachten (vgl. Tabelle 15 und Abb. 83).

Tabelle 15: Umlernen Tag 2: Korrelation Nosepokes pro Besuch mit zellulären Veränderungen

Umlernen Tag 2 Nosepokes pro Besuch	Korrelationskoeffizient r	P-Wert
Iba1- Läsion	-0,6920	0,0183
GFAP- Läsion	-0,4259	0,1916
Berliner Blau-Läsion	-0,4749	0,1399
SMI 32- Cortex	-0,3735	0,2578
Iba1- Cortex	-0,5596	0,0734
GFAP Cortex	-0,7160	0,0132
Iba1- HPC	-0,5909	0,0556
GFAP-HPC	-0,3863	0,2406

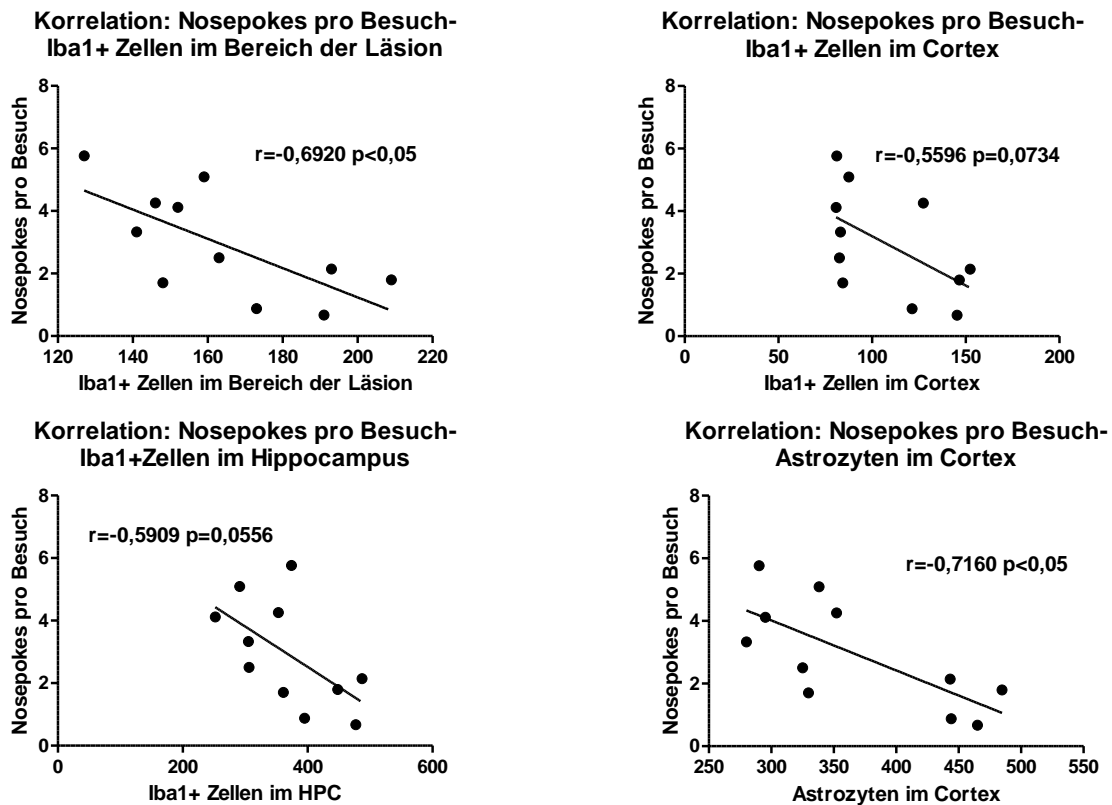


Abbildung 83: Umlernen Tag 2: Korrelation *Nosepokes pro Besuch* mit der Anzahl an *Iba1+* Zellen im Bereich der Läsion, im Cortex und im Hippocampus sowie der Anzahl an Astrozyten im Cortex

(Links oben): Korrelation von *Nosepokes pro Besuch* mit der Anzahl an *Iba1+* Zellen im Bereich der Läsion; (Rechts oben): Korrelation von *Nosepokes pro Besuch* mit der Anzahl an *Iba1+* Zellen im Cortex; (Links unten): Korrelation von *Nosepokes pro Besuch* mit der Anzahl an *Iba1+* Zellen im Hippocampus; (Rechts unten): Korrelation von *Nosepokes pro Besuch* mit der Anzahl Astrozyten im Cortex; (Alle): r = Korrelationskoeffizient nach Pearson; Graphische Darstellung als Lineare Regression Analyse; Sham: $n=6$, SHT: $n=7$.

3.3.4 Hyperaktive Verhaltensmuster

Sowohl im *Open Field*-Test als auch im *Elevated Plus Maze* konnten hyperaktive Verhaltensmuster bei den SHT-Tieren beobachtet werden. Nachfolgend wurde die Fragestellung untersucht, inwieweit diese Verhaltensmuster mit den in Kapitel 3.2 beschriebenen zellulären Veränderungen zusammenhängen.

3.3.4.1 *Open Field*

Die beiden Parameter zurückgelegte Strecke und Geschwindigkeit zeigten beide den Trend einer positiven, jedoch nicht signifikanten Korrelation mit der Anzahl an Siderophagen im Bereich der Läsion, sowie der Anzahl an SMI 32+ Axonen (vgl. Tabelle 16 und 17 sowie Abb. 84 und 85).

Tabelle 16: Open Field: Korrelation zurückgelegte Strecke mit zellulären Veränderungen

Zurückgelegte Strecke in cm	Korrelationskoeffizient r nach Pearson	P-Wert
Iba1- Läsion	0,2054	0,5008
GFAP- Läsion	0,3918	0,1855
Berliner Blau-Läsion	0,5138	0,0725
SMI 32- Cortex	0,4961	0,0847
Iba1- Cortex	0,2948	0,3282
GFAP Cortex	0,3596	0,2275
Iba1- HPC	0,2171	0,4761
GFAP-HPC	0,2003	0,5118

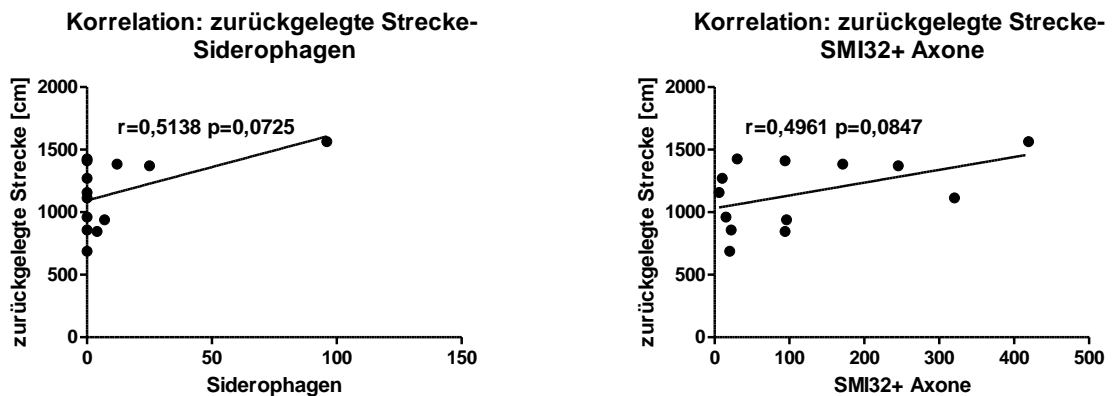


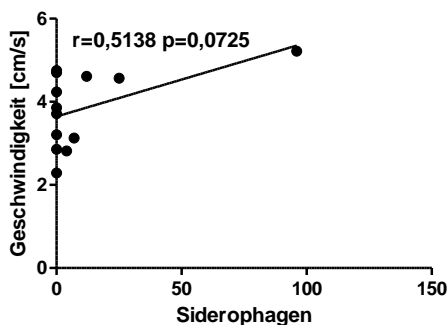
Abbildung 84: Open Field: Korrelation zurückgelegte Strecke mit der Anzahl an Siderophagen und axonaler Schädigung

(Links): Korrelation zurückgelegte Strecke mit der Anzahl an Siderophagen; (Rechts): Korrelation zurückgelegte Strecke mit der Anzahl an SMI 32+ Axonen; r = Korrelationskoeffizient nach Pearson; Graphische Darstellung als Lineare Regression Analyse; Sham: n=6, SHT: n=7.

Tabelle 17: Open Field: Korrelation Geschwindigkeit mit zellulären Veränderungen

Geschwindigkeit in cm/s	Korrelationskoeffizient r nach Pearson	P-Wert
Iba1- Läsion	0,2054	0,5008
GFAP- Läsion	0,3918	0,1855
Berliner Blau-Läsion	0,5138	0,0725
SMI 32- Cortex	0,4961	0,0847
Iba1- Cortex	0,2948	0,3282
GFAP Cortex	0,3596	0,2275
Iba1- HPC	-0,1371	0,7695
GFAP-HPC	0,2003	0,5118

Korrelation: Geschwindigkeit - Siderophagen



Korrelation: Geschwindigkeit-SMI32+ Axone

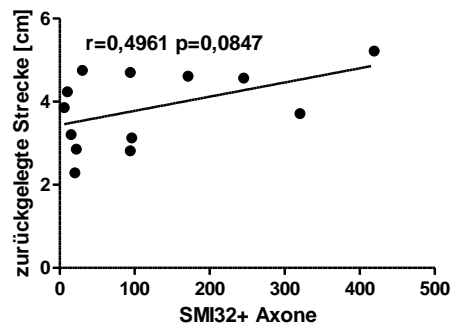


Abbildung 85: Open Field: Korrelation Geschwindigkeit mit der Anzahl an Siderophagen und axonaler Schädigung

(Links): Korrelation Geschwindigkeit mit der Anzahl an Siderophagen; (Rechts): Korrelation Geschwindigkeit mit der Anzahl an SMI 32+ Axonen; r = Korrelationskoeffizient nach Pearson; Graphische Darstellung als Lineare Regression Analyse; Sham: n=6, SHT: n=7.

3.3.4.2 Elevated Plus Maze

Im *Elevated Plus Maze* war keine signifikante Korrelation zwischen der zurückgelegten Strecke und den zellulären Veränderungen zu beachten. Es ergab sich allenfalls der Trend einer schwachen positiven Korrelation mit der Anzahl an SMI 32+ Axonen, der Anzahl an Mikroglia und Monozyten im Bereich des Cortex, sowie der Anzahl an Astrozyten im Bereich des Cortex und Hippocampus (vgl. Tabelle 18).

Tabelle 18: *Elevated Plus Maze*: Korrelation zurückgelegte Strecke mit zellulären Veränderungen

Zurückgelegte Strecke in cm	Korrelationskoeffizient r nach Pearson	P-Wert
Iba1- Läsion	0,1713	0,5758
GFAP- Läsion	0,1295	0,6732
Berliner Blau-Läsion	0,2098	0,4916
SMI 32- Cortex	0,3942	0,1826
Iba1- Cortex	0,3984	0,1776
GFAP Cortex	0,3984	0,1775
Iba1- HPC	0,3217	0,2837
GFAP-HPC	0,4176	0,1557

Die Geschwindigkeit zeigte den Trend einer positiven Korrelation mit der Anzahl an Mikroglia und Monozyten im Bereich des Cortex und der Anzahl an Astrozyten im Bereich des Hippocampus. Außerdem war der Trend einer schwachen Korrelation mit der Anzahl an SMI 32+ Axonen, der Anzahl an Astrozyten im Bereich des Cortex, sowie der Anzahl an Mikroglia im Bereich des Hippocampus zu beobachten (vgl. Tabelle 19 und Abb. 86).

Tabelle 19: *Elevated Plus Maze*: Korrelation Geschwindigkeit mit zellulären Veränderungen

Geschwindigkeit in cm/s	Korrelationskoeffizient r nach Pearson	P-Wert
Iba1- Läsion	0,2626	0,3860
GFAP- Läsion	0,2063	0,4990
Berliner Blau-Läsion	0,1987	0,5152
SMI 32- Cortex	0,4052	0,1696
Iba1- Cortex	0,4682	0,1066
GFAP Cortex	0,4601	0,1137
Iba1- HPC	0,3885	0,1896
GFAP-HPC	0,5104	0,0747

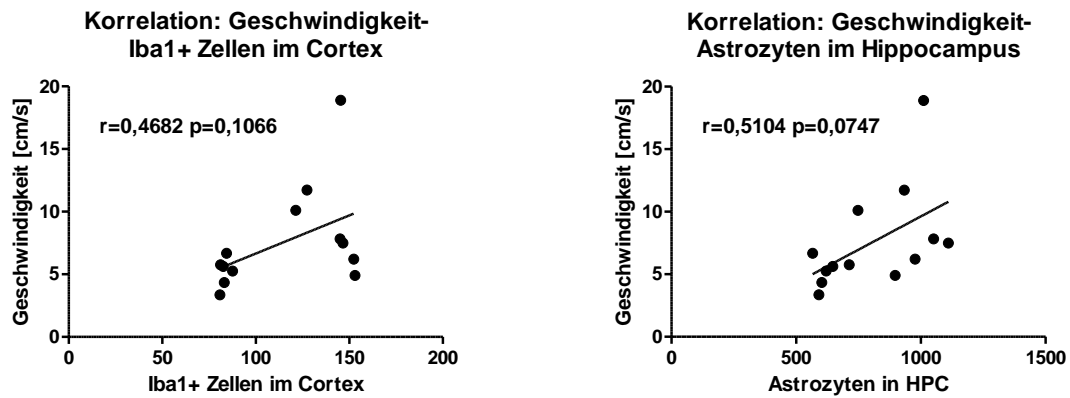


Abbildung 86: *Elevated Plus Maze*: Korrelation Geschwindigkeit mit der Anzahl an Iba1+Zellen im Cortex und der Anzahl an Astrozyten im Hippocampus

(Links): Korrelation von Geschwindigkeit mit der Anzahl an Iba1+ Zellen im Cortex; (Rechts): Korrelation von Geschwindigkeit mit der Anzahl Astrozyten im Hippocampus; (Alle): r = Korrelationskoeffizient nach Pearson; Graphische Darstellung als Lineare Regression Analyse; Sham: $n=6$, SHT: $n=7$.

