

Max-Planck-Institut für Neurobiologie
Abteilung für Neuromorphologie
Leiter der Abteilung: apl. Prof. Dr. Dr. h.c. (MU Szeged) G. W. Kreutzberg

Die Rolle der beiden Neuropeptide Galanin und Calcitonin gene related protein (CGRP), der endothelialen und neuronalen Stickoxidsynthetase (e-, nNOS) und von Interleukin 6 (IL6) bei der Regeneration zentral im Fazialiskern nach Fazialisaxotomie und peripher nach Fazialisquetschung

Matthias Luigi Galiano

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. Dr. h.c. (MU Szeged) G. W. Kreutzberg
2. Univ.-Prof. Dr. A. Konnerth
3. Univ.-Prof. Dr. B. Conrad (schriftliche Beurteilung)
Univ.-Prof. Dr. Dr. Th. R. Tölle (mündliche Prüfung)

Die Dissertation wurde am 07.12.2006 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 18.04.2007 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Posttraumatische Veränderungen peripher	2
1.1.1	Degeneration	2
1.1.1.1	Lokale Veränderungen	2
1.1.1.2	Distale Veränderungen	3
1.1.2	Regeneration	3
1.2	Posttraumatische Veränderungen des zentralen Nervensystems nach indirektem Trauma	4
1.2.1	Neuronale Reaktion	4
1.2.2	Mikrogliale Reaktion	5
1.2.3	Astrogliale Reaktion	6
1.2.4	Einwanderung der Leukozyten	6
1.3	Molekulare Veränderungen	7
1.3.1	Peripher (Nerv)	7
1.3.2	Zentral	8
1.3.3	Mikroglia	9
1.3.4	Astroglia	9
1.3.5	Lymphozyten	10
1.4	Untersuchte Moleküle	10
1.4.1	Interleukin 6 (IL6)	11
1.4.2	Calcitonin gene related protein (CGRP)	12
1.4.3	Galanin	13
1.4.4	Neuronale und endotheliale Stickoxidsynthetase (n- und eNOS)	14
1.4.4.1	Stickoxid (NO)	14
1.4.4.2	Endotheliale Stickoxidsynthetase (eNOS)	15
1.4.4.3	Neuronale Stickoxidsynthetase (nNOS)	15
1.5	Zielsetzung	16
2	Ergebnisteil	17
2.1	Interleukin 6 und die zelluläre Antwort auf Verletzung des Fazialisnervs	17
2.1.1	Axonale Regeneration des gequetschten Fazialisnervs	17
2.1.2	Makrophagen- und Granulozyteneinwanderung in den gequetschten Fazialisnerven	18
2.1.3	Lymphozyteneinwanderung in den Fazialiskern	18
2.1.4	Neuronales Überleben	19
2.1.5	Zentrale Wachstumskegel	20
2.1.6	Mikrogliale Reaktion	22
	<i>Tabellarische Zusammenfassung</i>	28
2.2	Galanin, CGRP, e-NOS und n-NOS	29
2.2.1	Zeitverlauf für Galanin, CGRP und die NADPH-Diaphorase	29
2.2.2	Galanin-Defizienz und die zelluläre Antwort auf die Verletzung des Fazialisnervs	34
2.2.2.1	Axonale Regeneration des gequetschten Fazialisnervs	34

2.2.2.2	Makrophagen- und Granulozyteneinwanderung in den gequetschten Fazialisnerven	34
2.2.2.3	Lymphozyteneinwanderung in den Fazialiskern	34
2.2.2.4	Neuronale Reaktion	35
2.2.2.5	Neuronales Überleben	36
2.2.2.6	Zentrale Wachstumskegel	36
2.2.2.7	Astrogliale Reaktion	38
2.2.2.8	Mikrogliale Reaktion	38
	<i>Tabellarische Zusammenfassung Effekte Galanin</i>	40
2.2.3	CGRP-Defizienz und die zelluläre Antwort auf die Verletzung des Fazialisnervs	41
2.2.3.1	Axonale Regeneration des gequetschten Fazialisnervs	41
2.2.3.2	Makrophagen- und Granulozyteneinwanderung in den gequetschten Fazialisnerven	41
2.2.3.3	Lymphozyteneinwanderung in den Fazialiskern	42
2.2.3.4	Neuronale Reaktion	43
2.2.3.5	Zentrale Wachstumskegel	43
2.2.3.6	Astrogliale Reaktion	45
2.2.3.7	Mikrogliale Reaktion	46
	<i>Tabellarische Zusammenfassung Effekte CGRP</i>	46
2.2.4	eNOS-Defizienz und die zelluläre Antwort auf die Verletzung des Fazialisnervs	47
2.2.4.1	Axonale Regeneration des gequetschten Fazialisnervs	47
2.2.4.2	Makrophagen- und Granulozyteneinwanderung in den gequetschten Fazialisnerven	47
2.2.4.3	Lymphozyteneinwanderung in den Fazialiskern	48
2.2.4.4	Neuronale Reaktion	49
2.2.4.5	Zentrale Wachstumskegel	50
2.2.4.6	Astrogliale Reaktion	50
2.2.4.7	Mikrogliale Reaktion	53
	<i>Tabellarische Zusammenfassung Effekte eNOS</i>	54
2.2.5	nNOS-Defizienz und die zelluläre Antwort auf die Verletzung des Fazialisnervs	54
2.2.5.1	Axonale Regeneration des gequetschten Fazialisnerve	54
2.2.5.2	Makrophagen- und Granulozyteneinwanderung in den gequetschten Fazialisnerven	55
2.2.5.3	Lymphozyteneinwanderung in den Fazialiskern	56
2.2.5.4	Neuronale Reaktion	56
2.2.5.5	Zentrale Wachstumskegel	57
2.2.5.6	Astrogliale Reaktion	57
2.2.5.7	Mikrogliale Reaktion	57
	<i>Tabellarische Zusammenfassung nNOS</i>	60
	<i>Tabellarische Zusammenfassung positiver bzw. signifikanter Ergebnisse von IL6, Galanin, CGRP, e- und nNOS</i>	61
3	Diskussion	62
3.1	Das Akutphaseprotein Interleukin 6: seine Bedeutung vor allem in der frühen posttraumatischen Phase	62
3.1.1	Interleukin 6-Defizienz: Bedeutung für die Lymphozyteneinwanderung	63

3.1.2	Interleukin 6-Defizienz: Bedeutung für die Mikrogliaaktivierung	63
3.1.3	Interleukin 6-Defizienz: Bedeutung für die Astrogliaaktivierung	64
3.1.4	Interleukin 6-Defizienz: Bedeutung für die neuronale Reaktion	65
3.2	Die Neuropeptide Galanin und CGRP sowie die endotheliale und neuronale Stickoxidsynthetase: geringe posttraumatische Bedeutung	65
3.2.1	Galanin-Defizienz: kein Einfluss auf das posttraumatische Geschehen	65
3.2.2	CGRP-Defizienz: Einfluss auf das posttraumatische Immungeschehen	67
3.2.3	eNOS-Defizienz: Einfluss auf die posttraumatische neuronale Reaktion	69
3.2.4	nNOS-Defizienz: Einfluss auf das posttraumatische Immungeschehen	70
3.3	Zusammenfassung	70
4	Material und Methoden	74
4.1	Material	74
4.1.1	Primäre Antikörper	74
4.1.1.1	Primäre monoklonale Antikörper	74
4.1.1.2	Primäre polyklonale Antikörper	75
4.1.1.3	Sekundäre Antikörper	75
4.1.2	Seren	75
4.1.3	Reagenzien	76
4.1.4	Chemikalien, Materialien und Kits	76
4.1.5	Lösungen, Puffer und Fixative	77
4.2	Methoden	78
4.2.1	Versuchstiere	78
4.2.2	Verletzungsmodelle des zentralen und peripheren Nervensystems	79
4.2.2.1	Charakteristika des Fazialismodells	79
4.2.2.2	Durchtrennung des Fazialisnervs	80
4.2.2.3	Quetschung des Fazialisnervs	80
4.2.3	Behandlung des Gewebes	81
4.2.3.1	Zentrales Nervengewebe	81
4.2.3.2	Peripherer Nerv	81
4.2.4	Histologische Färbungen	82
4.2.4.1	Immunhistochemie für Lichtmikroskopie	82
4.2.4.2	Färbung nach Nissl	83
4.2.4.3	Färbung von Granulozyten durch endogene Peroxidase (EP)	83
4.2.4.4	NADPH-Diaphorase Färbung	84
4.2.4.5	Fluoreszenzimmunhistochemie	84
4.2.4.5.1	Immunfluoreszenz Doppelfärbung	84
4.2.4.5.2	Doppelmarkierungen mit intrinsischem IgG	85
4.2.4.5.3	Autofluoreszenzextraktion im konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop	86
4.2.5	Retrograde Tracing-Techniken	87
4.2.5.1	Identifikation von zentralen Wachstumskegeln	87
4.2.5.2	Reinnervation der Vibrissenmuskulatur	87

4.2.6	Quantifizierungen der immunhistochemischen Ergebnisse	88
4.2.6.1	Quantifizierung der lichtmikroskopischen Immunhistochemie	88
4.2.6.2	Zelltypspezifische Quantifizierung der Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen	88
4.2.6.3	Quantifizierung der zentralen Wachstumskegel	90
4.2.6.4	Quantifizierung von Neurone	92
4.2.6.5	Quantifizierung von Lymphozyten	93
4.2.6.6	Quantifizierung von Granulozyten	93
4.2.6.7	Quantifizierung von Makrophagen	94
4.2.6.8	Quantifizierung von Mikroglia Knötchen	94
4.2.6.9	Messung der Regenerationsrate peripherer Nerven	94
4.2.7	Statistische Analyse	94
5	Literaturverzeichnis	95
6	Lebenslauf	108
7	Danksagung	110

1 EINLEITUNG

Die zellulär-molekularen Mechanismen der neuronalen Regeneration mit ihren therapeutischen Implikationen sind seit langem Gegenstand intensiver Forschung. Posttraumatisch aktivierte Signalkaskaden, die von den verletzten Neuronen ihren Anfang nehmen, stehen dabei im Zentrum des Interesses. Neurone sind umgeben von Mikroglia, Astrozyten und Oligodendrozyten. Diese haben wesentliche Funktionen. Astrozyten sind wichtig für die Konstanthaltung des interstitiellen Milieus, für den Erhalt der Blut-Hirn-Schranke und für den selektiven Austausch von Nähr und Schadstoffen (Janzer und Raff, 1987; Tsacopoulos und Magistretti, 1996). Oligodendrozyten sind wesentlich für die elektrische Isolierung der Axone des zentralen Nervensystems (ZNS) durch Markscheiden. Mikroglia fungieren als Teil des intrinsischen Abwehrsystems des ZNS (Kreutzberg, 1996a; Raivich et al., 1999a).

Der axotomierte motorische Fazialiskern der Maus als Modell

Das Fazialismodell ist ein von Kreutzberg und seinen Mitarbeitern entwickeltes Modell, das sich zur Untersuchung posttraumatischer zentraler und peripherer Reaktionsmechanismen sehr gut eignet (Kreutzberg, 1996b; Raivich et al., 1996).

Der Fazialisnerv ist ein verhältnismäßig großer Nerv, der retroaurikulär dem operativen Zugriff distal des Foramen stylomastoideum gut zugänglich ist. Das Kerngebiet ist ein großes, leicht aufzufindendes Gebiet, dessen Neurone ausschließlich motorisch sind. Durch die operative Schädigung lassen sich entzündlich-degenerative und regenerative Prozesse sowohl als retrogrades Geschehen zentral im Kerngebiet als auch peripher am Nerv selbst untersuchen. Der paarige Fazialiskern bietet zudem mit seiner kontralateralen Seite immer eine interne Kontrolle.

Darüber hinaus werden durch die periphere Läsion die Blut-Hirn-Schranke und die Zellarchitektur im Kerngebiet nicht zerstört. Störende Effekte, wie der Einstrom von hämatopoetischen Zellen und Entzündungsmediatoren, die bei anderen Hirnverletzungsmodellen durch den Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke eher auftreten, sind hier nicht Bestandteil des Pathomechanismus. Die den zellulären Veränderungen zugrundeliegenden molekularbiologischen Mechanismen können so unverfälschter verstanden werden. Makrophagen zum Beispiel, die beim Verlust der Blut-Hirn-Schranke ungehindert einwandern würden, stimmen mit dem Antigenprofil der Mikroglia weitgehend überein. Es könnte so nicht mehr eindeutig zwischen diesen beiden Zelltypen unterschieden werden (Streit et al, 1998; Bohatschek et al, 2001; Fluegel et al., 2001).

Nach Axotomie des Fazialis kommt es zu einem erneuten Auswachsen der Axone von zentral und zu einer erfolgreichen Reinnervation der Muskelendplatten der Vibrissen. Wird

der Fazialis lediglich gequetscht statt axotomiert, lässt sich die periphere Regeneration und das lokale periphere Entzündungsgeschehen optimal untersuchen.

Die posttraumatischen Veränderungen des zentralen und peripheren Nervensystems sollen zuerst morphologisch skizziert werden, anschließend die bislang verstandenen, diesen zugrundeliegenden molekularen Mechanismen.

1.1 Posttraumatische Veränderungen peripher

1.1.1 Degeneration

Der periphere Nerv besteht aus axonalen Bündeln, wobei jedes Axon von den Myelinfortsätzen Schwannscher Zellen umschichtet ist. Jede Nervenfasern ist individuell von endoneuralem Bindegewebe umgeben. Die Gesamtheit der Nervenfasern wird vom Perineurium, einer polygonal-flachen Zellformation, bindegewebig umgeben. Eine weitere Hülle stellt das Epineurium dar, in dem sich vor allem Versorgungsstrukturen (Blut- und Lymphgefäße) finden. Bei Verletzung des Nervs kommt es zu einer Vielzahl von morphologischen Veränderungen (Übersichtsarbeiten Raivich and Kreutzberg, 2000; Aguayo and Bray, 1984).

1.1.1.1 Lokale Veränderungen

Axone und die umgebenden Stützstrukturen werden geschädigt, Blutbestandteile (Erythrozyten, Thrombozyten, Plasmabestandteile, Leukozyten und Makrophagen) gelangen an die Verletzungsstelle. Innerhalb von Stunden kommt es zur Einwanderung von Leukozyten, v.a. von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen. Diese unterscheiden sich in ihrem zeitlichen Auftreten und Verteilungsmuster. Neutrophile Granulozyten reichern sich - mit einem Maximum am Tag 2-3 - mehr diffus auch distal der Verletzungsstelle an. Makrophagen mit einem Maximum am Tag 4 finden sich in hoher Konzentration v.a. an der Verletzungsstelle, dicht gepackt unterhalb der Basalmembranen des Endoneuriums. Sie phagozytieren zellulären Debris und unterstützen wesentlich Schwannsche Zellen bei der Beseitigung des Myelins (Carenini et al., 2001).

Innerhalb von 1-2 Tagen kommt es neben der Proliferation von Schwannschen Zellen vor allem zu der von Fibroblasten, wodurch vermehrt endoneurales Brückengewebe und extrazelluläre Matrix gebildet werden. Dies sind Voraussetzungen für das erfolgreiche Aussprossen der Axone. Bei zu starker Narbenbildung kann dies allerdings auch zu einem Regenerationshindernis mit der Ausbildung von Neuomen führen.

1.1.1.2 Distale Veränderungen

Verglichen mit den Veränderungen an der Verletzungsstelle selbst, sind die davon distalen zeitlich etwas verzögert. Nach ca. einem Tag kommt es zur axonalen Degeneration (Wallersche Degeneration) mit Axoplasmaveränderungen (Ansammlung von lysosomalen Organellen, geschwollene Mitochondrien). Kalzium-aktivierte Proteasen bauen Neurofilamenten ab. Es kommt zur Desintegration des Axons. In einer Mausmutante kommt es zur verzögerten Wallerschen Degeneration durch funktionsdefiziente Proteasen. Schwannschen Zellen und hämatopoetische Makrophagen werden verzögert aktiviert, womit die Regeneration später erfolgt (Lunn et al., 1989; Brown et al., 1991, Chen and Bisby, 1993; Bernier et al., 1999). Die erfolgreiche axonale Degeneration ist bedeutend für die Aktivierung der Schwannschen Zellen und die Rekrutierung von Makrophagen. Schwannsche Zellen lösen die Myelinumscheidung. Vaskuläre tight junctions werden geöffnet und es kommt zur Anreicherung von Plasma und Monozyten (Makrophagen) (Williams and Hall, 1970; Ohara et al, 1986). Makrophagen sind wichtig, um den von phagozytierenden Schwannschen Zellen (Clemence et al., 1989) begonnenen Prozess der Demyelinisierung erfolgreich zu beenden (Stoll et al., 1989; Reichert et al., 1994; Fernandez-Valle et al., 1995; Dailey et al., 1998). Die Beseitigung des wachstumshemmenden Myelins erleichtert die erfolgreiche Regeneration (Schwab, 1990; Schafer et al.; 1996). Die von Schwannschen Zellen gebildeten Büngnerschen Bänder und die noch vorhandenen mit Laminin bedeckten endoneuralen Basalmembranen dienen als Leitstruktur für die auswachsenden Axone. Schwannsche Zellen erhöhen ihre Synthese von Adhäsionsmolekülen, die intramembranös und in der extrazellulären Matrix des Endoneuralrohres zu finden sind (Salonen et al., 1987; Martini 1994). Im Rahmen der beginnenden Regeneration werden in den aussprossenden Axonen Rezeptoren, wie u.a. Integrine, für die endoneuralen Moleküle der extrazellulären Matrix hochreguliert (Lefcort et al., 1992; Kloss et al., 1999).

1.1.2 Regeneration

Proximal kommt es zur Versiegelung der Verletzungsstelle und nach 1-2 Tagen zum Wiederauswachsen der Axone (Arntz et al., 1989). Frühere Studien konnten eine Regenerationsrate von motorischen und sensorischen Neuronen von 4mm pro Tag zeigen (Bisby und Keen, 1985; Chen und Bisby, 1993). Die Regeneration beginnt ab dem Tag 2 (Forman und Berenberg, 1978). Abzüglich der ersten beiden Tage Wachstumsstillstand ergibt dies eine Regenerationsgeschwindigkeit von ca. 3mm pro Tag.

An der Spitze des axonalen Stumpfs bildet sich ein Wachstumskegel. In ihm konzentrieren sich durch anterograden Transport Organellen wie Ribosomen, Mitochondrien und glattes endoplasmatisches Retikulum, Membranproteinvesikel und zytoskelettale Proteine. Der axonale Stumpf ist die Bau- und Kommunikationszentrale des auswachsenden Axons, das

von dort mit seinem zellulären und extrazellulären Umfeld in engem Austausch steht. Es kommt zur Ausbildung feiner Ausläufer, sogenannter Filopodien, die in die Umgebung ausgreifen. Finden sie ein wachstumsförderndes Umfeld vor, werden Lamellopodien gebildet. Dies sind größere Ausstülpungen der Zellmembran, die den Wachstumskegel nach sich ziehen. Zellfortsätze, die hingegen auf ein hemmendes Umfeld treffen, kollabieren und bilden einen proximal der Wachstumskegelfront gelegenen Membranabschnitt (Bisby, 1995; Kreutzberg und Raivich, 2000).

Actin bildet das intrazelluläre Gerüst der Wachstumskegelausläufer. Es wird als Polymer von der Ausläuferspitze retrograd zum Wachstumskegel transportiert, wo es wieder in monomere Einheiten gespalten wird. Trifft eine Filopodie auf ein supportives Umfeld, interagieren die von dort entlassenen wachstumsfördernden Moleküle über einen Rezeptorkomplex mit dem Actinpolymer, so dass der retrograde Fluss gestoppt wird. Das Actinpolymer bleibt bestehen und weitere Gerüsteinheiten werden aufgebaut (Übersicht: Tanaka et al., 1995; Luo et al., 1994).

1.2 Posttraumatische Veränderungen des Zentralen Nervensystems nach indirektem Trauma

Retrograd kommt es im zentralen Nervensystem, in unserem Modell im Kerngebiet des motorischen Fazialiskerns, zu einem Entzündungsprozess als Antwort auf die periphere Verletzung (Übersicht siehe: Raivich et al., 1999a).