4 Diskussion

4.1 Verhaltensweisen

4.1.1 Defizite im Räumlichen Lernen und Umlernen

Im IntelliCage Versuch in der Phase des Räumlichen Lernens führten die Trauma Mäuse an Tag 2 signifikant weniger *Nosepokes* bei einem Besuch in der geöffneten Ecke aus. An Tag 1 und Tag 3 zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen. Die Traumtiere erzielten also am ersten Tag noch ähnliche Ergebnisse wie die gesunde Vergleichsgruppe, konnten jedoch an Tag 2 mit der Lernkurve der gesunden Mäuse nicht mithalten, sondern benötigten einen weiteren Tag, um ähnliche Ergebnisse wie die gesunde Vergleichsgruppe zu erzielen. Aus diesen Ergebnissen lässt sich also schließen, dass Trauma Tiere einen längeren Lernprozess benötigen, um räumliche Zusammenhänge zu verstehen und diese zu erlernen.

Auch in der Phase des Umlernens führten die SHT-Mäuse an Tag 1 und 2 signifikant weniger *Nosepokes* in der geöffneten Ecke aus. Die SHT-Mäuse wiesen auch im Bereich des räumlichen Umlernens, also dem Erlernen neuer räumlicher Verknüpfungen, kognitive Defizite auf und konnten nicht mit der gesunden Vergleichsgruppe mithalten.

Des Weiteren besuchten die SHT-Mäuse an Tag 1 noch signifikant öfter die ehemalige geöffnete und nun geschlossene Ecke. An Tag 2 konnte dieses Verhalten nicht mehr beobachtet werden und beide Gruppen unterschieden sich nicht mehr.

Daraus lässt sich schließen, dass die SHT-Tiere zwar in der Lage sind alte gelernte Verhaltensmuster abzulegen. Jedoch geschieht dieser Prozess langsamer als in der gesunden Kontrollgruppe. Die kognitive Plastizität der SHT-Mäuse zeigt sich also vermindert.

Ebenfalls konnte beobachtet werden, dass eine signifikante Korrelation der kognitiven Plastizität mit der Stärke des Traumas besteht. Je stärker eine Maus initial durch das SHT betroffen war, umso schwerer fiel ihr das räumliche

Umlernen. Eine Korrelation mit zellulären Veränderungen konnte jedoch nicht nachgewiesen werden.

Zur Untersuchung von Defiziten im Bereich des räumlichen Gedächtnisses wurden von bisherigen Forschungsgruppen meist der *Morris Water Maze* Test genutzt. Dort zeigen sich vergleichbare Ergebnisse mit kognitiven Einschränkungen im Bereich des räumlichen Lernens bei Tieren nach SHT (Qiu et al. 2020; Budinich et al. 2013; Pullela et al. 2006). Eine Gegenüberstellung von *IntelliCage* und *Morris Water Maze* im Bereich des räumlichen Lernens ergab konstante Ergebnisse und eine Vergleichbarkeit der Methoden (Kiryk et al. 2020). Der Vorteil der *IntelliCage* Methode besteht jedoch in der relativ stressarmen Umgebung ohne soziale Isolation. Dies ermöglicht eine natürlichere Beobachtung von sozialem Verhalten, operanter Konditionierung und räumlichem Lernen (Kiryk et al. 2020).

Als Ursache für die beobachteten Einschränkungen wird eine Schädigung des Hippocampus insbesondere der cornu ammonis 3 (CA3) Region diskutiert. So findet sich nach SHT in CA3 eine verminderte neuronale Dichte (Chen et al. 1996). Ebenso führen gezielte Läsionen der dorsalen Hippocampusregion oder isoliert der CA3 Region zu vergleichbaren Einschränkungen (Pullela et al. 2006). Der Untergang hippocampaler Neurone wird zum einen durch apoptotische Prozesse hervorgerufen (Conti et al. 1998). Zum anderen wird auch eine anhaltende Neuroinflammation als Ursache für voranschreitenden Zelluntergang diskutiert (Grady et al. 2003; Smith et al. 1997; Simon et al. 2017). So kann noch bis zu einem Jahr eine erhöhte Aktivität von Astrozyten (Smith et al. 1997) und Mikroglia (Sargin et al. 2009) nachgewiesen werden. Auch in meiner Arbeit fanden sich in den histologischen Untersuchungen der betroffenen Tiere eine erhöhte Aktivität von Astrozyten sowie von Mikroglia und Monozyten in der Hippocampus-Region. Darüber hinaus zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen neuroinflammatorischen Veränderungen und Defiziten des räumlichen Lernens und Umlernens.

4.1.2 Episodisches Gedächtnis und Angstverhalten

In den Phasen des Episodischen Gedächtnisses konnten in den durchgeführten Experimenten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

Vorangegangene Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen konnten jedoch bei SHT-Mäusen Defizite im Bereich des episodischen Gedächtnisses nachweisen (Paterno, Metheny, and Cohen 2018; Folweiler et al. 2018). Hierbei wurde auf den *Object spatial-location recognition task* zurückgegriffen. Auch in Versuchen mit dem *water maze* Test konnten vier Wochen nach Trauma Defizite im Bereich des episodischen Gedächtnisses nachgewiesen werden (Chou et al. 2017).

Der fehlende Unterschied könnte also zum einen an der hohen Komplexität des Versuchsaufbaus im *IntelliCage* im Vergleich zu anderen Verhaltensexperimenten liegen. Zum anderen kann jedoch auch die Unterbringung beider Vergleichsgruppen in einem sozialen Gefüge in experimentellen Versuchen als *Confounder* fungieren. So zeigte sich für manche Versuchsreihen, dass eigentlich kognitiv beeinträchtigte Tier von gesunden Tieren lernen können, indem deren Verhalten imitiert wird. Erst bei getrennter Unterbringung treten die kognitiven Einschränkungen im *IntelliCage* zu Tage (Kiryk et al. 2020). Dies wäre eine mögliche Erklärung für die fehlende Unterschiede zwischen Trauma- und Sham-Mäusen in den Phasen des episodischen Gedächtnisses und Belohnungsentzugs.

Auch in den Untersuchungen zum Angstverhalten der Trauma-Tiere im *Elevated Plus Maze* konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden. Das Angstverhalten der Mäuse wurde jedoch nur zu einem Zeitpunkt nämlich 7 Wochen nach Trauma gemessen. Weiterführende Experimente zum Thema des Angstverhaltens nach SHT zeigen, dass sich dieses komplex verhält und differenzierter betrachtet werden muss (Popovitz, Mysore, and Adwanikar 2019). Popovitz et al. untersuchten dabei das Angstverhalten der Tiere 1, 3, 5 und 7 Wochen nach SHT. Dabei zeigte sich in den ersten Wochen nach Trauma ein gesteigertes Angstverhalten der SHT-Tiere. Diese Ergebnisse decken sich mit den Beobachtungen vorangegangener Versuche (Tucker et al. 2017; Almeida-Suhett et al. 2014). Einem Monat nach

Trauma kommt es jedoch zu einer Veränderung im Angstverhalten und die SHT-Tiere zeigen ein vermindertes Angstverhalten im Vergleich zur gesunden Gruppe. Auch andere Arbeitsgruppen konnten ein vermindertes Angstverhalten in SHT-Tieren zeigen (Washington et al. 2012).

Ein weiterer Einflussfaktor auf das Angstverhalten der Mäuse stellt die Schwere des Traumas da. So verglich die Arbeitsgruppe von Schwarzbald et. al. das Angstverhalten bei SHT-Gruppen mit unterschiedlicher Traumastärke 21 Tage nach Trauma. Daraus ergab sich, dass Mäuse mit einem leichten SHT ein gesteigertes Angstverhalten zeigten, während Mäuse mit einem mittelschwerem SHT keine Unterschiede im Elevated Plus Maze aufwiesen (Schwarzbald et al. 2010). Auch die Arbeitsgruppe von Siopi et al. konnte 3,5 Wochen nach Trauma keine Unterschiede im Angstverhalten nachweisen (Siopi et al. 2012). Diese Ergebnisse decken sich also mit den Beobachtungen dieser Arbeit.

4.1.3 Auffälligkeiten im belohnungsmotivierten Handeln

Im Rahmen des *IntelliCage* Versuches zeigte sich an den ersten beiden Tagen des Räumlichen Lernens und am ersten Tag des Umlernens ein signifikanter Unterschied in der Anzahl der *Nosepokes* pro Besuch zwischen der Sham und SHT-Gruppe. Die SHT-Mäuse führten dabei in jedem Besuch in einer Ecke signifikant weniger *Nosepokes* durch als die gesunde Vergleichsgruppe. An Tag 3 des Räumlichen Lernens und Tag 2 des Umlernens zeigte sich ein ähnlicher Trend, welcher jedoch knapp nicht signifikant war. In den darauffolgenden Phasen des *IntelliCage* ließ sich mit Ausnahme von Tag 4 der „Was-Wann-Wo“ Phase kein signifikanter Unterschied im Verhalten feststellen.

Eine Hypothese für das Verhalten der Trauma-Mäuse ist, dass die Tiere die *Nosepokes* eher intuitiv durchführen und nicht in direkten Zusammenhang mit der Öffnung der Tür und mit ihrer verbundenen Belohnung bringen. Wird der *Nosepoke* nicht als Teil der Reaktion wahrgenommen, die nötig ist, um Zugang zu Wasser zu erhalten, sondern lediglich der Besuch der Ecke, so bleibt eine Verstärkung der *Nosepokes* aus. Dies würde den Rückschluss zulassen, dass SHT-Mäuse kognitive Einschränkungen im Erkennen von Abläufen und der Erinnerung an diese haben. Anhalte dafür finden sich auch in der Literatur. So

können kognitive Defizite im Sinne einer Beeinträchtigung des Kurzzeit-Gedächtnisses und des räumlichen Arbeitsgedächtnisses bei SHT-Tieren bis zu 12 Monate nach Trauma noch nachgewiesen werden (Ritzel et al. 2020; Sirén et al. 2006; Mao et al. 2020).

Eine alternative Hypothese ist ein möglicher Dopaminmangel der Tiere nach SHT. In Tieren mit schwerem SHT konnte bis zu 8 Wochen nach Trauma ein verringertes Level an Dopamin im Striatum und im Cortex nachgewiesen werden (Chen et al. 2015; Rana et al. 2020). Auch klinische Studien mithilfe funktioneller Bildgebung in Form von DaT-Scans (Dopamin transporter imaging) zeigten ein verringertes kaudales Dopamin Level (Jenkins et al. 2020). Belohnungsmotiviertes Lernen findet über Dopamin vermittelte Belohnungskaskaden statt. Dabei lösen unerwartete Belohnungen einen kurzfristigen Anstieg an synaptischem Dopamin aus, während erwartete Belohnung nicht zu einer sekundären phasischen Dopamin Antwort führen (Schultz 2015). Ein variables Verstärkungsmuster sorgt so über eine erhöhte Dopaminausschüttung nach unerwartetem Erfolg für eine Verstärkung der Reaktion. Besitzt das betroffene Tier ein vermindertes Dopaminlevel, findet belohnungsmotiviertes Verhalten also nur eingeschränkt statt.

4.1.4 Hyperaktives Verhalten

Sowohl im *Open Field* Test als auch im *Elevated Plus Maze* wies die SHT-Gruppe ein hyperaktives Verhaltensmuster auf. Dies zeigte sich in einer signifikant höheren Geschwindigkeit und signifikant erhöhten zurückgelegten Strecke gegenüber der Vergleichsgruppe. Darüber hinaus konnte eine positive Korrelation dieser Hyperaktivität mit der Stärke des Traumas nachgewiesen werden.

Hyperaktive Verhaltensmuster nach einem durchgemachten SHT sind in der Literatur sowohl in klinischen Studien als auch im Tiermodell beschrieben. Gerade Kinder und Heranwachsende sind besonders vulnerable für die Entwicklung einer ADHS Symptomatik nach einem erlittenen SHT (Levin et al. 2007; Max et al. 2005a; Yeates et al. 2005). Ebenso konnte in unterschiedlichen

Tiermodellen eine vermehrte Aktivität nach SHT nachgewiesen werden (Li et al. 2006; Schwarzbald et al. 2010; Pulella et al. 2006; Sirén et al. 2006).