1.2.1 Neuronale Reaktion

Nach Axotomie schwillt der neuronale Zellkörper an, der Zellkern verlagert sich in eine exzentrische Position, die Nisselschollen lösen sich auf. Zusätzlich vermehren sich die Zellorganellen, v.a. die Ribosome. Das rauhe endoplasmatische Retikulum verliert seine parallele Schichtung (Kreutzberg, 1995). Die Proteinsynthese wie Nährstoffaufnahme sind deutlich gesteigert (Tetzlaff et al., 1988; Kreutzberg, 1995). Im Anschluss kommt es zu einer Reorganisation mit erneutem Aussprossen von Neuriten in die den Fazialiskern umgebende weiße Substanz. Diese zeigen, wie in Abbildung 1 (S. 5) gezeigt, ein Maximum der Dichte ihrer Wachstumskegel um den Tag 14 (Werner et al., 1999). Die verletzten Motoneurone regenerieren zu einem Großteil, ca. 30% gehen jedoch zugrunde (Guntinas-Lichius et al., 1996).

Die darauf folgenden neuroglialen Veränderungen werden durch die verletzten Neurone initiiert und zeigen ein neuronal-glial-lymphozytäres Wechselverhältnis.

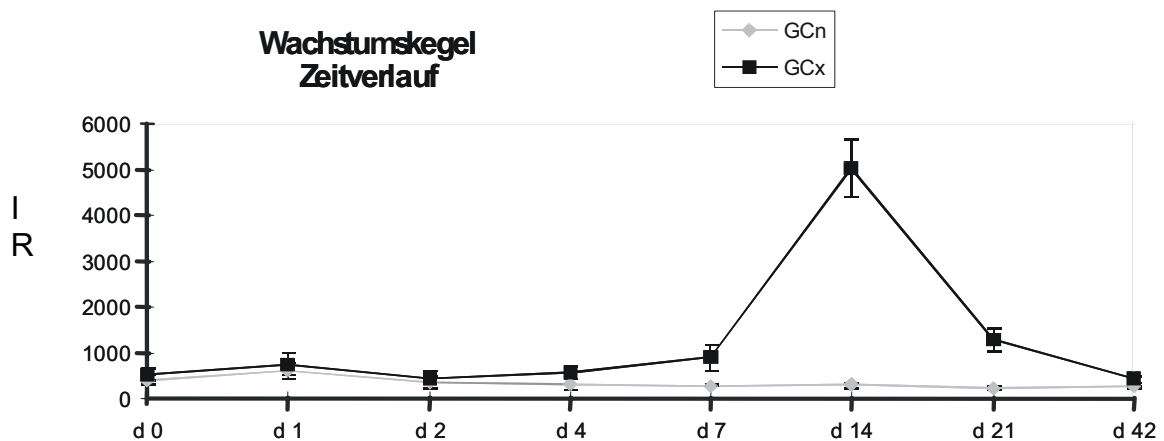


Abbildung 1. Dargestellt ist hier der Zeitverlauf der gegen das Neuropeptid Galanin gefärbten Wachstumskegel (GCx), hier schwarz) der nach Fazialisaxotomie regenerierenden Axone, Doppelimmunfluoreszenz mit IBA1. Es zeigt sich ein deutlicher Gipfel der immunhistochemischen Nachweisbarkeit (IR = Intensitätsrate) um den Tag 14 nach Fazialisaxotomie, die im weiteren Zeitverlauf rasch wieder abfällt. Die höchste Dichte der Wachstumskegel findet sich v.a. perinukleär in der weißen Substanz. Grau dargestellt (GCn) ist die nichtaxotomierte Kontrollseite, wo sich keine Wachstumskegel nachweisen lassen.

1.2.2 Mikrogliale Reaktion

Mikrogliazellen sind eng mit hämatopoetischen Monozyten verwandt (Ling et al., 1993). Sie stellen mit ca. 20% der glialen Zellpopulation die „Polizei“ des zentralen Nervensystems dar und finden sich in stark ramifizierter, stellarer Form (Durchmesser ca. 50µm) in unmittelbarer Umgebung der Neurone. Es lassen sich verschiedene Stadien der Aktivierung nach Trauma unterscheiden (Raivich et al., 1999a).

1. Stage of Alert: Mikrogliazellen werden innerhalb von 24 Stunden aktiviert (Stage of Alert). Morphologische Veränderungen sind die Größenzunahme, die Verdickung des Zellkörpers und der proximalen Fortsatzbereiche sowie eine Deramifizierung, vor allem der distalen Abschnitte.

2. Homing: Es kommt zur Adhäsion an Neurone und deren Ausläufer (Homing). Interzelluläre synaptische Verbindungen werden von Mikrogliaausläufern gelöst, und die verletzten Neurone werden fast vollständig von jenen ummantelt. Damit ist der synaptische Input der Motoneurone durch Besetzung perineuronaler Positionen reduziert („Synaptic Stripping“, Blinzinger und Kreutzberg, 1968). Dies führt zu einer elektrischen Isolierung der betroffenen Neurone (Lux und Schubert, 1975). Gleichzeitig kommt es zur Proliferation der Mikroglia mit einem 4-6fachen Anstieg der Zellzahl, beginnend um den Tag 3 (Graeber et al., 1988). Bleibt der neuronale Zelltod aus, wandeln sich die Mikroglia wieder in den aktionsbereiten Zustand um (Stage of Alert).

3a. Phagozytose: Wenn die Neurone zu Grunde gehen (Höhepunkt 14 Tage nach Trauma), dann phagozytieren Mikroglia den anfallenden zellulären Debris. Es kommt dabei zur

Ausbildung von sog. Mikrogliaknötchen (4-20 Zellen). Nach Beendigung der Phagozytose löst sich die Mikrogliaakkumulation wieder auf.

3b. Bystander Activation: Die den phagozytotischen Knötchen benachbarten Mikrogliazellen werden mitaktiviert und verharren in einer aktivierten Form wie in 1 (Stage of Alert).

1.2.3 Astrogliale Reaktion

Astrozyten stellen zahlenmäßig die häufigste Zellart im zentralen Nervensystem (ZNS) dar und bilden das wichtigste Versorgungswerk im ZNS (Eddleston und Mucke, 1993). Sie finden sich morphologisch in zwei Formen. Sie sind in stellar-fibrilläre, mit langen, schlanken Fortsätzen, und in protoplasmatische, mit kurzen, stark verzweigten, eher plumpen membranösen Fortsätzen zu unterscheiden. Erstere finden sich v.a. in der weißen, letztere v.a. in der grauen Substanz. Sie stellen den Hauptanteil der Glia und bilden damit wesentlich das Mesenchym des ZNS mit seiner Vielzahl von Funktionen. Diese reichen von rein statisch-unterstützenden (Neurone, Menigen, Gefäße), über metabolisch-trophische (Neurone, extrazellulärer Raum) bis hin zu interzellulär-induktiven (Ausbildung der tight-junctions des Endothels, Ramifizierung der Mikroglia/ Monozyten) (Tsacopoulos et al., 1996; Janzer et al., 1987; Kloss et al., 1997; Pekny et al., 1998).

Wie bei der Mikroglia lassen sich verschiedene Stadien der Entzündungsreaktion unterscheiden. Nach Axotomie bilden sich im frühen Stadium die protoplasmatischen Astrozyten innerhalb von 2-3 Tagen in fibrillär-stellare Astrozyten um (Graeber et al., 1986). Mit dieser Transformation (astroglial scarring) können so geschädigte von ungeschädigten Zellkompartimenten abgegrenzt werden. Im zweiten Stadium nach ca. 14 Tagen lagert sich die Astroglia an verletzte Neurone an und löst die Mikroglia ab. Dabei umschließt sie mit feinen, dünnen Ausläufern die Neurone. Kommt es zur erfolgreichen Reinnervation, löst sich die astrogliale Umwallung des verletzten Neurons zum Teil, und es kommt zur Wiederaufnahme synaptischer Kontakte (Graeber et al., 1988a).

1.2.4 Einwanderung der Leukozyten

Das unverletzte Gehirn weist nur wenige Leukozyten auf. Im Blutkreislauf zirkulierende Monozyten wandern als perivaskuläre Makrophagen zwischen zentralem Nervensystem und Endothel in den Virchow-Robinschen Spalt. Daneben finden sich einige wenige aktivierte T-Lymphozyten (Hickey et al., 1991; Klein et al., 1997b).

Das Ausmaß der Aktivierung und der Einwanderung von Leukozyten (T-Lymphozyten und Natürliche Killer Zellen) hängt neben Astro- und Mikroglia auch vom Grad der Verletzung ab. Bei Axotomie kommt es nach 1-4 Tagen zu einem ersten mäßigen Einwanderungsschub von T-Lymphozyten in das Fazialiskerngebiet. Ein zweiter massiver Einwanderungsschub (100-

fach zur normalen Anzahl) erfolgt um den Tag 14, zeitlich korrelierend zum neuronalen Zelltod mit Ausbildung phagozytierender Mikrogliaknötchen. Dabei gruppieren sich die T-Lymphozyten v.a. um die Mikrogliaknötchen (Raivich et al., 1998b).

1.3 Molekulare Veränderungen

Den morphologischen Veränderungen nach Fazialisaxotomie liegt ein bisher nur teilweise verstandenes interzelluläres molekulares Signalnetzwerk zu Grunde, das von den Neuronen seinen Anfang nimmt.

1.3.1 Peripher (Nerv)

Thrombozyten setzen an der Verletzungsstelle platelet-derived growth factor (PDGF) frei. Serotonin und Histamin, die innerhalb von Minuten von degranulierenden Mastzellen freigesetzt werden, haben verschiedene Effekte auf Gefäße, Axone und endoneurales Gewebe. Vor allem die Mastzellgranulation mit dem Bestandteil 48/80 öffnet die Blut-Nerv Schranke mit Einstrom löslicher Moleküle, erhöht die Granulozyteneinwanderung und induziert die Expression von Interleukin 6 (IL6) in sensorischen Neuronen (Murphy et al., 1995). Bleibt die Mastzelldegranulation aus, z.B. durch pharmakologische Intervention mit Chromoglicinsäure, ist die Nervendegeneration vermindert und die Regeneration verlangsamt (McGovern and Estevez, 1980).

Schwannschen Zellen, Fibroblasten und Makrophagen werden durch eine Reihe bislang bekannter Moleküle aktiviert und rekrutiert. So spielt intracellulär Adhäsionsmolekül 1 (ICAM1), der endotheliale Ligand der Makrophagenrezeptoren α M β 2 und α L β 2, eine wesentliche Rolle bei der Einwanderung von Makrophagen. Des Weiteren ist Chemokinrezeptor 2 (CCR2), der Hauptrezeptor des Monozyten chemotaktischen Protein-1 (MCP1) und in geringerem Maß Chemokinrezeptor 5 (CCR5) von Bedeutung (Brown et al., 1997; Vougioukas et al., 1998; Siebert et al., 1999).

Makrophagen scheinen eine zentrale Rolle im Demyelinisierungsprozess innezuhaben (Carenini et al., 2001). Sie phagozytieren das anfallende Zelldebris und produzieren eine Vielzahl von Zytokinen wie Interleukin 1 (IL1), IL6, transforming growth factor β (TGF β), tumor necrosis factor α (TNF α) und PDGF, die sowohl Schwannsche Zellen als auch umliegende Fibroblasten zur Proliferation stimulieren (Lindholm et al., 1987; Raivich und Kreutzberg, 1993).

Der von Fibroblasten produzierte granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) induziert in Makrophagen und Schwannzellen MAC-2 (ein Galaktose spezifisches Lektin), das für die Umwandlung von myelinisierenden in phagozytierende Schwannsche Zellen verantwortlich ist (Saada et al., 1996). Myelin selbst enthält regenerationsinhibierende

Faktoren wie multiple antigenic glycopeptides (MAG), die durch die Phagozytose beseitigt werden.

1.3.2 Zentral

Nach peripherem Trauma kommt es in den Neuronen zur stark erhöhten Transkription verschiedener Substanzklassen. Die Ornithincarboxylase konnte schon in den achtziger Jahren als in der posttraumatischen Phase hochreguliertes Enzym nachgewiesen werden (Gilad and Gilad, 1983; Tetzlaff und Kreutzberg, 1984; Tetzlaff und Kreutzberg 1985). Die gleichzeitige Zunahme der Polyaminproduktion als Ausdruck einer unspezifischen zellulären Stressreaktion trägt zur veränderten Genregulation bei (Paschen, 1992; Seiler, 2000). Zu nennen sind Homeboxgene wie Hox-9, Transkriptionsfaktoren wie c-fos, c-jun, STAT-3, c-maf, JAK-Kinase und KROX-20 (Herdegen et al., 1992, 1993; Yao et al., 1997; Schwaiger et al., 2000, Schmitt et al., 2003). Strukturhaltende Proteine wie growth associated protein (GAP-43), einem bereits in der Embryonalphase nachweisbaren Wachstumsprotein, werden vermehrt synthetisiert (Skene, 1989; Saika et al., 1993). Neuropeptide wie calcitonin gene related peptide (CGRP), Galanin und vasoactive intestinal peptide (VIP) (Raivich et al., 1995) sowie die Stickstoffmonoxid-synthetisierende NADPH-Diaphorase (beteiligt an der Bildung von NO bei allen drei Enzymsubklassen e-, n- und iNOS) werden ebenfalls vermehrt synthetisiert. Daneben lassen sich vermehrt Zytokine wie IL1, IL6 und fibroblast growth factor (FGF), neurotrophe Faktoren wie nerve growth factor (NGF) und leukaemia inhibitory factor (LIF), mitogene Rezeptoren wie transferrin receptor (TfR), platelet derived growth factor-receptor a (PDGF-Ra) und p75 neurotrophic factor (p75NTR) Rezeptor (Klein et al., 1997a; Murphy et al., 1999a; Streit et al., 2000; Gschwendtner et al., 2003) und Zelladhäsionsmoleküle (Kloss et al., 1999; Jones et al., 2000) nachweisen. Chemokine wie Chemokin KC ((chemokine (C-X-C motif) ligand 1)) macrophage migration inhibitory factor (MIF) und monocyte chemoattractant protein 1 (MCP1), chemokine (C-C motif) ligand 2 (CCL2) und chemokine (C-X3-C motif) ligand 1 (CX3CL1), (fractalkine) werden neuronal vermehrt expremiert. Rezeptoren für diese Zytokine CCR2 (MCP1 Rezeptor) und CX3CR1 (CX3CL1 Rezeptor) werden von Mikroglia gebildet. Zudem erhöhen Neurone ihre Zelladhäsionseigenschaften, indem z.B. CD44 und das extrazelluläre Matrixprotein Thrombospondin (TSP) vermehrt expremiert werden (Möller et al., 1996; Jones et al., 1997, 2000; Raivich., 2002a).

Die regenerativ aussprossenden Neuriten der motorischen Neurone des Fazialiskerns zeigen in ihren Wachstumskegeln hohe Konzentrationen von Galanin und CGRP sowie vesicular acetylcholine transporter (VACHT) (Werner et al, 1999).

Auf Zytokin- sowie auf deren Rezeptorebene konnte bislang noch kein Molekül mit zentraler Funktion gefunden werden (Raivich, 2002a). Bisher kann eine Redundanz bzw.

Austauschbarkeit angenommen werden, was durch das Phänomen gemeinsamer intrazellulärer Signalkaskaden miterklärbar ist.

1.3.3 Mikroglia

Innerhalb der verschiedenen Stadien der mikroglialen Aktivierung spielen unterschiedliche Moleküle eine Rolle (Übersicht siehe: Raivich 2002). So ist die frühe Aktivierung stark abhängig von MCSF (Raivich et al., 1994; Kalla et al., 2001), IL6 (Galiano et al., 2001) und TGF β 1, wohingegen die späten Stadien (bystander activation) von TGF β 1 (Jones et al., 1998), tumor necrosis factor (TNF) und seinem Rezeptor (TNFR) abhängig sind.

In der frühen Phase - stage of alert (1) - finden sich in starker Expression das Zytokin α M β 2, ICAM1 und (Immunglobulin G) IgG. In der zweiten Phase - stage of homing (2) sind α M β 2, macrophage colony stimulating factor receptor (MCSFR) und α 6 β 1 stark expremiert. Lediglich mittelkräftig sind IgG und schwach major histocompatibility complex 1 (MHC1) und sein Kofaktor B7-2 nachweisbar, die für die Antigenpräsentation wesentlich sind (Bohatschek et al., 1999). Im Stadium höchster Aktivität stage of phagocytosis (3a) finden sich folgende molekulare Marker stark expremiert: die Immunrezeptoren MHC1, B7-2, die Zytokine α M β 6, α 5 β 1, α M β 2, ICAM1 und IgG. In der Phase der bystander activation (3b) sind diese Moleküle zwar vorhanden, jedoch weniger stark nachweisbar.

1.3.4 Astroglia

Die stellar fibrillären Astrozyten, die sich v.a. allem in der weißen Substanz finden, sind immunhistochemisch gut durch vermehrte Immunreaktivität von glial fibrillary acid protein (GFAP) nachweisbar (Bignami et al., 1972). Die plumpen, protoplasmatischen Astrozyten, die sich fast ausschließlich in der grauen Substanz befinden, sind nur im Zellkörper GFAP positiv, in den proximalen Zellausläufern weisen sie Immunreaktivität für eNOS oder S100b auf (Cammer und Tansey, 1988; Gabott und Bacon, 1996).

Die reaktive Astroglie, die dem verletzten zentralen Nervensystem im Sinne einer Narbenbildung physikalische Stabilität verleiht, ist durch eine vermehrte Expression von GFAP innerhalb der ersten 24h (Tetzlaff et al., 1988), von Vimentin und Nestin gekennzeichnet (Pekney et al., 1999). Sie sind wesentliche astrogliale Strukturproteine, die für die morphologische Veränderung in die stellare Formation unabdingbar sind (Graeber and Kreutzberg, 1988) und damit für die strukturelle Integrität des verletzten ZNS (Eliasson et al., 1999; Raivich et al., 1999a; Lepekin et al., 2001). Die frühe Aktivierung wird durch Chemokine wie LIF, ciliary neurotrophic factor (CNTF) und in einem geringeren Maß von IL6 mitbestimmt (Penkowa et al., 1999; Raivich et al., 2002).

IL6-Defizienz führt zu einer verminderten Ausbildung stellarer Astrozyten durch mangelnde Verteilung von GFAP in die Zellperipherie (Klein et al., 1997a; Penkowa et al., 1999) und zur geringeren Ausbildung GFAP positiver astroglialer Haufen (Raivich et al., 1999a, b). Die Abwesenheit von TGF β 1 hat einen gegenteiligen Effekt mit einer insgesamt erhöhten Zahl stellarer Astrozyten, jedoch auch der plumpen, protoplasmatischen Subpopulation (Raivich et al., 1999a, b).

Die aktivierte Astroglia versorgt die benachbarten Neurone mit einer Vielzahl von neurotrophen Faktoren wie NGF, ciliary neurotrophic factor (CNTF), insulin like growth factor-1 (IGF-1), transforming growth factor α (TGF α) (Eddleston und Mucke, 1993; Ridet et al., 1997). Astrogliose kann jedoch auch bei aller Notwendigkeit ihrer regelhaften Ausbildung die neuronale Regeneration und Reinnervation stark behindern. So führt GFAP-Defizienz mit der mangelhaften Ausbildung von Narbengewebe zu einer vermehrten Neuritenausprossung (Moon et al., 2000; Menet et al., 2000).

1.3.5 Lymphozyten

IL6 und MCSF sind wesentlich in der ersten, frühen Phase an der Rekrutierung von CD3 positiven T-Lymphozyten beteiligt (Galiano et al., 2001; Kalla et al., 2001). IL1 und TNF haben Einfluß auf die Rekrutierung von T-Lymphozyten in der späten Phase. Die Deletionen von IL1R und TNFR2 führen zu einer deutlich verminderten Lymphozytenrekrutierung. Dies gilt auch für IL6-Defizienz, jedoch v.a. in der frühen Phase der Einwanderung und in einem geringeren Maße in der späten Phase (Raivich et al., 2003). Die Einwanderung der Lymphozyten wird zudem durch Zelladhäsionsmoleküle erleichtert wie ICAM-1, vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) und durch verschiedene Selektine, die von den Endothelzellen der im betroffenen Gebiet befindlichen Gefäße vermehrt expremiert werden (Irani und Griffin, 1996; Pryce et al., 1997). Immunhistochemisch sind die aktivierten T-Lymphozyten stark positiv für CD44, ICAM-1 und α L β 2 (Raivich et al., 1998b).