Als mögliche Auslöser dafür werden unter anderem Verletzungen des Subkortikalen Systems und eine diffuse axonale Schädigungen diskutiert (Tramontana et al. 2014). Dieser Zusammenhang war auch in den von mir durchgeführten Versuchen festzustellen. So zeigte sich der Trend einer positiven Korrelation mit der Anzahl an Siderophagen und dem Grad der axonalen Schädigung, welcher beinahe signifikant war.

Als weiter Auslöser für das hyperaktive Verhalten der Tiere wird eine Schädigung des räumlichen Gedächtnisses diskutiert. So sei die vermehrte Aktivität auf die Unfähigkeit eine räumliche Orientierung aufzubauen oder abzurufen zurückzuführen (Schwarzbald et al. 2010; Li et al. 2006; Sirén et al. 2006; Mao et al. 2020). Dazu passt die im *Elevated Plus Maze* angedeutete und beinahe signifikante positive Korrelation von Geschwindigkeit und der Anzahl an Astrozyten im Hippocampus. Je ausgeprägter astroglotischen Veränderungen im Hippocampus, welchem eine zentrale Rolle im räumlichen Gedächtnis zukommt, waren, desto ausgeprägteres hyperaktives Verhalten konnte beobachtet werden.

4.2 Langfristige zelluläre Veränderungen

4.2.1 Neuroinflammation

Neuroinflammation stellt in der akuten Phase einen wichtigen Mechanismus in der Beseitigung untergangenen Gewebes dar und spielt dadurch eine entscheidende Rolle in der Erholung (Simon et al. 2017; Israel et al. 2016). Langfristig überwiegen jedoch die schädlichen Einflüsse. So zeigt sich beispielsweise ein Zusammenhang von Neuroinflammation mit dem Auftreten von neurodegenerativen Erkrankungen wie der Alzheimer Erkrankung (Plassman et al. 2000; Lee et al. 2013; Wang et al. 2012). Neuroinflammation kann dabei noch Jahre nach Trauma weiter bestehen. So konnte im Rahmen funktionaler MRT-Studien noch bis zu 17 Jahre nach Trauma eine erhöhte Aktivität von Mikroglia nachgewiesen werden (Ramlackhansingh et al. 2011).

Auch in den histologischen Untersuchungen in dieser Arbeit konnte eine anhaltende Neuroinflammation drei Monate nach Trauma noch nachgewiesen werden. So zeigte sich lokal im Bereich der Läsion eine erhöhte Infiltration von Mikroglia und Monozyten, sowie Astrozyten. Zusätzlich gelang der Nachweis von demyelinisierenden Prozessen über Abbauprodukte von Myelin und einer zugleich abnehmenden Myelin-Dichte. Dies deckt sich mit bisherigen Ergebnissen vorklinischer und klinischer Studien, dass Mikrogliaaktivität mit Degeneration von weißer Substanz verknüpft ist (Mouzon et al. 2014; Glushakova, Johnson, and Hayes 2014; Smith et al. 2013).

Des Weiteren zeigte sich in den in meiner Arbeit untersuchten SHT-Tieren nicht nur lokal eine Neuroinflammation, sondern auch generalisiert im Bereich des Isocortex und des Hippocampus. So waren beide Hemisphären gleichermaßen betroffen und gingen mit einer axonalen Schädigung einher. Dabei zeigte sich eine annähernd signifikante positive Korrelation zwischen Neuroinflammation und axonaler Schädigung. Eine Autopsie-Studie zeigte ebenfalls, dass eine erhöhte Aktivität von Mikroglia zusammen mit axonaler Schädigung einherging (Smith et al. 2013).

Jedoch ist limitierend anzumerken, dass die erhöhte Anzahl an Mikroglia in den erfolgten histologischen Färbungen dieser Arbeit lediglich einen Hinweis auf eine Mikrogliaaktivierung darstellt. Neben der erhöhten Anzahl an Mikroglia ist für eine Aktivierung auch der Nachweis einer Expression bestimmter Proteine notwendig, wie beispielsweise TSPO (Moran et al. 2004; Rothwell 1997; Nakajima and Kohsaka 2004; Boutin et al. 2007).

In einer vorangegangenen Arbeit unserer Arbeitsgruppe mit dem auch in dieser Arbeit verwendeten *Weight-Drop* Model konnte jedoch eine Aktivierung von Mikroglia 7 Tage nach SHT nachgewiesen werden. Dazu wurden sowohl immunhistologische Färbungen mit Iba1 durchgeführt als auch funktionelle Bildgebung mit Ex vivo Autoradiographie zum Nachweis von TSPO. Dort konnte nachgewiesen werden, dass es zu einer erhöhten TSPO Expression und Anzahl an Mikroglia in den SHT-Tieren kommt und gleichzeitig die Anzahl an Iba1+ Mikroglia mit der TSPO Expression korreliert. Neben Mikroglia gelang auch der

Nachweis einer vermehrten Anzahl von GFAP+ Astrozyten sowie einer diffusen axonalen Schädigung, welche ebenfalls mit der TSPO Expression korrelierten (Israel et al. 2016).

Auch in einer klinischen Studie an ehemaligen professionellen American Football Spielern, welche im Laufe ihrer aktiven Karriere wiederholt ein SHT erlitten hatten, konnte mittels PET Untersuchungen eine vermehrte Anreicherung von TSPO, welches als zuverlässiger Marker für Neuroinflammation und Mikrogliaaktivierung gilt, nachgewiesen werden (Boutin et al. 2007; Coughlin et al. 2015). Gleichzeitig zeigte sich in dieser Gruppe eine Atrophie des rechten Hippocampus. In der neuropsychologischen Testung konnte in dieser Gruppe darüber hinaus auch Defizite im Bereich des sprachlichen Lernens und Gedächtnisses nachgewiesen werden. Dies zeigt auch im klinischen Setting ein Nebeneinander von Hirnatrophie, Neuroinflammation und kognitiven Defiziten.

Dies deckt sich mit den Beobachtungen im tierexperimentellen Setting dieser Arbeit. So konnte eine signifikante Korrelation von neuroinflammatorischen Veränderungen mit kognitiven Defiziten gezeigt werden. Dabei korreliert die Anzahl von Mikroglia/Monozyten, sowie Astrozyten signifikant mit den Einschränkungen im räumlichen Lernen und Umlernen, sowie Auffälligkeiten im Bereich des belohnungsmotivierten Verhaltens.

Kritisch ist jedoch anzumerken, dass in dieser Arbeit durch die Darstellung von Mikroglia bzw. Monozyten mit Iba1-Antikörpern keine Differenzierung zwischen Phänotypen wie dem M1- oder M2-Typ vorgenommen werden konnte. Dies ist von Interesse da Mikroglia je nach Phänotyp sowohl pro- also auch anti-inflammatorische Eigenschaften zugesprochen werden. So regulieren Mikroglia des M1-Phänotyps die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine nach oben, während der M2-Phänotyp die Produktion anti-inflammatorischer Zytokine anregt (Schimmel, Acosta, and Lozano 2017). Diese Zuschreibung von pro-inflammatorischen Eigenschaften zum M1-Typ und anti-inflammatorische Eigenschaften zum M2-Typ wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Es wird viel mehr von einem fließenden Spektrum mit gemischten Phänotypen ausgegangen (Simon et al. 2017; Jassam et al. 2017). Damit können Mikroglia sowohl eine

wichtige Rolle in Heilungsprozessen, aber auch in der weiteren Schädigung gesunden Gewebes spielen. Aufgrund dieser Eigenschaften sollte die Anwesenheit von Mikroglia also immer auch Kontext bezogen betrachtet werden (Jassam et al. 2017).

Neben Mikroglia kommt auch Astrozyten eine zentrale Rolle in der der Pathophysiologie des SHTs zu. So konnte eine reaktive Astrozytose in Regionen, die nach SHT von Atrophie, neuronalem Zellverlust und Degeneration betroffen sind, nachgewiesen werden insbesondere im Bereich des Hippocampus (Smith et al. 1997). Diese reaktive Astrozytose war auch in meiner Arbeit im Bereich der Läsion, im Cortex und Hippocampus nachweisbar. Darüber hinaus ging diese im Bereich der Läsion mit Demyelinisierung und im Cortex zusammen mit axonale Schädigung einher.

Zusätzlich konnte in meiner Arbeit gezeigt werden, dass Neuroinflammation positiv mit der Stärke des Traumas korrelierte. Auch mit kognitiven Defiziten konnte ein Zusammenhang nachgewiesen werden. So korrelierte Neuroinflammation mit den Auffälligkeiten im belohnungsmotivierten Verhalten, sowie Defiziten des räumlichen Lernens und Umlernens.

Dieser Zusammenhang aus chronischer Neuroinflammation und kognitiven Defiziten wurde in zahlreichen vorklinischen Versuchen belegt (Grady et al. 2003; Mouzon et al. 2014; Sun et al. 2020; Ertürk et al. 2016; Mao et al. 2020; Sirén et al. 2006). So konnte auch über 6 Monate nach SHT eine aktive Neuroinflammation beobachtet werden, welche mit depressiven Verhalten, sensomotorischen Auffälligkeiten und kognitiven Defizit einherging (Mao et al. 2020). Mikroglia zeigten eine erhöhte phagozytäre Aktivität, bei gleichzeitig erhöhtem oxidativem Level und neuronalem Zellverlust (Ritzel et al. 2020).

4.2.2 Axonale Schädigung

In den SHT-Tieren konnte eine axonale Schädigung im Bereich des Isocortex nachgewiesen werden. Trotz rechtseitigem Impact waren beide Hemisphären ähnlich stark betroffen. Ebenso ergab sich eine starke positive Korrelation der

axonalen Schädigung mit der Stärke des Traumas. Diffuse axonale Schädigung ist eine der häufigsten Nachwirkungen eines Schädel-Hirn Traumas. Interessanterweise tritt diese nicht nur bei schwerem und mittelschwerem SHT auf, sondern kann auch bei milden SHT nachgewiesen werden (Kraus et al. 2007; Johnson, Stewart, and Smith 2013). Dies erklärt sich unter anderem dadurch, dass der Grad der axonalen Schädigung nicht alleine durch den primären Unfallmechanismus in Form von Zerrung und Scherkräften, welchem Neurone ausgesetzt sind, zu erklären ist, sondern ebenso die sekundäre Aktivierung biochemischer und zellulärer Mechanismen eine wichtige Rolle spielt (Kraus et al. 2007). So zeigte sich auch in den in dieser Arbeit untersuchten SHT-Tieren neben der axonalen Schädigung eine erhöhte Neuroinflammation in Form von Mikroglia- und Monozyteninfiltration und reaktiver Astrozytose. Dabei korrelierte die axonale Schädigung positiv mit der Anzahl an Mikroglia/Monozyten und Astrozyten und war nur knapp nicht signifikant.

Eine Korrelation von axonaler Schädigung mit kognitiven Defiziten konnte in unserer Versuchsreihe nicht nachgewiesen werden. Es zeigte sich lediglich eine angedeutet positive Korrelation mit hyperaktiven Verhaltensmustern im *Open Field* Test, welche nur beinahe nicht signifikant war. Auch im *IntelliCage* Versuch wurde nur eine angedeutete Korrelation mit Defiziten des räumlichen Lernens und Umlernens nachgewiesen. Jüngere Versuchsreihen ergaben jedoch, dass die kognitive Einschränkung nach SHT nicht allein mit dem Grad der axonalen Schädigung zusammenhängt, sondern ebenso andere Faktoren wie eine beeinträchtigte synaptische Plastizität verantwortlich sind. So stehen kognitive Defizite auch in Fällen leichter oder mittelschwerer Fälle von SHT im Vordergrund, obwohl kein Zellverlust nachweisbar ist (Walker and Tesco 2013). Auch Veränderungen im Neurotransmittersystem, welche durch SHT hervorgerufen werden, beeinträchtigen die kognitive Leistungsfähigkeit (McAllister 2011).