Wie schon erwähnt, finden sich die T-Lymphozyten um phagozytotische MHC1, B7-2 und α X β 2 positive Mikroglia (mikrogliale Knoten). Insgesamt besteht ein enger Austausch zwischen Mikroglia und einwandernden T-Lymphozyten. Diesen wird v.a. in der späten Phase der posttraumatischen Reaktion eine zentrale Rolle in der immunologischen Reaktion und in der des neuronalen Überlebens zugesprochen (Raivich et al., 2003).

1.4 Untersuchte Moleküle

Vor diesem hier nur kurz skizzierten Hintergrund wurden das Chemokin Interleukin 6 (IL6), die beiden Neuropeptide calcitonin gene-related peptide (CGRP) und Galanin sowie die endotheliale und neuronale Stickoxidsynthetase (nNOS und eNOS) untersucht. Ihnen allen

gemeinsam ist die verstärkte neuronale Expression in je eigenem zeitlichen Muster nach Fazialisaxotomie. Im Folgenden sollen die einzelnen Moleküle kurz charakterisiert werden.

1.4.1 Interleukin 6

Interleukin 6 kommt ubiquitär im Organismus vor. Es beeinflusst unterschiedliche biologische Prozesse wie die Hämatopoese, es dient als Akutphaseprotein bei der Aktivierung der Immunantwort und ist an akuten Entzündungsprozessen beteiligt. Es gehört mit Ciliary Neurotrophic Factor (CNTF), Leukemia Inhibitory Factor (LIF), Oncostatin M (OSM), Interleukin 11 (IL11) und Cardiotrophin-1 in eine Gruppe von Faktoren mit ähnlichem Wirkungsbereich. Grund dafür ist der gemeinsame Signal transduzierende Faktor gp 130. Das Rezeptorbindungsverhalten und der weitere Transduktionsweg sind für die einzelnen Faktoren jedoch partiell unterschiedlich (Tadamitsu et al., 1992; Taga and Kishimoto, 1997). IL6 wird im zentralen Nervensystem von Neuronen, Makrophagen, Neuroglia, einwandernden T-Zellen bzw. peripher von Fibroblasten, Schwannschen Zellen und hier ebenfalls von Makrophagen gebildet. Es gelangt auch durch Einschwemmung bei Zerstörung der Bluthirnschranke an den Ort des Traumas.

Eine Reihe von Substanzen sind an der Regulation von IL6 beteiligt: Cytokine und proinflammatorische Moleküle (wie TNF- α , TGF- β , IL1, Prostaglandin E2 und LPS), Neurotransmitter und Neuropeptide (Norepinephrin, Epinephrin, Adenosin, Substanz P, Calcitonin, Serotonin, VIP) sowie Endo- und Exotoxine. Diese können sich in ihrer induktorischen Wirkung potenzieren (Überblick siehe Van Wagoner und Benveniste, 1999).

Nach Trauma wird IL6 als Akutphasemolekül innerhalb der ersten Stunden (Maximum ca. 24h) in unterschiedlichsten Gehirnregionen posttraumatisch exprimiert (Kiefer et al., 1993, Jeffrey et al., 2000).

IL6 besitzt protektive Wirkung. Nach peripherem Trauma beeinflusst es positiv das Überleben und die Regeneration von motorischen wie sensorischen Neuronen und deren axonaler Regeneration (Schafer et al., 1999; Thier et al., 1999). Experimentell führt die Dauerexpression von IL6 und Interleukin Rezeptor (IL6R) zu einer erhöhten Regenerationsgeschwindigkeit (Hirota et al., 1996).

Entsprechend konnte gezeigt werden, dass es bei der Regeneration zu einer Hochregulierung von IL6 und des IL6R zentral in den betroffenen Neuronen und peripher in den umgebenden Schwannschen Zellen kommt (Kiefer et al., 1993; Murphy et al., 1995; Hirota et al., 1996; Zhong et al., 1999). Die Hochregulierung durch stimulierende Faktoren geht dabei vom Nervstumpf aus. Diese Faktoren werden von Mastzellen oder Schwannschen Zellen freigesetzt (Reichert et al., 1996; Murphy et al., 1999).

IL6 zeigte auch im zentralen Nervensystem nach neuronaler Schädigung wie Axotomie oder Ischämie neuroprotektive Wirkung (Ikeda et al., 1996; Loddick et al., 1998; Murphy et al.,

1999). Ali et al. (2000) beschrieben einen verringerten neuronalen Zelltod, indem IL6 die Toxizität von NMDA vermittelter Exzitation milderte. IL6 stimuliert während dieses Prozesses Mikro- und Astroglia. Es kommt zu einer reaktiven Gliose (Penkowa et al., 1999; Streit et al., 2000). Bei Überexpression oder zusätzlicher Gabe von IL6 kommt es zu einer überschießenden astroglialen Narbenbildung, vermehrter ramifizierter Mikroglia und größerer neuronaler Schädigung (Campbell et al., 1993; Fattori et al., 1995).

Neben der lokalen Immunstimulation kommt es im Rahmen der IL6 Expression zur vermehrten Rekrutierung immunkompetenter Zellen wie Mono- und Lymphozyten (Hirano et al., 1986; Lotz et al., 1988; Penkowa et al., 1999; Legos et al., 2000).

1.4.2 Calcitonin gene related protein (CGRP)

Calcitonin gene-related peptides (CGRPs) sind zwei fast homologe Proteine CGRP- α und - β (auch CGRP I und II) (Morris et al., 1984; Steenbergh et al., 1985). Mit einer Sequenzhomologie von 25% und 50% gehören Adrenomedullin und Amylin in die gleiche Familie von Neuropeptiden (Kitamura et al., 1993; Cooper, 1994).

Die teils sequenzidentischen Proteine CGRP, Amylin, Adrenomedullin und Calcitonin teilen die Basisrezeptoren Calcitoninlike Rezeptor CLR (Chang et al., 1993) und Calcitoninrezeptor (CTR) (Sexton et al., 1993). Durch Kombination mit Coproteinen „receptor activity modifying proteins“ (RAMP 1-3) weisen diese wiederum eine je unterschiedliche relative Spezifität auf (Sexton et al., 2001). Aufgrund der Sequenzähnlichkeit der Peptide kommt es zu Kreuzaffinitäten/ Kreuzreaktivitäten auf Rezeptorebene mit sich überschneidenden Wirkungsspektren (Christopoulos et al., 1999; Muff et al., 2001). CLR/(CTR) in Kombination mit RAMP1 ist wesentlich affin zu CGRP. Es ist dem CGRP R1 am ehesten äquivalent (Mallee et al., 2002). Es ist Gegenstand der Forschung, ob CGRP R2 als eigene molekulare Entität zu definieren ist oder eine Kombinationsvariante von CLR/(CTR) plus RAMP1 und weiteren modulierenden Molekülen wie zum Beispiel das cytosolische RCP (receptor component protein) darstellt (Moreno et al., 2002; Prado et al., 2002).

CGRP ist weit verbreitet in Neuronenpopulationen des zentralen und peripheren Nervensystems, wo es im adulten Stadium jedoch kaum oder verhältnismäßig gering exprimiert wird (Kresse et al., 1992; Ishida-Yamamoto and Tohyama, 1989; Skofitsch and Jacobowitz, 1985). CGRP- α und - β sind nahezu identisch in ihrer Wirkung. Sie zeigen ein unterschiedliches Expressionsmuster in den einzelnen Gehirnlokalisationen (Noguchi et al., 1990). CGRP sowie seine Bindungsorte konnten im gesamten zentralen und peripheren Nervensystem aufgezeigt werden (Kruger et al., 1988; Inagaki et al., 1986; Yamin et al., 1994; Flühmann et al., 1997). CGRPMRNA und Immunreaktivität für CGRP lassen sich, mit Ausnahme der visceromotorischen, in fast allen kranialen Hirnnervenkernen und in nahezu allen kranialen und spinalen Motoneuronen nachweisen, deren Zielgewebe quergestreifte

Muskulatur ist (Rethelyi et al., 1989, Raivich et al, 1995). CGRP wird im Zellkern synthetisiert und anterograd zu den Synapsen der motorischen Endplatten transportiert (Popper and Micevych, 1989).

CGRP ist an einer Vielzahl von Funktionen des zentralen, peripheren und autonomen Nervensystems beteiligt. Wirkungsbereiche finden sich in der Regulation des autonomen Nervensystems (kardiovaskuläres, gastrointestinales System), im limbischen System (Nahrungsaufnahme), in der Verarbeitung sensorischer (akustisches und optisches System) und sensibler Reize (Schmerzwahrnehmung) und in kognitiven Funktionen (Übersicht siehe: Van Rossum et al, 1997). CGRP wird während der Embryonalphase stark exprimiert. Es ist an der Ausdifferenzierung des Nervensystems beteiligt, v.a. an der Ausbildung und Regeneration neuromuskulärer Kontakte und an dem postnatalen Apoptoseprozess (Esquerada et al.1989; Mason and Mudge , 1992; Changeux et al., 1992).

Nach Denervation kommt es zu einer starken Hochregulierung von CGRP in den Motoneuronen verglichen mit der bei intakter Innervation lediglich geringen Expression. Es zeigt sich ein biphasischer Verlauf mit Anstieg wenige Tage nach Axotomie und erneutem geringeren Anstieg bei Reinnervation (Dumoulin et al., 1991). Zusätzlich reichert sich CGRP in hoher Konzentration in den aussprossenden Wachstumskegeln an und ist in besonders schnell regenerierenden Axonen nachweisbar (Werner et al., 1999; Gray et al., 1992). Des Weiteren ist es an der neuromuskulären Endplatte lokalisiert (Csillik et al., 1993). Gliazellen und Schwannsche Zellen verfügen über CGRP-Rezeptoren. Zentral kommt es bei in vitro Modellen zu einer cAMP induzierten Proliferation von Mikro- und Astroglia, peripher zu einer Aktivierung von Schwannschen Zellen (Dumoulin et al., 1991; Haas et al., 1991 b,c; Raivich et al., 1995; Cheng et al., 1995). Für CGRP konnte auch ein hemmender Einfluss auf immunkompetente Zellen wie B- und T-Lymphozyten, Makrophagen und neutrophile Granulozyten gezeigt werden (Wang et al., 1992; Richter et al., 1992; McGillis et al., 1993; Jansen et al., 1999; Liu et al., 2000).

1.4.3 Galanin

Das Neuropeptid Galanin (1-Glycin, 29-Alanin) wurde 1983 erstmals isoliert (Tatemoto et al., 1983) und besteht bei der Maus aus 29 Aminosäuren. Neben Galanin ist Galanin-Message-Associated-Peptide (GMAP) mit 60 Aminosäuren das zweite Spliceprodukt eines großen Vorläuferproteins. Die N-terminalen 15 Aminosäuren von Galanin sind in ihrer Sequenz hoch konservativ und dabei notwendig und ausreichend für die Rezeptorerkennung und –aktivierung (Bedecs et al., 1995).

Galanin lässt sich immunhistochemisch in vielen Regionen im Gehirn der Maus nachweisen (Perez et al., 2001). In der Maus wurden bislang drei Rezeptoren für Galanin gefunden (GAL1, GAL2, GAL3). Sie lassen sich in unterschiedlicher Verteilung im gesamten

peripheren und zentralen Nervensystem nachweisen (Waters et al., 2000). Sie unterscheiden sich in ihrer Aminosäuresequenz, in ihrem Bindungsverhalten zu Galaninfragmenten und Galanin selbst und in ihrer Signaltransduktion (Florén et al., 2000). Diese wird über G-Proteine vermittelt, denen sich intrazellulär unterschiedliche Signaltransduktionen und Wirkungen anschließen, wie die Hemmung der Phosphatidylinositolhydrolase und die der Adenylatzyklase sowie die Stimulierung der Phospholipase C (Bedecs, 1995; Wang et al., 1998; Iismaa und Shine, 1999; Branchek et al., 2000).

Bislang sind Galanin vielfältige, überwiegend hemmende Effekte zugeschrieben worden. So wirkt es negativ auf kognitive (Lernen und Gedächtnis) und auf affektive Funktionen (Depression bzw. Angst auslösend). Es führt zu einer Verminderung der Neurotransmitterausschüttung und der neuronalen Feuerrate, womit es schmerzhemmend wirkt (Übersicht: Wrenn and Crawley, 2001; Wiesenfeld-Hallin, Xu, 2001). Galanin wirkt im neuroendokrinen System stimulierend auf die Freisetzung von Wachstumshormon und Prolactin (Ottlecz et al., 1986) sowie auf die Fettaufnahme (Kyrkouli et al., 1986; Crawley, 1999).

Galanin ist während der embryonalen Entwicklung stark exprimiert, was nach Geburt rasch auf wenige Prozent der Neurone abfällt. Nach Axotomie kommt es in 40-50% der sensorischen, aber auch in sympathischen und motorischen Neuronen zu einer erneuten starken Hochregulierung und einem anterograden Transport entlang der auswachsenden Axone in die Wachstumskegel (Hokfelt et al., 1987; Saika et al., 1991; Schreiber et al., 1994; Shadiack et al., 1998). Die Expression wird von LIF induziert und von NGF gehemmt (Sun and Zigmond, 1996; Corness et al., 1998). Versuche an Galanin-defizienten Mäusen zeigten im Vergleich zum Wildtyp ein verringertes Überleben von sensorischen Neuronen, eine verminderte axonale Regeneration bei ausgewachsenen Mäusen und eine verstärkte Apoptose bei neugeborenen Mäusen. Bei in vitro Studien zeigten die Galanin-defizienten Neurone ein verringertes Neuritenwachstum (Holmes et al., 2000). Darüberhinaus konnte für Galanin eine neuroprotektive Wirkung nachgewiesen werden (O'Meara et al., 2000).

1.4.4 Neuronale und endotheliale Stickoxidsynthetase (nNOS und eNOS)

1.4.4.1 Stickoxid (NO)

Stickoxid (NO) ist im ganzen Organismus wirksam und seine Funktionen sind vielfältig. Die Synthese erfolgt durch drei Isoenzyme: n-, i-, eNOS (neuronal [NOS-1], independent bzw. inducible [NOS-2], endothelial [NOS-3] nitric oxide synthase). n- und eNOS sind in ihrer Aktivität Ca^{++} abhängig (auch nc- bzw. ecNOS genannt) und liegen zellulär in inaktiver Form vor, während iNOS Ca^{++} unabhängig induzierbar ist. Bei Präsenz Ca^{++} stimulierender

Faktoren (z.B. Bradykinin, Thrombin) kommt es bei e/nNOS zu einer eher transienten Wirkung, wogegen iNOS eine dauerhafte, kumulative Aktivität zeigen kann (Marletta, 1994). NO ist in seiner Aktivität nicht beschränkt auf anatomische Strukturen, es ist nicht abhängig von der Verteilung durch den Kreislauf und muss nicht an spezifische Rezeptoren koppeln. Seine Wirkung basiert auf transzellulärer Diffusion und lässt sich paradox als ungerichtet spezifisch bezeichnen (Schmidt and Walter, 1994; Bredt, 1999). Daher sind die bisher bekannten Wirkungsspektren von n- und eNOS als klar zuordenbare eingeschränkt zu bewerten. Darüberhinaus ist der Einfluss von iNOS in ihrer unabhängigen Wirkungsweise ebenfalls nicht klar abzugrenzen (Paakkari and Lindberg, 1994; Chao et al., 1996; Minghetti et al., 1998; Murpy et al., 2000). nNOS und eNOS kommen entgegen ihrer durch Erstbeschreibung bedingten Bezeichnung im Gesamtorganismus an vielfältigen Lokalisationen vor. Sie überlappen sich in Ihrem Vorkommen sowohl bezüglich der Zellpopulation als auch bezüglich der Zellkompartimente. NO wird sehr rasch nach neuronalem Trauma gebildet (Kumar et al., 2001).

1.4.4.2 Endotheliale Stickoxidsynthetase (eNOS)

eNOS ist in endothelialen Zellen lokalisiert, jedoch auch in Neuronen und Astrozyten nachweisbar (Wiencken et al. 1999). Das von (e, -n)NOSs gebildete NO hat im Nervensystem vielfältige Wirkungen. So fungieren beide durch die Bildung von Stickstoffmonoxid je unterschiedlich modulierend auf die Freisetzung erregender und hemmender Neurotransmitter in unterschiedlichen Regionen des zentralen Nervensystems (Kano et al., 1998), bzw. NO hat selbst die Funktion eines nonadrenerger-noncholinerg Neurotransmitters. eNOS hat v.a. gefäßrelaxierende, antiischämische und antiatherosklerotische, sowie mit seiner hemmenden Wirkung auf die Lymphozytenmigration eine neuroprotektiven Wirkung (Lefer et al., 1999; Sanz et al., 2001; Altay et al., 2004). Zusätzlich hemmt NO neuroprotektiv die Migration von Mikroglia an den Ort des Traumas (Chen et al., 2001). Im Gegensatz zu eNOS's antiischämischer Wirkung, scheint nNOS proischämische Wirkung zu haben (Huang et al., 1999). Darüberhinaus zeigt eNOS einen positiven Effekt auf die Neuroregeneration und axonale Regeneration nach Trauma, wo es vor allem in der vasa vasorum des auswachsenden Axons zu finden ist (Gonzalez-Hernandez et al., 1999; Cheng et al., 2005).

1.4.4.3 Neuronale Stickoxidsynthetase (nNOS)

nNOS lässt sich im gesamten Nervensystem in unterschiedlicher Dichte, v.a. in Neuronen, weniger in Astrozyten nachweisen (Iwase et al., 1998; Cork et al., 1998; Aoki et al., 1998; Eliasson et al., 1997). nNOS hat modulierend hormonal-sekretorische und vielfältige physiologische Funktionen (Schmerzwahrnehmung, Ess- und Schlafverhalten,

Thermoregulation, Mikrozirkulationssteuerung). nNOS wirkt modulierend auf die Synaptogenese und –plastizität. Es ist in der Embryonalperiode an dem koordinierten Aufbau des neuronalen Netzwerkes beteiligt (Williams et al., 1994; Oermann et al., 1999). Postnatal zeigt sich sein Einfluß auf Lernen und Gedächtnis (Schuman and Madison, 1994; Böhme et al., 1993). In vivo und in vitro Studien zeigen widersprüchliche Wirkungsweisen von NO: In Regionen höchster NO-Konzentration war vermehrte Synapsenbildung nachzuweisen, wohingegen es zu einem Kollaps von Wachstumskegeln bei aussprossenden Axonen in vitro bei Zugabe von Stickstoffmonoxid kommt (Hess et al., 1993). Nach axonaler Schädigung ist nNOS verstärkt in den geschädigten Neuronen expremiert (Gonzalez-Hernandez et al., 1999). nNOS-defiziente Mäuse zeigten jedoch keine morphologischen neuronalen Veränderungen, was auch durch Ausgleich des Defizits durch die NOS-Isoformen, hier vor allem eNOS miterklärbar wäre (Huang et al., 1998). Daneben scheint nNOS wie auch eNOS, jedoch in geringerem Maße, eine hemmende Wirkung auf das Immunsystem zu haben (Lefer et al., 1999). Andere Untersuchungen wiederum zeigen für nNOS auch eine migrationsfördernde Wirkung auf die Lymphozyten (Altay et al., 2004).

1.5 Zielsetzung

Wie schon erwähnt, ist den hier einführend charakterisierten Substanzen gemeinsam, dass sie nach Fazialisaxotomie in je eigenem Zeitverlauf verstärkt expremiert werden. Es stellt sich die Frage, ob diese Substanzen eine Rolle und wenn ja, welche Rolle in der posttraumatischen Reaktion nach peripherem Trauma im motorischen Fazialiskern und im Fazialisnerven spielen. Die einzelnen zellulären Reaktionen, die von den traumatisierten Neuronen ihren Anfang nehmen, sollen im Folgenden anhand des Fazialismodells bei Gen-defizienten Tieren hinsichtlich der einzelnen Substanzen und ihrer Wildtyp-Vergleichsgruppe untersucht werden. Die immunhistochemische Analyse zielt vor allem auf Unterschiede in der Quantität und Morphologie: Unterschiede in der Quantität der Zellen oder ihrer Bestandteile (z.B. die Anzahl der eingewanderten Lymphozyten, der mikroglialen Knötchen, der aussprossenden Wachstumskegel etc.) und Unterschiede in der Quantität der molekularen Expression, die posttraumatisch in den einzelnen Zelltypen einem verhältnismäßig stereotypen Muster folgt. Hat die Defizienz der hier untersuchten Moleküle Einfluss auf die Quantität des immunhistochemischen Nachweises anderer hochregulierter Moleküle, und wie könnte dies zu den möglicherweise vorzufindenden zellulären Veränderungen im Zusammenhang stehen? Gibt es beim Vergleich der Gen-Defizienz und der Wildtyp Gruppe Unterschiede in der Morphologie der einzelnen Zellpopulationen (z.B. unterschiedliche Formation der Astrozyten)? Diese Fragen sollen mit den folgenden Experimenten untersucht werden.