4.2.3 Mikroblutungen, Eisenablagerungen und Demyelinisierung

Sowohl in der akuten als auch in der chronischen Phase können Mikroblutungen nach Schädel-Hirn Trauma beobachtet werden. Dies konnte sowohl in Tiermodellen (Glushakova, Johnson, and Hayes 2014; Chen et al. 1996), als

auch im Rahmen klinischer Studien nachgewiesen werden (Beauchamp et al. 2011; Hasiloglu et al. 2011; Park et al. 2009). In dieser Arbeit konnte ebenso in beiden Mausekohorten eine hohe Aktivität von Siderophagen im Bereich der Läsion nachgewiesen werden, was den Rückschluss auf stattgehabte Mikroblutungen zulässt. Darüber hinaus korrelierte die Anzahl an Siderophagen signifikant und positiv mit der Stärke des Traumas. Dieser Zusammenhang von Mikroblutung und Grad der Betroffenheit durch SHT zeigt sich auch in klinischen Studien und könnte einen möglichen Prädiktor für Hospitalisierung darstellen (Lawrence et al. 2017). In den histologischen Untersuchungen dieser Arbeit fanden sich außerdem kolokalisiert neben Siderophagen auch Abbauprodukte von Myelin, sowie eine Abnahme der Myelin-Dichte, was auf eine aktive Demyelinisierung schließen lässt. Dabei korrelierte die Anzahl der Siderophagen positiv mit den Abbauprodukten des Myelins. Ebenfalls konnte in dieser Arbeit in Kohorte 1 begleitend zu den Mikroblutungen eine erhöhte Inflammation von Mikroglia, sowie eine Glianarbenbildung durch Astrozyten im Bereich der Läsion nachgewiesen werden. Darüber hinaus zeigte sich eine äußerst signifikante und stark positive Korrelation der Anzahl an Siderophagen mit der Stärke der axonalen Schädigung. Diese beschriebene Assoziation von Mikroblutungen, inflammatorischen Prozessen und Demyelinisierung drei Monate nach Trauma wird mit mikrovaskulären Schäden und punktuellen Einbrüche der Blut-Hirn-Schranke in Zusammenhang gebracht. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Akkumulation von Eisen und Hämosiderin durch Mikroblutungen toxisch auf Nerven, Mikroglia, Astrozyten und Endothelzellen wirken (Glushakova, Johnson, and Hayes 2014). Es wird diskutiert, dass ein positiver Feedback Mechanismus zwischen Eisenablagerungen, inflammatorische Prozesse und mitochondriale Schädigung existiert. Diese interagieren synergistisch und verstärken einander, wodurch sie zu neuronalem Zelltod führen und die Pathogenese neurodegenerativer Erkrankungen vorantreiben (Urrutia, Mena, and Núñez 2014).

4.2.4 Die Rolle von B-Zellen

Die geschädigte Blut-Hirn-Schranke ermöglicht eine Einwanderung neuroimmunologischer Zellen in das Gehirn. In den SHT-Mäusen konnte in

dieser Arbeit eine Infiltration von B-Zellen drei Monate nach Trauma im Bereich des Cortex nachgewiesen werden. Auch zeigte sich eine positive und signifikante Korrelation der B-Zell Infiltration mit der Stärke des Traumas. In der Literatur wird zunehmend eine anti-inflammatorische und neuroregenerative Rolle von B-Zellen in ZNS-Läsionen diskutiert (Zhang and Popovich 2011). So wiesen B-Zell defiziente Mäuse schwerwiegendere neurologische Defizite nach SHT auf, sowie eine gesteigerte Immunreaktion im Sinne einer vermehrten Neuroinflammation von Monozyten und CD11b+ Zellen, sowie einer gesteigerten T-Zell Antwort (Daglas et al. 2019). Im Gegensatz dazu zeigte sich bei einer Injektion von SHT-Mäusen mit naiven B-Zellen ein signifikant besseres Outcome in der neurokognitiven Testung, eine Reduktion der Läsionsgröße und einer verminderten Astrozyten und Mikrogliaaktivierung im Hippocampus (Sîrbulescu et al. 2019). Als pathophysiologischer Hintergrund wäre eine Bildung „natürlicher“ Antikörper durch B-Zellen denkbar, welche ZNS-Bestandteile binden ohne negative Auswirkungen. So produzieren beispielsweise B-1-Zellen, ein eigenständiger Subtyp von B-Zellen, natürliche IgM Autoantikörper, welche dazu beitragen alternde und beschädigte Zellen zu entfernen und zugleich anti-inflammatorische Funktionen erfüllen. Zusätzlich wird natürlichen IgM Antikörpern zugeschrieben Remyelinisierung anzuregen und neuronale Apoptose zu verhindern (Zhang and Popovich 2011). B-Zellen könnten somit ein vielversprechendes Target für zukünftige neuroprotektive Therapien darstellen.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Aufgrund der langfristigen Einschränkungen und Konsequenzen von SHT spielt die Entwicklung zielgerichteter Therapien eine wichtige Rolle. Doch trotz jahrzehntelanger Forschung fehlt bislang eine derartige Therapie. Aus diesem Grund stellt eine bessere Erkenntnis der subakuten und chronischen pathophysiologischen Prozesse eine wichtige Grundlage dar. Gerade der Beginn der chronischen Phase, welcher in der Literatur mit drei Monaten angegeben wird (Qiu et al. 2020), ist von besonderem Interesse. Meine Arbeit stellt eine Übersicht von funktionellen Einschränkungen und zellulären Veränderungen in diesem kritischen Zeitraum dar.

So konnte in unserem Tiermodell zu SHT drei Monate nach Trauma Neuroinflammation nachgewiesen werden, welche sich nicht nur lokal, sondern ebenso auf den Isocortex und Hippocampus erstreckte und beide Hemisphären gleichermaßen betraf. Außerdem zeigten sich neben der lokalen Neuroinflammation auch demyelinisierende Prozesse im Bereich der Läsion. Ebenfalls konnte drei Monate nach Trauma indirekt über nachgewiesene Siderophagen auf stattgehabte Mikroblutungen geschlossen werden. Im Cortex wurde eine axonale Schädigung mit begleitender Neuroinflammation, sowie eine Infiltration neuroimmunologischer Zellen beobachtet, deren Rolle für nachfolgende Arbeiten von besonderem Interesse ist. Neben diesen zellulären Veränderungen wurden funktionale Einschränkungen der Tiere im Bereich der kognitiven Flexibilität, dem belohnungsmotivierten Verhalten, sowie der Hyperaktivität nachgewiesen. Dabei zeigte sich eine signifikante Korrelation neuroinflammatorischer Prozesse mit Einschränkungen im Räumlichen Lernen und Umlernen, sowie Auffälligkeiten im Bereich des belohnungsmotivierten Verhaltens.

Damit ordnet sich diese Arbeit in die bestehenden Erkenntnisse zur Pathophysiologie des SHTs ein und ergänzt diese weiter. Die Versuche bilden eine fundierte Übersicht über funktionale Einschränkungen, zelluläre Veränderungen und deren Zusammenhänge. Dennoch sind weitere Forschungen zu dieser Thematik nötig, um ein vielversprechendes Target für eine künftige neuroprotektive Therapie zu identifizieren.

6 **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Zeitlicher Ablauf der durchgeführten Versuche an einem Zeitstrahl	21
Abbildung 2: Weight-Drop Operation.....	22
Abbildung 3: IntelliCage.....	25
Abbildung 4: Versuchsaufbau Eingewöhnung	25
Abbildung 5: Versuchsaufbau Räumliches Lernen	26
Abbildung 6: Versuchsaufbau Räumliches Lernen	26
Abbildung 7: Versuchsaufbau Habituation.....	27
Abbildung 8: Versuchsaufbau Was-Wann-Wo.....	27
Abbildung 9: Versuchsaufbau Belohnungsentzug.....	27
Abbildung 10: Schematische Darstellung des Open Field Test.....	29
Abbildung 11: Elevated Plus Maze	30
Abbildung 12: NSS nach 1h in Kohorte 1 und 2	40
Abbildung 13: Richtige Besuche [%]: Vergleich Sham und SHT-Mäuse an Tag 1, Tag 2 und Tag 3 des Räumlichen Lernens	41
Abbildung 14: Nosepokes pro Besuch in geöffneter Ecke: Vergleich Sham und SHT-Mäuse an Tag 1, Tag 2 und Tag 3 des Räumlichen Lernens.....	42
Abbildung 15: Räumliches Lernen Tag 2: Korrelation von Nosepokes pro Besuch in geöffneter Ecke und Neurological Severity Score (NSS).....	43
Abbildung 16: Besuche in zuvor geöffneter Ecke [%]: Vergleich Sham und SHT-Mäuse an Tag 1 und Tag 2 des Umlernens	44
Abbildung 17: Richtige Besuche [%]: Vergleich Sham und SHT-Mäuse an Tag 1 und Tag 2 des Umlernens	44
Abbildung 18: Nosepokes pro Besuch in geöffneter Ecke: Vergleich Sham und SHT-Mäuse an Tag 1 und Tag 2 des Umlernens.....	45
Abbildung 19: Umlernen Tag 1 und 2: Korrelation von Neurological Severity Score (NSS) mit „Besuche in zuvor geöffneter Ecke [%]“ und „Nosepokes pro Besuch in geöffneter Ecke“	46
Abbildung 20: Habituation- Vergleich Sham und SHT-Mäuse an Tag 1 und Tag 2	47

Abbildung 21: Besuche in Zucker-Ecke [%]: Vergleich von Sham und SHT-Tieren an Tag 1, Tag 2, Tag 3 und Tag 4 der Was-Wann-Wo (WWW) Phase.....	48
Abbildung 22: Besuche in ehemaliger Zucker-Ecke [%]: Vergleich von Sham und SHT-Tieren an Tag 1, Tag 2 und Tag 3 des Belohnungsentzuges	49
Abbildung 23: Nosepokes pro Besuch: Vergleich von Sham und SHT-Tieren an Tag 1, Tag 2 und Tag 3 des Räumlichen Lernens	50
Abbildung 24: Nosepokes pro Besuch: Vergleich von Sham und SHT-Tieren an Tag 1 und Tag 2 des Umlernens.....	51
Abbildung 25: <i>Nosepokes</i> pro Besuch: Vergleich von Sham und SHT-Tieren an Tag 1 und Tag 2 der Habituation.....	52
Abbildung 26: Nosepokes pro Besuch: Vergleich von Sham und SHT-Tieren an Tag 1, Tag 2, Tag 3 und Tag 4 der Was-Wann-Wo (WWW) Phase	52
Abbildung 27: Nosepokes pro Besuch: Vergleich von Sham und SHT-Tieren an Tag 1, Tag 2 und Tag 3 des Belohnungsentzuges	53
Abbildung 28: Zeitlicher Verlauf: Nosepokes pro Besuch und Besuche in geschlossenen Ecken	55
Abbildung 29: Korrelation Nosepokes Pro Besuch mit Besuchen in geschlossener Ecke im Mittelwert über alle Phasen des IntelliCage für Sham- und SHT-Gruppe.....	Fehler! Textmarke nicht definiert.
Abbildung 30: Korrelation Nosepokes pro Besuch und Neurological Severity Score (NSS) für Tag 1, 2 und 3 des räumlichen Lernens sowie Tag 1 und 2 des Umlernens.....	57
Abbildung 31: Open Field: Vergleich von Sham und SHT-Tieren	58
Abbildung 32: Open Field: Korrelation Hyperaktives Verhalten mit Neurological Severity Score (NSS)	58
Abbildung 33: Elevated Plus Maze: Vergleich von Sham und SHT-Tieren.....	59
Abbildung 34: Elevated Plus Maze: Vergleich von Sham und SHT-Tieren.....	60
Abbildung 35: Elevated Plus Maze: Korrelation Hyperaktives Verhalten mit Neurological Severity Score (NSS).....	61
Abbildung 36: Übersichtsaufnahmen von GFAP, Iba1 und Berliner Blau mit ROI im Bereich der Läsion	62

Abbildung 37: Übersichtsaufnahmen von Berliner Blau, Red Oil O und Luxol Fast Blue mit ROI im Bereich der Läsion.....	63
Abbildung 38: Fotografische Darstellung der Region of Interest in Sham und SHT	64
Abbildung 39: Graphen zur statistischen Auswertung von GFAP im Bereich der Läsion	64
Abbildung 40: Fotografische Darstellung der Region of Interest in Sham und SHT	65
Abbildung 41: Graphen zur statistischen Auswertung von Iba1 im Bereich der Läsion	65
Abbildung 42: Fotografische Darstellung der Region of Interest in Sham und SHT	66
Abbildung 43: Graphen zur statistischen Auswertung von Siderophagen im Bereich der Läsion.....	66
Abbildung 44: Fotografische Darstellung der Region of Interest in Sham....	68
Abbildung 45: Fotografische Darstellung der Region of Interest in SHT	68
Abbildung 46: Vergleich von Siderophagen, Lipid Droplets und Demyelinisierung im Bereich der Läsion in Sham und SHT-Gruppe	68
Abbildung 47: Korrelation von Siderophagen und Lipid Droplets im Bereich der Läsion mit dem Neurological Severity Score (NSS).....	69
Abbildung 48: Übersichtsaufnahmen von SMI 32, GFAP und Iba1 mit ROI im Bereich der Läsion.....	70
Abbildung 49: Fotografische Darstellung der Region of Interest in Sham und SHT und Graphen zur statistischen Auswertung von Siderophagen im Bereich der Läsion	72
Abbildung 50: Korrelation von SMI32+ Axonen mit dem Neurological Severity Score (NSS).....	72
Abbildung 51: Übersicht GFAP Positionen 1-3.....	74
Abbildung 52: Übersichtsaufnahmen von GFAP mit ROI im Bereich der Läsion	75

Abbildung 53: Fotografische Darstellung der Region of Interest in Sham und SHT und Graphen zur statistischen Auswertung von GFAP im Cortex.....	75
Abbildung 54: Korrelation von Astrozyten im Cortex mit dem Neurological Severity Score (NSS)	76
Abbildung 55: Übersichtsabbildung Position 1-5	78
Abbildung 56: Übersichtsaufnahmen von Iba1 mit ROI im Bereich der Läsion .	79
Abbildung 57: Fotografische Darstellung der Region of Interest in Sham und SHT und Graphen zur statistischen Auswertung von Iba1 im Cortex.....	79
Abbildung 58: Korrelation von Anzahl an Mikroglia und Monozyten im Cortex und Neurological Severity Score (NSS).....	80
Abbildung 59: Fotografische Darstellung der Region of Interest, Vergleich der Anzahl an CD19+ Zellen in Sham und SHT-Tieren, Übersichtsabbildung Position 1-3	81
Abbildung 60: Korrelation von CD19+ Zellen im Cortex und Neurological Severity Score (NSS).....	82
Abbildung 61: Übersichtsaufnahmen von GFAP und Iba1 mit ROI im Bereich des Hippocampus.....	83
Abbildung 62: Übersichtsaufnahmen von GFAP mit ROI im Bereich der Läsion	85
Abbildung 63: Fotografische Darstellung der Region of Interest in Sham und SHT und Graphen zur statistischen Auswertung von GFAP im Hippocampus .	85
Abbildung 64: Korrelation von Astrozyten im Hippocampus und Neurological Severity Score (NSS)	86
Abbildung 65: Übersichtsaufnahmen von Iba1 mit ROI im Bereich der Läsion .	87
Abbildung 66: Fotografische Darstellung der Region of Interest in Sham und SHT und Graphen zur statistischen Auswertung von Iba1 im Hippocampus	88
Abbildung 67: Korrelation der Anzahl an Mikroglia und Monozyten im Hippocampus und Neurological Severity Score (NSS)	88
Abbildung 68: Korrelation von Neuroinflammation und axonaler Schädigung...	90
Abbildung 69: Korrelation lokaler neuroinflammatorischer Prozesse untereinander	91

Abbildung 70: Korrelation Iba1+ Zellen im Bereich der Läsion mit Cortex und Hippocampus.....	92
Abbildung 71: Korrelation Astrozyten im Bereich der Läsion mit Cortex und Hippocampus.....	92
Abbildung 72: Korrelation von Siderophagen und Demyelinisierung	93
Abbildung 73: Korrelation vermindertes Räumliches Lernen mit zellulären Veränderungen.....	94
Abbildung 74: Korrelation vermindertes Räumliches Lernen mit zellulären Veränderungen.....	95
Abbildung 75: Korrelation verlangsamtes Umlernen an Tag 1 mit zellulären Veränderungen.....	97
Abbildung 76: Korrelation verlangsamtes Umlernen an Tag 2 mit zellulären Veränderungen.....	98
Abbildung 77: Korrelation verlangsamtes Umlernen an Tag 2 mit zellulären Veränderungen.....	99
Abbildung 78: Räumliches Lernen Tag 1: Korrelation Nosepokes pro Besuch mit der Anzahl an Iba1+ Zellen im Bereich der Läsion, des Cortex und des Hippocampus.....	100
Abbildung 79: Räumliches Lernen Tag 1: Korrelation Nosepokes pro Besuch mit der Anzahl an Astrozyten im Bereich der Läsion, des Cortex und des Hippocampus.....	101
Abbildung 80: Räumliches Lernen Tag 2: Korrelation Nosepokes pro Besuch mit der Anzahl an Iba1+ Zellen im Bereich der Läsion, des Cortex und des Hippocampus.....	102
Abbildung 81: Räumliches Lernen Tag 2: Korrelation Nosepokes pro Besuch mit der Anzahl an Astrozyten im Bereich der Läsion, des Cortex und des Hippocampus.....	103
Abbildung 82: Räumliches Lernen Tag 3: Korrelation Nosepokes pro Besuch mit der Anzahl an Iba1+ Zellen im Bereich der Läsion	104

Abbildung 83: Umlernen Tag 2: Korrelation Nosepokes pro Besuch mit der Anzahl an Iba1+ Zellen im Bereich der Läsion, im Cortex und im Hippocampus sowie der Anzahl an Astrozyten im Cortex.....	106
Abbildung 84: Open Field: Korrelation zurückgelegte Strecke mit der Anzahl an Siderophagen und axonaler Schädigung.....	107
Abbildung 85: Open Field: Korrelation Geschwindigkeit mit der Anzahl an Siderophagen und axonaler Schädigung.....	108
Abbildung 86: Elevated Plus Maze: Korrelation Geschwindigkeit mit der Anzahl an Iba1+Zellen im Cortex und der Anzahl an Astrozyten im Hippocampus.....	110

7 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	15
Tabelle 2: Verwendete Substanzen.....	16
Tabelle 3: Verwendete Software	18
Tabelle 4: Verwendete Primärantikörper	18
Tabelle 5: Verwendete Sekundärantikörper	19
Tabelle 6: Neurological Severity Score (NSS)	23
Tabelle 7: Korrelation vermindertes Räumliches Lernen mit zellulären Veränderungen.....	94
Tabelle 8: Korrelation verlangsamtes Umlernen an Tag 1 mit zellulären Veränderungen.....	96
Tabelle 9: Korrelation verlangsamtes Umlernen an Tag 1 mit zellulären Veränderungen.....	97
Tabelle 10: Korrelation verlangsamtes Umlernen an Tag 2 mit zellulären Veränderungen.....	98
Tabelle 11: Räumliches Lernen Tag1: Korrelation Nosepokes pro Besuch mit zellulären Veränderungen	100
Tabelle 12: Räumliches Lernen Tag 2: Korrelation Nosepokes pro Besuch mit zellulären Veränderungen	102

Tabelle 13: Räumliches Lernen Tag 3: Korrelation Nosepokes pro Besuch mit zellulären Veränderungen	104
Tabelle 14: Umlernen Tag 1: Korrelation Nosepokes pro Besuch mit zellulären Veränderungen.....	105
Tabelle 15: Umlernen Tag 2: Korrelation Nosepokes pro Besuch mit zellulären Veränderungen.....	105
Tabelle 16: Open Field: Korrelation zurückgelegte Strecke mit zellulären Veränderungen.....	107
Tabelle 17: Open Field: Korrelation Geschwindigkeit mit zellulären Veränderungen.....	108
Tabelle 18: Elevated Plus Maze: Korrelation zurückgelegte Strecke mit zellulären Veränderungen.....	109
Tabelle 19: Elevated Plus Maze: Korrelation Geschwindigkeit mit zellulären Veränderungen.....	109

8 Litteraturverzeichnis

- Acosta, Sandra A., David M. Diamond, Steven Wolfe, Naoki Tajiri, Kazutaka Shinozuka, Hiroto Ishikawa, Diana G. Hernandez, Paul R. Sanberg, Yuji Kaneko, and Cesar V. Borlongan. 2013. 'Influence of post-traumatic stress disorder on neuroinflammation and cell proliferation in a rat model of traumatic brain injury', *PloS one*, 8: e81585-e85.
- Adams, J. H., D. I. Graham, and T. A. Gennarelli. 1983. 'Head injury in man and experimental animals: neuropathology', *Acta Neurochir Suppl (Wien)*, 32: 15-30.
- Albert-Weissenberger, C., C. Varrallyay, F. Raslan, C. Kleinschnitz, and A. L. Siren. 2012. 'An experimental protocol for mimicking pathomechanisms of traumatic brain injury in mice', *Exp Transl Stroke Med*, 4: 1.
- Albert-Weissenberger, Christiane, and Anna-Leena Sirén. 2010. 'Experimental traumatic brain injury', *Experimental & Translational Stroke Medicine*, 2: 16.
- Almeida-Suhett, C. P., E. M. Prager, V. Pidoplichko, T. H. Figueiredo, A. M. Marini, Z. Li, L. E. Eiden, and M. F. Braga. 2014. 'Reduced GABAergic inhibition in the basolateral amygdala and the development of anxiety-like behaviors after mild traumatic brain injury', *PloS one*, 9: e102627.

- Balasubramanian, Krishnakumar, Akihiro Maeda, Janet S. Lee, Dariush Mohammadyani, Haider Hussain Dar, Jian Fei Jiang, Claudette M. St Croix, Simon Watkins, Vladimir A. Tyurin, Yulia Y. Tyurina, Katharina Klöditz, Anastassia Polimova, Valentyna I. Kapralova, Zeyu Xiong, Prabir Ray, Judith Klein-Seetharaman, Rama K. Mallampalli, Hülya Bayir, Bengt Fadeel, and Valerian E. Kagan. 2015. 'Dichotomous roles for externalized cardiolipin in extracellular signaling: Promotion of phagocytosis and attenuation of innate immunity', *Science signaling*, 8: ra95-ra95.
- Beauchamp, M. H., M. Ditchfield, F. E. Babl, M. Kean, C. Catroppa, K. O. Yeates, and V. Anderson. 2011. 'Detecting traumatic brain lesions in children: CT versus MRI versus susceptibility weighted imaging (SWI)', *Journal of neurotrauma*, 28: 915-27.
- BioLegend. 2020. 'Purified anti-Neurofilament H (NF-H), Nonphosphorylated Antibody (Previously Covance catalog# SMI-32P)', Accessed 05.06.2020. <https://www.biolegend.com/it-it/products/purified-anti-neurofilament-h-nf-h--nonphosphorylated-antibody-11475>.
- Blatter, D. D., E. D. Bigler, S. D. Gale, S. C. Johnson, C. V. Anderson, B. M. Burnett, N. Parker, S. Kurth, and S. D. Horn. 1995. 'Quantitative volumetric analysis of brain MR: normative database spanning 5 decades of life', *American Journal of Neuroradiology*, 16: 241.
- Blatter, D. D., E. D. Bigler, S. D. Gale, S. C. Johnson, C. V. Anderson, B. M. Burnett, D. Ryser, S. E. Macnamara, and B. J. Bailey. 1997. 'MR-based brain and cerebrospinal fluid measurement after traumatic brain injury: correlation with neuropsychological outcome', *AJNR Am J Neuroradiol*, 18: 1-10.
- Boutin, H., F. Chauveau, C. Thominiaux, M. C. Grégoire, M. L. James, R. Trebossen, P. Hantraye, F. Dollé, B. Tavitian, and M. Kassiou. 2007. '11C-DPA-713: a novel peripheral benzodiazepine receptor PET ligand for in vivo imaging of neuroinflammation', *J Nucl Med*, 48: 573-81.
- Brezova, Veronika, Kent Gøran Moen, Toril Skandsen, Anne Vik, James B. Brewer, Øyvind Salvesen, and Asta K. Håberg. 2014. 'Prospective longitudinal MRI study of brain volumes and diffusion changes during the first year after moderate to severe traumatic brain injury', *NeuroImage: Clinical*, 5: 128-40.
- Budinich, C. S., L. B. Tucker, D. Lowe, J. G. Rosenberger, and J. T. McCabe. 2013. 'Short and long-term motor and behavioral effects of diazoxide and dimethyl sulfoxide administration in the mouse after traumatic brain injury', *Pharmacol Biochem Behav*, 108: 66-73.
- Bundesgesetzblatt. Jahrgang 2007. 'Verordnung zu der Annahmeerklärung vom 15. Juni 2006 über die Änderung von Anhang A des Europäischen Übereinkommens zum Schutz der für Versuche und andere wissenschaftliche Zwecke verwendeten Wirbeltiere', *Bundesgesetzblatt*, Teil II Nr 37.
- Burda, Joshua E., Alexander M. Bernstein, and Michael V. Sofroniew. 2016. 'Astrocyte roles in traumatic brain injury', *Experimental Neurology*, 275: 305-15.
- Burda, Joshua E., and Michael V. Sofroniew. 2014. 'Reactive gliosis and the multicellular response to CNS damage and disease', *Neuron*, 81: 229-48.