2 ERGEBNISTEIL

2.1 Interleukin 6 und die zelluläre Antwort auf Verletzung des Fazialisnervs

2.1.1 Axonale Regeneration des gequetschten Fazialisnervs

Die Quetschung des peripheren Fazialisnerven führt mit einiger Verzögerung zu einem Wiederauswachsen der Axone und zur Reinnervation der Muskulatur der Barthaare um den Tag 7. Frühere elektrophysiologische und autoradiographische Studien konnten eine Regenerationsgeschwindigkeit der motorischen und sensorischen Neurone von ~4mm/Tag zeigen (Forman and Berenberg, 1978; Bisby and Keen, 1985; Chen and Bisby, 1993). Es konnte zudem gezeigt werden, dass die Regeneration mit einer Verzögerung von 2 Tagen beginnt (Forman and Berenberg, 1978). Dies ergibt eine Regenerationsgeschwindigkeit von ~3mm/Tag, wenn man bedenkt, dass die Regenerationsstrecke am Tag 4 ca. 6 – 7mm beträgt (Werner et al., 2000). CGRP und Galanin lassen sich am Tag 4 immunhistochemisch gut in den Wachstumskegeln in je unterschiedlicher Neuronenpopulation nachweisen (Gray et al., 1992; Moore et al., 1989).

Die axonale Regeneration des gequetschten Fazialisnerven wurde hier 96h nach der Verletzung untersucht (Methode beschrieben bei Werner et al., 2000). Die immunhistochemische Darstellung der axonalen Wachstumsfront der regenerierenden CGRP- oder Galanin-positiven Motoneuriten und deren Wachstumskegel gelang in Paraformaldehyd fixierten, 10µm dünnen, longitudinal geschnittenen Fazialisnerven. Fünf Gewebsschnitte in einem Abstand von 50µm wurden verwendet, um die mittlere Regenerationsstrecke der Axone für das jeweilige Neuropeptid je Tier zu bestimmen (n = 5 in jeder Gruppe). Es wurde von der Quetschungsstelle (lichtmikroskopisch und durch autochtone Fluoreszenz nachweisbar) bis zu dem weitest distal befindlichen Wachstumskegel gemessen.

Wichtig ist zu bemerken, dass alle hier vorgestellten Ergebnisse im Mittelwert +/- Standardabweichung des Mittelwertes (SEM) aufgeführt werden.

Normale Wildtypmäuse zeigten eine Regenerationsstrecke von 6,54mm +/-0,21mm für CGRP-immunreaktive und von 6,63mm +/-0,14mm für Galanin-immunreaktive Axone am Tag 4. Homozygot IL6-defiziente Mäuse zeigten eine mäßige, aber statistisch signifikant verminderte Regenerationsstrecke um 14% oder 0,93mm für Galanin-immunreaktive und um 12% oder 0,77mm für CGRP-immunreaktive Axone (P < 0,03 für CGRP, P < 0,001 für Galanin, Student t-test, Mittelwert der Regenerationsstrecke +/- Standardabweichung des Mittelwertes SEM) (Abb. 2A, S. 18).

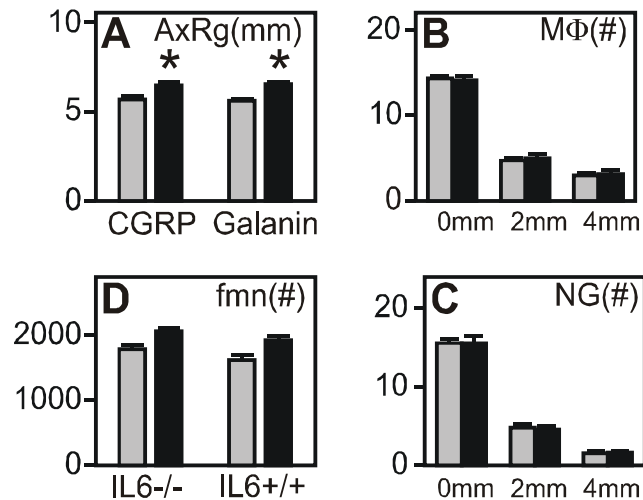


Abbildung 2 (A-C). Axonale Regeneration (A) und zelluläre Infiltrate (B, C) im verletzten Fazialisnerv 4 Tage nach Nervquetschung in IL6^{-/-} Mäusen (graue Balken) und in IL6^{+/+} Mäusen (schwarze Balken). Mittelwert und SEM, n=5 Tiere je Gruppe. *P <0,005 im Student t-Test. Das Ausmaß der axonalen Regeneration wurde durch die Distanz zwischen der Wachstumsfront der regenerierenden CGRP oder Galanin-immunreaktiven Axone und der Stelle der Nervenquetschung bestimmt. Einwandernde neutrophile Granulozyten (NG) wurden durch Immunhistochemie mit endogener Peroxidase an der Nervenquetschungsstelle, 2mm und 4mm distal nachgewiesen. Die Makrophagen (MΦ) wurden durch Immunreaktivität mit αMβ2 Integrin nachgewiesen. Die Anzahl der Makrophagen ist definiert durch die Anzahl pro Zählgitter von 0.39mm² (bei 20xVergrößerung).

Abbildung 2 (D) zeigt die unterschiedliche neuronale Überlebensrate 30 Tage nach Fazialisaxotomie. Danach kam es zu einem nicht signifikanten Unterschied (P = 0,42) von 3% bei 16% Neuronenverlust bei IL6^{+/+} gegenüber 13% Verlust bei IL6^{-/-}. Graue Balken axotomierte Seite, nichtaxotomierte Seite schwarze Balken.

2.1.2 Makrophagen- und Granulozyteneinwanderung in den gequetschten Fazialisnerven

Neben der axonalen Regenerationstrecke wurde noch die Anzahl der in den Fazialisnerven eingewanderten Makrophagen und neutrophilen Granulozyten bestimmt. Die Anzahl wurde ebenfalls am Tag 4 nach Verletzung an der Quetschungsstelle selbst, 2mm und 4mm distal davon erfasst. Es wurden wieder fünf Schnitte von 50µm Abstand zueinander je Tier untersucht, bei 5 Tieren pro Gruppe (n = 5) (Abb. 2B und C, S. 18). Die Makrophagen wurden mit Immunhistochemie für αMβ2 Integrin nachgewiesen, die Granulozyten mit Immunhistochemie für die endogene Peroxidase. Es konnte kein statistisch signifikanter Unterschied in der Anzahl der nachgewiesenen Makrophagen und in der Anzahl der nachgewiesenen Granulozyten zwischen den IL6-defizienten Mäusen und der Wildtyp Vergleichsgruppe 4 Tage nach Quetschung gezeigt werden.

2.1.3 Lymphozyteneinwanderung in den Fazialiskern

Die Fazialisaxotomie führt zu einer zweiphasigen T-Lymphozytenrekrutierung in den verletzten Fazialiskern. Der erste Gipfel der Lymphozyteneinwanderung ist um den Tag 1-4 nach Fazialisaxotomie zu sehen, der zweite, ausgeprägtere Gipfel am Tag 14 (Raivich et al., 1998b). Die einwandernden T-Zellen wurden mit Immunreaktivität für CD3 nachgewiesen. Hierbei wurden je Tier sieben 20µm dünne Schnitte mit gleichem Abstand von 120µm zueinander verwandt. Der Nachweis der Lymphozyten erfolgte am Tag 1 und am Tag 4

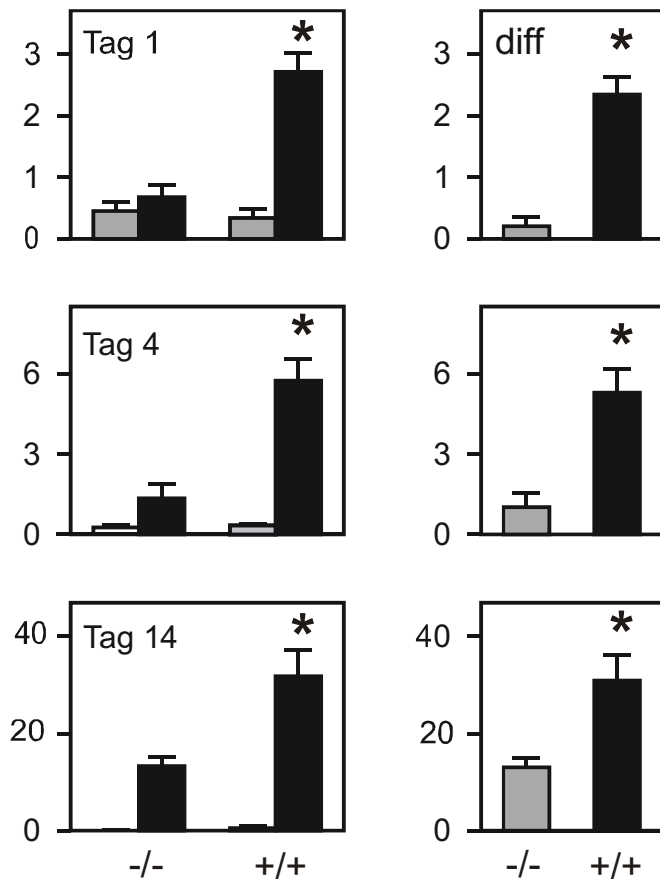


Abbildung 3.

Lymphozyteneinwanderung in den Fazialiskern am Tag 1, 4, und 14 nach Axotomie des Fazialisnerven, Effekte der IL6-Defizienz (-/-). Linke Seite: Gesamtanzahl der CD-3-positiven T-Zellen pro Schnitt des Fazialiskerns im Vergleich der kontralateralen Seite (graue Balken) zur axotomierten Seite (schwarze Balken). Rechte Seite: Die IL6-/- Mäuse (graue Balken) zeigen eine 90%ige Reduktion für die Anzahl der CD3+ T-Zellen am Tag 1, ein 80%ige Verminderung am Tag 4 und immer noch eine 60%ige Verminderung am Tag 14

(* p<0.01). Jeweils im Vergleich zur Wildtyp Gruppe (schwarze Balken). Beachte den graduellen Zuwachs in der Anzahl der CD3+ Lymphozyten zwischen Tag 1 und Tag 14.

in sieben Gewebsschnitten pro Tier (n = 4). Am Tag 14 erfolgte er an zwei Schnitten, die in einem Abstand von 340µm zueinander lagen (n = 6-7).