- Carroll, Linda, J. David Cassidy, Paul Peloso, Jörgen Borg, Hans Holst, Lena Holm, Chris Paniak, and Michel Pépin. 2004. 'Prognosis for mild traumatic brain injury: Results of the WHO Collaborating Centre Task Force on Mild Traumatic Brain Injury', *Journal of rehabilitation medicine : official journal of the UEMS European Board of Physical and Rehabilitation Medicine*, 43: 84-105.
- Chen, M. K., and T. R. Guilarte. 2008. 'Translocator protein 18 kDa (TSPO): molecular sensor of brain injury and repair', *Pharmacol Ther*, 118: 1-17.
- Chen, Y., S. Constantini, V. Trembovler, M. Weinstock, and E. Shohami. 1996. 'An experimental model of closed head injury in mice: pathophysiology, histopathology, and cognitive deficits', *Journal of neurotrauma*, 13: 557-68.
- Chen, Y. H., E. Y. Huang, T. T. Kuo, H. I. Ma, B. J. Hoffer, P. F. Tsui, J. J. Tsai, Y. C. Chou, and Y. H. Chiang. 2015. 'Dopamine Release Impairment in Striatum After Different Levels of Cerebral Cortical Fluid Percussion Injury', *Cell Transplant*, 24: 2113-28.
- Cheng, Gang, Rong-hua Kong, Lei-ming Zhang, and Jian-ning Zhang. 2012. 'Mitochondria in traumatic brain injury and mitochondrial-targeted multipotential therapeutic strategies', *British journal of pharmacology*, 167: 699-719.
- Chou, A., K. Krukowski, T. Jopson, P. J. Zhu, M. Costa-Mattioli, P. Walter, and S. Rosi. 2017. 'Inhibition of the integrated stress response reverses cognitive deficits after traumatic brain injury', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114: E6420-e26.
- Chu, Charleen T., Jing Ji, Ruben K. Dagda, Jian Fei Jiang, Yulia Y. Tyurina, Alexandr A. Kapralov, Vladimir A. Tyurin, Naveena Yanamala, Indira H. Shrivastava, Dariush Mohammadyani, Kent Zhi Qiang Wang, Jianhui Zhu, Judith Klein-Seetharaman, Krishnakumar Balasubramanian, Andrew A. Amoscato, Grigory Borisenko, Zhentai Huang, Aaron M. Gusdon, Amin Cheikhi, Erin K. Steer, Ruth Wang, Catherine Baty, Simon Watkins, Ivet Bahar, Hülya Bayır, and Valerian E. Kagan. 2013. 'Cardiolipin externalization to the outer mitochondrial membrane acts as an elimination signal for mitophagy in neuronal cells', *Nature Cell Biology*, 15: 1197-205.
- Conti, Alana C., Ramesh Raghupathi, John Q. Trojanowski, and Tracy K. McIntosh. 1998. 'Experimental Brain Injury Induces Regionally Distinct Apoptosis during the Acute and Delayed Post-Traumatic Period', *The Journal of Neuroscience*, 18: 5663.
- Corps, Kara N., Theodore L. Roth, and Dorian B. McGavern. 2015. 'Inflammation and neuroprotection in traumatic brain injury', *JAMA neurology*, 72: 355-62.
- Coughlin, Jennifer M., Yuchuan Wang, Cynthia A. Munro, Shuangchao Ma, Chen Yue, Shaojie Chen, Raag Airan, Pearl K. Kim, Ashley V. Adams, Cinthya Garcia, Cecilia Higgs, Haris I. Sair, Akira Sawa, Gwenn Smith, Constantine G. Lyketsos, Brian Caffo, Michael Kassiou, Tomas R. Guilarte, and Martin G. Pomper. 2015. 'Neuroinflammation and brain atrophy in former NFL players: An in vivo multimodal imaging pilot study', *Neurobiology of Disease*, 74: 58-65.
- Crane, P. K., L. E. Gibbons, K. Dams-O'Connor, E. Trittschuh, J. B. Leverenz, C. D. Keene, J. Sonnen, T. J. Montine, D. A. Bennett, S. Leurgans, J. A. Schneider, and E. B. Larson. 2016. 'Association of Traumatic Brain Injury With Late-Life

- Neurodegenerative Conditions and Neuropathologic Findings', *JAMA Neurol*, 73: 1062-9.
- Crawley, J. N. 1999. 'Behavioral phenotyping of transgenic and knockout mice: experimental design and evaluation of general health, sensory functions, motor abilities, and specific behavioral tests', *Brain Res*, 835: 18-26.
- Daglas, M., D. F. Draxler, H. Ho, F. McCutcheon, A. Galle, A. E. Au, P. Larsson, J. Gregory, F. Alderuccio, M. Sashindranath, and R. L. Medcalf. 2019. 'Activated CD8(+) T Cells Cause Long-Term Neurological Impairment after Traumatic Brain Injury in Mice', *Cell Rep*, 29: 1178-91.e6.
- Deb, S., I. Lyons, C. Koutzoukis, I. Ali, and G. McCarthy. 1999. 'Rate of psychiatric illness 1 year after traumatic brain injury', *Am J Psychiatry*, 156: 374-8.
- Dere, Ekrem, Alexander Easton, Lynn Nadel, and Joe P Huston. 2008. *Handbook of episodic memory* (Elsevier).
- Dinkel, J., A. Drier, O. Khalilzadeh, V. Perlberg, V. Czernecki, R. Gupta, F. Gomas, P. Sanchez, D. Dormont, D. Galanaud, R. D. Stevens, and L. Puybasset. 2014. 'Long-Term White Matter Changes after Severe Traumatic Brain Injury: A 5-Year Prospective Cohort', *American Journal of Neuroradiology*, 35: 23.
- Ertürk, Ali, Susanne Mentz, Erik E. Stout, Maj Hedehus, Sara L. Dominguez, Lisa Neumaier, Franziska Krammer, Gemma Llovera, Karpagam Srinivasan, David V. Hansen, Arthur Liesz, Kimberly A. Scarce-Lavie, and Morgan Sheng. 2016. 'Interfering with the Chronic Immune Response Rescues Chronic Degeneration After Traumatic Brain Injury', *The Journal of Neuroscience*, 36: 9962.
- Farbota, K. D., B. B. Bendlin, A. L. Alexander, H. A. Rowley, R. J. Dempsey, and S. C. Johnson. 2012. 'Longitudinal diffusion tensor imaging and neuropsychological correlates in traumatic brain injury patients', *Front Hum Neurosci*, 6: 160.
- Faul, Mark, Marlena M Wald, Likang Xu, and Victor G Coronado. 2010. 'Traumatic brain injury in the United States; emergency department visits, hospitalizations, and deaths, 2002-2006'.
- Filiano, A. J., S. P. Gadani, and J. Kipnis. 2017. 'How and why do T cells and their derived cytokines affect the injured and healthy brain?', *Nat Rev Neurosci*, 18: 375-84.
- Fleminger, S. 2008. 'Long-term psychiatric disorders after traumatic brain injury', *European Journal of Anaesthesiology*, 25: 123-30.
- Fleminger, S., D. L. Oliver, W. H. Williams, and J. Evans. 2003. 'The neuropsychiatry of depression after brain injury', *Neuropsychol Rehabil*, 13: 65-87.
- Flierl, M. A., P. F. Stahel, K. M. Beauchamp, S. J. Morgan, W. R. Smith, and E. Shohami. 2009. 'Mouse closed head injury model induced by a weight-drop device', *Nat Protoc*, 4: 1328-37.
- Folweiler, K. A., S. Samuel, H. E. Metheny, and A. S. Cohen. 2018. 'Diminished Dentate Gyrus Filtering of Cortical Input Leads to Enhanced Area Ca3 Excitability after Mild Traumatic Brain Injury', *Journal of neurotrauma*, 35: 1304-17.
- Gale, Shawn D., Sterling C. Johnson, Erin D. Bigler, and Duane D. Blatter. 1995. 'Trauma-Induced Degenerative Changes in Brain Injury: A Morphometric Analysis of Three Patients with Preinjury and Postinjury MR Scans', *Journal of neurotrauma*, 12: 151-58.

- Glushakova, O. Y., D. Johnson, and R. L. Hayes. 2014. 'Delayed increases in microvascular pathology after experimental traumatic brain injury are associated with prolonged inflammation, blood-brain barrier disruption, and progressive white matter damage', *Journal of neurotrauma*, 31: 1180-93.
- Grady, M. S., J. S. Charleston, D. Maris, B. M. Witgen, and J. Lifshitz. 2003. 'Neuronal and glial cell number in the hippocampus after experimental traumatic brain injury: analysis by stereological estimation', *Journal of neurotrauma*, 20: 929-41.
- Gustavsson, A., M. Svensson, F. Jacobi, C. Allgulander, J. Alonso, E. Beghi, R. Dodel, M. Ekman, C. Faravelli, L. Fratiglioni, B. Gannon, D. H. Jones, P. Jennum, A. Jordanova, L. Jönsson, K. Karampampa, M. Knapp, G. Kobelt, T. Kurth, R. Lieb, M. Linde, C. Ljungcrantz, A. Maercker, B. Melin, M. Moscarelli, A. Musayev, F. Norwood, M. Preisig, M. Pugliatti, J. Rehm, L. Salvador-Carulla, B. Schlehofer, R. Simon, H. C. Steinhausen, L. J. Stovner, J. M. Vallat, P. Van den Bergh, J. van Os, P. Vos, W. Xu, H. U. Wittchen, B. Jönsson, and J. Olesen. 2011. 'Cost of disorders of the brain in Europe 2010', *Eur Neuropsychopharmacol*, 21: 718-79.
- GV-SOLAS. 20.03.2007 [abgerufen am 16.03.2020]. 'Tiergerechte Haltung von Labormäusen'. http://www.gv-solas.de/fileadmin/user_upload/pdf_publication/hal_maushaltung.pdf.
- Hasiloglu, Z. I., S. Albayram, H. Selcuk, E. Ceyhan, S. Delil, B. Arkan, and L. Baskoy. 2011. 'Cerebral microhemorrhages detected by susceptibility-weighted imaging in amateur boxers', *AJNR Am J Neuroradiol*, 32: 99-102.
- Hosomi, Sanae, Mitsuo Ohnishi, Hiroshi Ogura, and Takeshi Shimazu. 2020. 'Traumatic brain injury-related inflammatory projection: beyond local inflammatory responses', *Acute medicine & surgery*, 7: e520-e20.
- Imai, Y., I. Ibata, D. Ito, K. Ohsawa, and S. Kohsaka. 1996. 'A novel gene iba1 in the major histocompatibility complex class III region encoding an EF hand protein expressed in a monocytic lineage', *Biochem Biophys Res Commun*, 224: 855-62.
- Israel, Ina, Andrea Ohsiek, Ehab Al-Momani, Christiane Albert-Weissenberger, Christian Stetter, Stine Mencl, Andreas K. Buck, Christoph Kleinschnitz, Samuel Samnick, and Anna-Leena Sirén. 2016. 'Combined [18F]DPA-714 micro-positron emission tomography and autoradiography imaging of microglia activation after closed head injury in mice', *Journal of Neuroinflammation*, 13: 140.
- Jassam, Y. N., S. Izzy, M. Whalen, D. B. McGavern, and J. El Khoury. 2017. 'Neuroimmunology of Traumatic Brain Injury: Time for a Paradigm Shift', *Neuron*, 95: 1246-65.
- Jenkins, P. O., A. A. Roussakis, S. De Simoni, N. Bourke, J. Fleminger, J. Cole, P. Piccini, and D. Sharp. 2020. 'Distinct dopaminergic abnormalities in traumatic brain injury and Parkinson's disease', *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, 91: 631-37.
- Johnson, V. E., W. Stewart, and D. H. Smith. 2012. 'Widespread τ and amyloid- β pathology many years after a single traumatic brain injury in humans', *Brain Pathol*, 22: 142-9.
- . 2013. 'Axonal pathology in traumatic brain injury', *Exp Neurol*, 246: 35-43.

- Johnson, Victoria E., William Stewart, John Q. Trojanowski, and Douglas H. Smith. 2011. 'Acute and chronically increased immunoreactivity to phosphorylation-independent but not pathological TDP-43 after a single traumatic brain injury in humans', *Acta Neuropathologica*, 122: 715-26.
- Jorge, R. E., R. G. Robinson, D. Moser, A. Tateno, B. Crespo-Facorro, and S. Arndt. 2004. 'Major depression following traumatic brain injury', *Arch Gen Psychiatry*, 61: 42-50.
- Kiryk, Anna, Artur Janusz, Bartosz Zglinicki, Emir Turkes, Ewelina Knapska, Witold Konopka, Hans-Peter Lipp, and Leszek Kaczmarek. 2020. 'IntelliCage as a tool for measuring mouse behavior – 20 years perspective', *Behavioural Brain Research*, 388: 112620.
- Korte, S. M., and S. F. De Boer. 2003. 'A robust animal model of state anxiety: fear-potentiated behaviour in the elevated plus-maze', *Eur J Pharmacol*, 463: 163-75.
- Kraus, M. F., T. Susmaras, B. P. Caughlin, C. J. Walker, J. A. Sweeney, and D. M. Little. 2007. 'White matter integrity and cognition in chronic traumatic brain injury: a diffusion tensor imaging study', *Brain*, 130: 2508-19.
- Kumar, A., and D. J. Loane. 2012. 'Neuroinflammation after traumatic brain injury: opportunities for therapeutic intervention', *Brain Behav Immun*, 26: 1191-201.
- Lawrence, Tim P., Pieter M. Pretorius, Martyn Ezra, Tom Cadoux-Hudson, and Natalie L. Voets. 2017. 'Early detection of cerebral microbleeds following traumatic brain injury using MRI in the hyper-acute phase', *Neuroscience letters*, 655: 143-50.
- Lee, Yi-Kung, Sheng-Wen Hou, Ching-Chih Lee, Chen-Yang Hsu, Yung-Sung Huang, and Yung-Cheng Su. 2013. 'Increased risk of dementia in patients with mild traumatic brain injury: a nationwide cohort study', *PloS one*, 8: e62422-e22.
- Levin, H., G. Hanten, J. Max, X. Li, P. Swank, L. Ewing-Cobbs, M. Dennis, D. S. Menefee, and R. Schachar. 2007. 'Symptoms of attention-deficit/hyperactivity disorder following traumatic brain injury in children', *J Dev Behav Pediatr*, 28: 108-18.
- Li, Shihong, Toshihiko Kuroiwa, Noriko Katsumata, Satoru Ishibashi, Li Yuan Sun, Shu Endo, and Kikuo Ohno. 2006. 'Transient versus prolonged hyperlocomotion following lateral fluid percussion injury in mongolian gerbils', *Journal of Neuroscience Research*, 83: 292-300.
- Loane, David J., Alok Kumar, Bogdan A. Stoica, Rainier Cabatbat, and Alan I. Faden. 2014. 'Progressive neurodegeneration after experimental brain trauma: association with chronic microglial activation', *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 73: 14-29.
- LoBue, Christian, Catherine Munro, Jeffrey Schaffert, Nyaz Didehbani, Jr John Hart, Hunt Batjer, and C. Munro Cullum. 2019. 'Traumatic Brain Injury and Risk of Long-Term Brain Changes, Accumulation of Pathological Markers, and Developing Dementia: A Review', *Journal of Alzheimer's Disease*, 70: 629-54.
- Lopez-Caperuchi, Simon, Lydia Kürzinger, Sarah Hopp-Krämer, Christiane Albert-Weißenberger, Mila M. Paul, Anna-Leena Sirén, and Christian Stetter. 2021. 'Posttraumatic learning deficits correlate with initial trauma severity and

- chronic cellular reactions after closed head injury in male mice', *Experimental Neurology*, 341: 113721.
- Machamer, J. E., N. R. Temkin, and S. S. Dikmen. 2003. 'Neurobehavioral outcome in persons with violent or nonviolent traumatic brain injury', *J Head Trauma Rehabil*, 18: 387-97.
- Maegele, M., D. Engel, B. Bouillon, R. Lefering, H. Fach, M. Raum, B. Buchheister, U. Schaefer, N. Klug, and E. Neugebauer. 2007. 'Incidence and outcome of traumatic brain injury in an urban area in Western Europe over 10 years', *Eur Surg Res*, 39: 372-9.
- Mao, X., N. A. Terpolilli, A. Wehn, S. Cheng, F. Hellal, B. Liu, B. Seker, and N. Plesnila. 2020. 'Progressive Histopathological Damage Occurring Up to One Year after Experimental Traumatic Brain Injury Is Associated with Cognitive Decline and Depression-Like Behavior', *Journal of neurotrauma*, 37: 1331-41.
- Max, Jeffrey E., Russell J. Schachar, Harvey S. Levin, Linda Ewing-Cobbs, Sandra B. Chapman, Maureen Dennis, Ann Saunders, and Julie Landis. 2005a. 'Predictors of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder Within 6 Months After Pediatric Traumatic Brain Injury', *Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry*, 44: 1032-40.
- . 2005b. 'Predictors of Secondary Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder in Children and Adolescents 6 to 24 Months After Traumatic Brain Injury', *Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry*, 44: 1041-49.
- Mbye, L. H., I. N. Singh, P. G. Sullivan, J. E. Springer, and E. D. Hall. 2008. 'Attenuation of acute mitochondrial dysfunction after traumatic brain injury in mice by NIM811, a non-immunosuppressive cyclosporin A analog', *Experimental Neurology*, 209: 243-53.
- McAllister, T. W. 2011. 'Neurobiological consequences of traumatic brain injury', *Dialogues Clin Neurosci*, 13: 287-300.
- McKee, Ann C., Brandon E. Gavett, Robert A. Stern, Christopher J. Nowinski, Robert C. Cantu, Neil W. Kowall, Daniel P. Perl, E. Tessa Hedley-Whyte, Bruce Price, Chris Sullivan, Peter Morin, Hyo-Soon Lee, Caroline A. Kubitius, Daniel H. Daneshvar, Megan Wulff, and Andrew E. Budson. 2010. 'TDP-43 proteinopathy and motor neuron disease in chronic traumatic encephalopathy', *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 69: 918-29.
- Millar, K., J. A. Nicoll, S. Thornhill, G. D. Murray, and G. M. Teasdale. 2003. 'Long term neuropsychological outcome after head injury: relation to APOE genotype', *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, 74: 1047-52.
- Moran, L. B., D. C. Duke, F. E. Turkheimer, R. B. Banati, and M. B. Graeber. 2004. 'Towards a transcriptome definition of microglial cells', *Neurogenetics*, 5: 95-108.
- Mouzon, B. C., C. Bachmeier, A. Ferro, J. O. Ojo, G. Crynen, C. M. Acker, P. Davies, M. Mullan, W. Stewart, and F. Crawford. 2014. 'Chronic neuropathological and neurobehavioral changes in a repetitive mild traumatic brain injury model', *Ann Neurol*, 75: 241-54.
- Myers, David G. 2014. *Psychologie* (Springer Verlag).

- Nakajima, K., and S. Kohsaka. 2004. 'Microglia: neuroprotective and neurotrophic cells in the central nervous system', *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord*, 4: 65-84.
- Ndode-Ekane, X. E., L. Matthiesen, I. Bañuelos-Cabrera, C. A. P. Palminha, and A. Pitkänen. 2018. 'T-cell infiltration into the perilesional cortex is long-lasting and associates with poor somatomotor recovery after experimental traumatic brain injury', *Restor Neurol Neurosci*, 36: 485-501.
- Ng, K., D. J. Mikulis, J. Glazer, N. Kabani, C. Till, G. Greenberg, A. Thompson, D. Lazinski, R. Agid, B. Colella, and R. E. Green. 2008. 'Magnetic resonance imaging evidence of progression of subacute brain atrophy in moderate to severe traumatic brain injury', *Arch Phys Med Rehabil*, 89: S35-44.
- Nishijima, Daniel Kiden, Samuel D. Gaona, Trent Waechter, Ric Maloney, Adam Blitz, Andrew R. Elms, Roel D. Farrales, James Montoya, Troy Bair, Calvin Howard, Megan Gilbert, Renee Trajano, Kaela Hatchel, Mark Faul, Jeneita M. Bell, Victor Coronado, David R. Vinson, Dustin W. Ballard, Daniel J. Tancredi, Hernando Garzon, Kevin E. Mackey, Kiarash Shahlaie, and James F. Holmes. 2017. 'The incidence of traumatic intracranial hemorrhage in head-injured older adults transported by EMS with and without anticoagulant or antiplatelet use', *Journal of neurotrauma*, 35: 750-59.
- Nordström, Anna, and Peter Nordström. 2018. 'Traumatic brain injury and the risk of dementia diagnosis: A nationwide cohort study', *PLoS medicine*, 15: e1002496-e96.
- Oehmichen, M., W. Eisenmenger, G. Raff, and G. Berghaus. 1986. 'Brain macrophages in human cortical contusions as indicator of survival period', *Forensic Sci Int*, 30: 281-301.
- Park, J. H., S. W. Park, S. H. Kang, T. K. Nam, B. K. Min, and S. N. Hwang. 2009. 'Detection of traumatic cerebral microbleeds by susceptibility-weighted image of MRI', *J Korean Neurosurg Soc*, 46: 365-9.
- Paterno, R., H. Metheny, and A. S. Cohen. 2018. 'Memory Deficit in an Object Location Task after Mild Traumatic Brain Injury Is Associated with Impaired Early Object Exploration and Both Are Restored by Branched Chain Amino Acid Dietary Therapy', *Journal of neurotrauma*, 35: 2117-24.
- Peeters, Wouter, Ruben van den Brande, Suzanne Polinder, Alexandra Brazinova, Ewout W. Steyerberg, Hester F. Lingsma, and Andrew I. R. Maas. 2015. 'Epidemiology of traumatic brain injury in Europe', *Acta Neurochirurgica*, 157: 1683-96.
- Plassman, B. L., R. J. Havlik, D. C. Steffens, M. J. Helms, T. N. Newman, D. Drosdick, C. Phillips, B. A. Gau, K. A. Welsh-Bohmer, J. R. Burke, J. M. Guralnik, and J. C. Breitner. 2000. 'Documented head injury in early adulthood and risk of Alzheimer's disease and other dementias', *Neurology*, 55: 1158-66.
- Popovitz, J., S. P. Mysore, and H. Adwanikar. 2019. 'Long-Term Effects of Traumatic Brain Injury on Anxiety-Like Behaviors in Mice: Behavioral and Neural Correlates', *Front Behav Neurosci*, 13: 6.
- Pullela, R., J. Raber, T. Pfankuch, D. M. Ferriero, C. P. Claus, S. E. Koh, T. Yamauchi, R. Rola, J. R. Fike, and L. J. Noble-Haeusslein. 2006. 'Traumatic injury to the

- immature brain results in progressive neuronal loss, hyperactivity and delayed cognitive impairments', *Dev Neurosci*, 28: 396-409.
- Qiu, X., S. Ping, M. Kyle, L. Chin, and L. R. Zhao. 2020. 'Long-term beneficial effects of hematopoietic growth factors on brain repair in the chronic phase of severe traumatic brain injury', *Exp Neurol*, 330: 113335.
- Raghavendra Rao, V. L., A. Dogan, K. K. Bowen, and R. J. Dempsey. 2000. 'Traumatic brain injury leads to increased expression of peripheral-type benzodiazepine receptors, neuronal death, and activation of astrocytes and microglia in rat thalamus', *Exp Neurol*, 161: 102-14.
- Ramlackhansingh, A. F., D. J. Brooks, R. J. Greenwood, S. K. Bose, F. E. Turkheimer, K. M. Kinnunen, S. Gentleman, R. A. Heckemann, K. Gunanayagam, G. Gelosa, and D. J. Sharp. 2011. 'Inflammation after trauma: microglial activation and traumatic brain injury', *Ann Neurol*, 70: 374-83.
- Rana, A., S. Singh, R. Deshmukh, and A. Kumar. 2020. 'Pharmacological potential of tocopherol and doxycycline against traumatic brain injury-induced cognitive/motor impairment in rats', *Brain Inj*: 1-12.
- Riggio, S. 2011. 'Traumatic brain injury and its neurobehavioral sequelae', *Neurol Clin*, 29: 35-47, vii.
- Ritzel, R. M., Y. Li, J. He, N. Khan, S. J. Doran, A. I. Faden, and J. Wu. 2020. 'Sustained neuronal and microglial alterations are associated with diverse neurobehavioral dysfunction long after experimental brain injury', *Neurobiol Dis*, 136: 104713.
- Rothwell, Nancy J. 1997. 'Sixteenth Gaddum Memorial Lecture December 1996. Neuroimmune interactions: the role of cytokines', *British journal of pharmacology*, 121: 841-47.
- Salazar, A. M., D. L. Warden, K. Schwab, J. Spector, S. Braverman, J. Walter, R. Cole, M. M. Rosner, E. M. Martin, J. Ecklund, and R. G. Ellenbogen. 2000. 'Cognitive rehabilitation for traumatic brain injury: A randomized trial. Defense and Veterans Head Injury Program (DVHIP) Study Group', *Jama*, 283: 3075-81.
- Sargin, D., I. Hassouna, S. Sperling, A. L. Sirén, and H. Ehrenreich. 2009. 'Uncoupling of neurodegeneration and gliosis in a murine model of juvenile cortical lesion', *Glia*, 57: 693-702.
- Schimmel, S. J., S. Acosta, and D. Lozano. 2017. 'Neuroinflammation in traumatic brain injury: A chronic response to an acute injury', *Brain Circ*, 3: 135-42.
- Schmidt, Oliver I., Christoph E. Heyde, Wolfgang Ertel, and Philip F. Stahel. 2005. 'Closed head injury—an inflammatory disease?', *Brain Research Reviews*, 48: 388-99.
- Schultz, Wolfram. 2015. 'Neuronal Reward and Decision Signals: From Theories to Data', *Physiological Reviews*, 95: 853-951.
- Schwarzbald, Marcelo, Daniel Rial, Tatiana Bem, Daniele Machado, Mauricio Cunha, Alessandra Santos, Danúbia Santos, Claudia Figueiredo, Marcelo Farina, Eliane Maria Goldfeder, Ana Rodrigues, Rui Prediger, and Roger Walz. 2010. 'Effects of Traumatic Brain Injury of Different Severities on Emotional, Cognitive, and Oxidative Stress-Related Parameters in Mice', *Journal of neurotrauma*, 27: 1883-93.

- Science, Allen Institute for Brain. 2011. 'Allen Mouse Brain Atlas', Accessed 05.06.2020. http://mouse.brain-map.org/experiment/thumbnails/100048576?image_type=atlas.
- Scott, Gregory, Anil F. Ramlackhansingh, Paul Edison, Peter Hellyer, James Cole, Mattia Veronese, Rob Leech, Richard J. Greenwood, Federico E. Turkheimer, Steve M. Gentleman, Rolf A. Heckemann, Paul M. Matthews, David J. Brooks, and David J. Sharp. 2016. 'Amyloid pathology and axonal injury after brain trauma', *Neurology*, 86: 821.
- Sica, Antonio, and Alberto Mantovani. 2012. 'Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas', *The Journal of clinical investigation*, 122: 787-95.
- Sidaros, Annette, Arnold Skimminge, Matthew G. Liptrot, Karam Sidaros, Aase W. Engberg, Margrethe Herning, Olaf B. Paulson, Terry L. Jernigan, and Egill Rostrup. 2009. 'Long-term global and regional brain volume changes following severe traumatic brain injury: A longitudinal study with clinical correlates', *NeuroImage*, 44: 1-8.
- Simon, Dennis W., Mandy J. McGeachy, Hülya Bayır, Robert S. B. Clark, David J. Loane, and Patrick M. Kochanek. 2017. 'The far-reaching scope of neuroinflammation after traumatic brain injury', *Nature reviews. Neurology*, 13: 171-91.
- Siopi, E., G. Llufriu-Dabén, F. Fanucchi, M. Plotkine, C. Marchand-Leroux, and M. Jafarian-Tehrani. 2012. 'Evaluation of late cognitive impairment and anxiety states following traumatic brain injury in mice: the effect of minocycline', *Neuroscience letters*, 511: 110-5.
- Sîrbulescu, R. F., J. Y. Chung, Edmiston Wj, III, S. A. Poznansky, M. C. Poznansky, and M. J. Whalen. 2019. 'Intraparenchymal Application of Mature B Lymphocytes Improves Structural and Functional Outcome after Contusion Traumatic Brain Injury', *Journal of neurotrauma*, 36: 2579-89.
- Sirén, A. L., K. Radyushkin, S. Boretius, D. Kämmer, C. C. Riechers, O. Natt, D. Sargin, T. Watanabe, S. Sperling, T. Michaelis, J. Price, B. Meyer, J. Frahm, and H. Ehrenreich. 2006. 'Global brain atrophy after unilateral parietal lesion and its prevention by erythropoietin', *Brain*, 129: 480-9.
- Smith, C., S. M. Gentleman, P. D. Leclercq, L. S. Murray, W. S. T. Griffin, D. I. Graham, and J. A. R. Nicoll. 2013. 'The neuroinflammatory response in humans after traumatic brain injury', *Neuropathology and applied neurobiology*, 39: 654-66.
- Smith, Douglas H., Xiao-Han Chen, Jean E. S. Pierce, John A. Wolf, John Q. Trojanowski, David I. Graham, and Tracy K. McIntosh. 1997. 'Progressive Atrophy and Neuron Death for One Year Following Brain Trauma in the Rat', *Journal of neurotrauma*, 14: 715-27.
- Sun, G., P. Zhao, L. Fan, Z. Bao, Y. Tu, C. Li, H. Chao, X. Xu, and J. Ji. 2020. 'Curcumin alleviates neuroinflammation, enhances hippocampal neurogenesis, and improves spatial memory after traumatic brain injury', *Brain Res Bull.*
- Tajiri, Naoki, Diana Hernandez, Sandra Acosta, Kazutaka Shinozuka, Hiroto Ishikawa, Jared Ehrhart, Theo Diamandis, Chiara Gonzales-Portillo, Mia C. Borlongan, Jun Tan, Yuji Kaneko, and Cesar V. Borlongan. 2014. 'Suppressed cytokine expression immediately following traumatic brain injury in neonatal rats

- indicates an expeditious endogenous anti-inflammatory response', *Brain research*, 1559: 65-71.
- Taylor, C. A., J. M. Bell, M. J. Breiding, and L. Xu. 2017. 'Traumatic Brain Injury-Related Emergency Department Visits, Hospitalizations, and Deaths - United States, 2007 and 2013', *MMWR Surveill Summ*, 66: 1-16.
- Tomaiuolo, F., U. Bivona, J. P. Lerch, M. Di Paola, G. A. Carlesimo, P. Ciurli, M. Matteis, L. Cecchetti, A. Forcina, D. Silvestro, E. Azicnuda, U. Sabatini, D. Di Giacomo, C. Caltagirone, M. Petrides, and R. Formisano. 2012. 'Memory and anatomical change in severe non missile traumatic brain injury: ~1 vs. ~8 years follow-up', *Brain Res Bull*, 87: 373-82.
- Tramontana, M. G., R. L. Cowan, D. Zald, J. W. Prokop, and O. Guillamondegui. 2014. 'Traumatic brain injury-related attention deficits: treatment outcomes with lisdexamfetamine dimesylate (Vyvanse)', *Brain Inj*, 28: 1461-72.
- Tucker, L. B., J. F. Burke, A. H. Fu, and J. T. McCabe. 2017. 'Neuropsychiatric Symptom Modeling in Male and Female C57BL/6J Mice after Experimental Traumatic Brain Injury', *Journal of neurotrauma*, 34: 890-905.
- UniProtKB/Swiss-Prot. 2020a. 'UniProtKB - P14136 (GFAP_HUMAN)', Accessed 05.06.2020. <https://www.uniprot.org/uniprot/P14136>.
- . 2020b. 'UniProtKB - P15391 (CD19_HUMAN)', Accessed 05.06.2020. <https://www.uniprot.org/uniprot/P15391>.
- . 2020c. 'UniProtKB - P19246 (NFH_MOUSE)', Accessed 06.05.2020. <https://www.uniprot.org/uniprot/P19246>.
- Urrutia, P. J., N. P. Mena, and M. T. Núñez. 2014. 'The interplay between iron accumulation, mitochondrial dysfunction, and inflammation during the execution step of neurodegenerative disorders', *Front Pharmacol*, 5: 38.
- Wako. 2020. 'Anti Iba1, Rabbit (for Immunocytochemistry) ', FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Accessed 05.06.2020. <https://labchem-wako.fujifilm.com/us/product/detail/W01W0101-1974.html>.
- Walker, Kendall R., and Giuseppina Tesco. 2013. 'Molecular mechanisms of cognitive dysfunction following traumatic brain injury', *Frontiers in aging neuroscience*, 5: 29-29.
- Wang, H. K., S. H. Lin, P. S. Sung, M. H. Wu, K. W. Hung, L. C. Wang, C. Y. Huang, K. Lu, H. J. Chen, and K. J. Tsai. 2012. 'Population based study on patients with traumatic brain injury suggests increased risk of dementia', *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, 83: 1080-5.
- Warner, M. A., T. S. Youn, T. Davis, A. Chandra, C. Marquez de la Plata, C. Moore, C. Harper, C. J. Madden, J. Spence, R. McColl, M. Devous, R. D. King, and R. Diaz-Arrastia. 2010. 'Regionally selective atrophy after traumatic axonal injury', *Arch Neurol*, 67: 1336-44.
- Washington, P. M., P. A. Forcelli, T. Wilkins, D. N. Zapple, M. Parsadonian, and M. P. Burns. 2012. 'The effect of injury severity on behavior: a phenotypic study of cognitive and emotional deficits after mild, moderate, and severe controlled cortical impact injury in mice', *Journal of neurotrauma*, 29: 2283-96.

- Wu, Q., G. Liu, L. Xu, X. Wen, Y. Cai, W. Fan, X. Yao, H. Huang, and Q. Li. 2016. 'Repair of Neurological Function in Response to FK506 Through CaN/NFATc1 Pathway Following Traumatic Brain Injury in Rats', *Neurochem Res*, 41: 2810-18.
- Xiong, Y., A. Mahmood, and M. Chopp. 2013. 'Animal models of traumatic brain injury', *Nat Rev Neurosci*, 14: 128-42.
- Yeates, K. O., K. Armstrong, J. Janusz, H. G. Taylor, S. Wade, T. Stancin, and D. Drotar. 2005. 'Long-term attention problems in children with traumatic brain injury', *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, 44: 574-84.
- Zhang, Y., and P. Popovich. 2011. 'Roles of autoantibodies in central nervous system injury', *Discov Med*, 11: 395-402.

Danksagung

Frau Prof. Sirén möchte ich für die Überlassung des Themas dieser Promotionsarbeit sowie für die hilfsbereite Betreuung und die vielen guten Ratschläge zum kritischen wissenschaftlichen Denken und Arbeiten danken. Ebenso bin ich sehr dankbar, dass sie mir als Mentorin für Fragen zum wissenschaftlichen Arbeiten während des Medizinstudiums und zu den beruflichen Möglichkeiten nach Erhalt der Approbation zur Seite stand. Genauso bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Martini und Frau Dr. Schmitt-Böhrer für die hilfreichen Anregungen und Kommentare und die Begutachtung meiner Arbeit.

Bei Frau Dr. Albert-Weißberger bedanke ich mich für die praktische Betreuung und Planung dieser Arbeit sowie das Heranführen an die wissenschaftliche Arbeitsweise und das wissenschaftliche Schreiben, sowie für großartige Unterstützung während der experimentellen Phase der Arbeit. Darüber hinaus bedanke ich mich bei Frau Barbara Gado für die Einweisung in die experimentellen Arbeitsweisen und Methoden, sowie der tatkräftigen Unterstützung und Hilfestellung im Labor.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei meiner Familie, meinen Freunden und meiner Lebensgefährtin für die langjährige Unterstützung beim Entstehungsprozess der Arbeit, welche mir auch in den schwierigen Zeiten der experimentellen Phase zur Seite standen und mich immer wieder motiviert haben.

Anhang

Posterpräsentationen

'Characterization of long-term cellular responses to closed head injury in mice'.
EUREKA! 12th International GSLS Student Symposium, Oktober 2017, Würzburg
(Deutschland) und 11th GSLS Retreat, März 2018, Füssen (Deutschland).

Publikationen

Lopez-Caperuchipi, Simon, Lydia Kürzinger, Sarah Hopp-Krämer, Christiane Albert-Weißberger, Mila M. Paul, Anna-Leena Sirén, and Christian Stetter. 2021. *'Posttraumatic learning deficits correlate with initial trauma severity and chronic cellular reactions after closed head injury in male mice'*, *Experimental Neurology*, 341: 113721.

Stetter, Christian, **Simon Lopez-Caperuchipi**, Sarah Hopp-Krämer, Michael Bieber, Christoph Kleinschnitz, Anna-Leena Sirén, and Christiane Albert-Weißberger. 2021. *'Amelioration of Cognitive and Behavioral Deficits after Traumatic Brain Injury in Coagulation Factor XII Deficient Mice'*, *International journal of molecular sciences*, 22: 4855.

CURRICULUM VITAE

Geboren am [REDACTED]
In Regensburg
Deutsch

BERUFLICHER UND AKADEMISCHER WERDEGANG

September 2000 bis Juli 2004	Grundschule Kareth-Lappersdorf
September 2004 bis Juli 2012	W.-v.-Siemens-Gymnasium Regensburg Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
Oktober 2012 bis Januar 2013	Auslandsaufenthalt in Uganda mit der Hilfsorganisation „Helfende Hände Zukunft für Kinder und Jugendliche e.V.“
April 2013 bis Dezember 2019	Studium der Humanmedizin an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
Dezember 2019	Abschluss der Ärztlichen Prüfung
Januar 2020	Approbation als Arzt durch die Regierung von Unterfranken
Seit September 2016	Promotion im Rahmen des “MD Excellence Program” der Graduate School of Life Sciences Würzburg zum Thema „Charakterisierung zellulärer Veränderungen und kognitiver Verhaltensweisen in einem Model vom Schädel-Hirn Trauma in männlichen Mäusen“ Promotionsstipendium der Medizinischen Fakultät Würzburg
Seit Juli 2020	Arzt in Weiterbildung für Psychiatrie und Psychotherapie am Sophien- und Hufeland Klinikum Weimar
Seit Oktober 2020	Ärztliche Weiterbildung für Psychotherapie mit Schwerpunktverfahren Verhaltenstherapie am IVT in Lübben

STUDENTISCHE NEBENTÄTIGKEIT

Oktober 2014 bis Februar 2016	Studentische Hilfskraft am Institut für Anatomie und Zellbiologie im Kurs der makroskopischen Anatomie
Juli bis August 2015	Forschungspraktikum in der AG „Neuroprotektion und Neuroregeneration“ der Experimentellen Neurochirurgie

November 2015 bis August 2016 Studentische Hilfskraft in der Klinik für Tropenmedizin des Missionsärztlichen Instituts im Bereich der Migrantenmedizin

Ehrenamtlich bis August 2019 Leiter der Würzburger Studierendengruppe der „IPPNW-Ärzte in sozialer Verantwortung e.V.“

ZUSÄTZLICHE QUALIFIKATIONEN

Fremdsprachen Spanisch B2/C1
 Englisch B1+
 Latein Latinum

Statistik SPSS Grund- und Aufbaukurs des IKE-B der Universität Würzburg

Forschung Grundkurs Tierschutz und Versuchstierkunde

Würzburg, 15. Februar 2023

Simon Lopez Caperuchipi

Affidavit

I hereby confirm that my thesis entitled „ Characterization of cellular and behavioral changes in a model of traumatic brain injury in male mice“ is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and / or materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore, I confirm that this thesis has not yet been submitted as part of another examination process neither in identical nor in similar form.

Würzburg,

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation „Charakterisierung zellulärer Veränderungen und kognitiver Verhaltensweisen in einem Model vom Schädel-Hirn Trauma in männlichen Mäusen“ eigenständig, d.h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Würzburg,