Die höhere Anzahl an Schnitten am Tag 1 sollte die Variabilität der weit geringeren Anzahl der eingewanderten T-Zellen zu den frühen Zeitpunkten ausgleichen. So ließen sich am Tag 1 2,74 +/-0,38 CD3-positive Zellen pro Gewebsschnitt und am Tag 4 5,82 +/-0,42 CD3-positive Zellen nachweisen, gegenüber 32,8 +/-5,5 am Tag 14. Wie in Abb. 3 (S. 19) gezeigt führte IL6-Defizienz zu einer signifikanten, 10-fach verminderten Einwanderung von CD3-positiven T-Zellen am Tag 1, zu einer 5-fach verminderten am Tag 4 und zu einer 2,3-fach verminderten Einwanderung am Tag 14 im Vergleich zur Wildtypgruppe (P < 0,01 im Student-t Test zu allen drei Zeitpunkten). Die Infiltration von CD3-positiven Zellen auf der unoperierten, kontralateralen Seite war nicht von der IL6-Defizienz beeinflusst (Abb. 3, S. 19).

2.1.4 Neuronales Überleben

Die Fazialisaxotomie führt zum neuronalen Zelltod mit einem Gipfel am Tag 14 (Möller et al., 1996; Raivich et al., 1998b). Hier wurde das neuronale Überleben 30 Tage nach Fazialisaxotomie untersucht. Der Nachweis der Neurone erfolgte mit einer Färbung nach Nissl in 25µm dünnen, in Paraformaldehyd fixierten Schnitten. Alle neuronalen

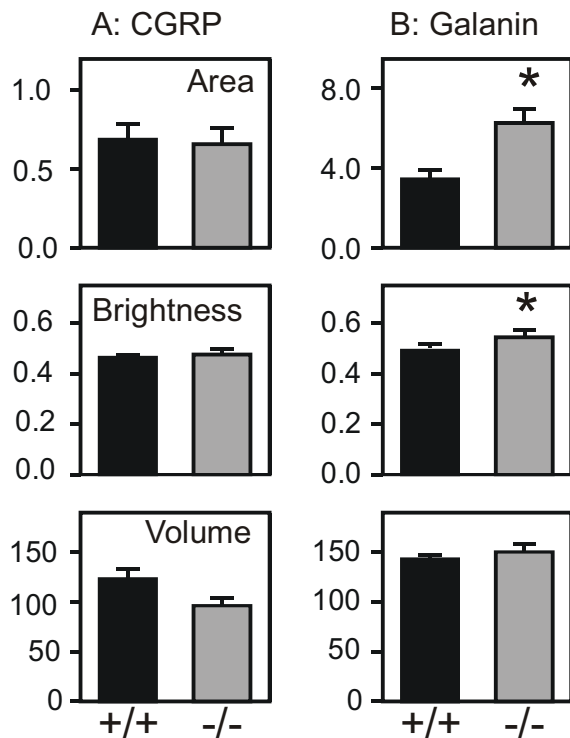


Abbildung 4. Effekte der IL6-Defizienz auf Wachstumskegel aussprossender Axone am Tag 14: gezeigt wird die Summe quantitativer Parameter wie der umschriebenen Feldgröße, der Helligkeit und des Volumens, mit 7 Tieren in jeder Gruppe. Die Feldgröße der Wachstumskegel wird wiedergegeben in Elementen pro Tausend (ppt = parts pro thousand) einer 1024x1024 Pixel Bitmap, die Helligkeit als Logarithmus der Ratio der mittleren Wachstumskegel zur mittleren Bitmap Helligkeit und das mittlere Wachstumskegelvolumen in μm^3 . IL6-Defizienz beeinflusst nicht die Anzahl CGRP-positiver Wachstumskegel, führt jedoch zu einer fast 2 fachen Steigerung in der Gesamtheit der umschriebene Feldgröße der Galanin immunreaktiven Wachstumskegel und auch zu einer Steigerung in ihrer relativen Helligkeit.

Zellprofile wurden durch den gesamten Fazialiskern auf der operierten und auf der unoperierten Seite gezählt. Die Anzahl für die neuronale Größe wurde korrigiert, indem die Abercrombie Korrekturberechnung verwandt wurde (siehe Material und Methoden, S. 92 f). Die korrigierte Anzahl der Motoneuronen betrug auf der unoperierten Seite in normalen Mäusen 1954 +/-58 (n = 7, Mittelwert +/- Standardabweichung) und stimmte damit mit vorher veröffentlichten Daten über die Anzahl von Motoneuronen im Fazialiskern überein (Sendtner et al., 1997).

Verglichen mit der unoperierten Seite, führte die Fazialisaxotomie zu einem 16%igen Verlust von Motoneuronen bei IL6+/+ Mäusen (1645 +/-85 auf der axotomierten Seite) und zu einem 13%igen bei IL6-/- Mäusen 30 Tage nach Fazialisaxotomie (1815 +/-60 Motoneurone auf der axotomierten gegenüber 2087 +/-47 auf der kontralateralen Seite, n = 9 Tiere) (siehe Abb. 2D, S 18). Damit ergab sich für den neuronalen Zellverlust keine signifikante Veränderung zwischen den zwei Vergleichsgruppen mit p = 0,42.

2.1.5 Zentrale Wachstumskegel

Fazialisaxotomie führt zum Wiederauswachsen von Neuriten mit der Ausbildung von Wachstumskegeln. Diese sind im Fazialiskern und hauptsächlich in der perinukleären weißen Substanz mit einem Gipfel am Tag 14 nach Verletzung nachzuweisen (Abb. 1, S. 5). Die Wachstumskegel zeigen sehr starke Immunreaktivität für CGRP, Galanin und vesikulären Acetylcholintransporter (VACHT). Zudem wurden die Neurone retrograd mit Mini-Ruby markiert, das an den proximalen Stumpf des axotomierten Nervs appliziert wurde, um die Herkunft als auswachsende Neurite der Neurone des Fazialiskerns zu bestätigen (Kloss

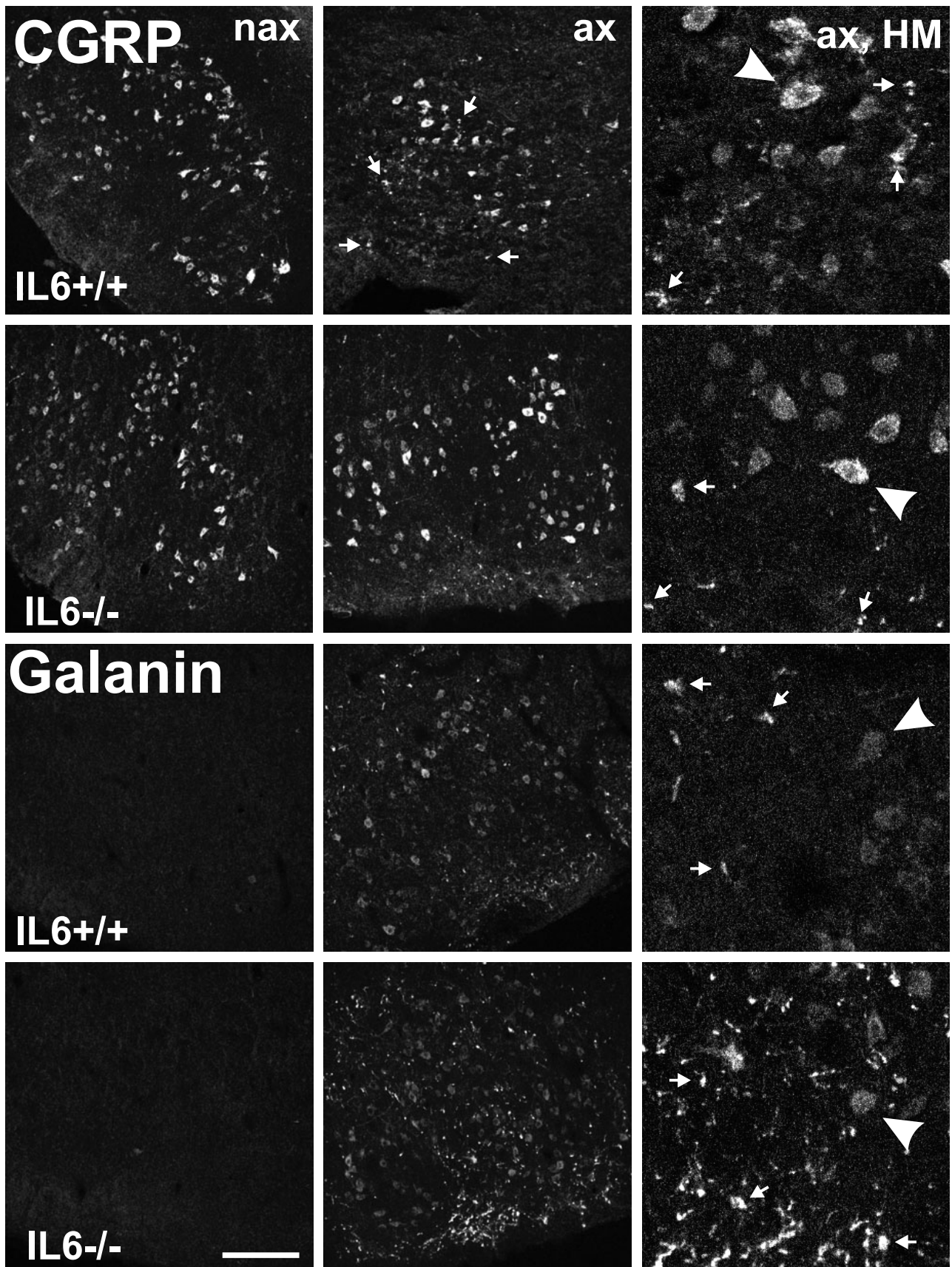


Abbildung 5. CGRP- und Galanin-immunreaktive axonale Wachstumskegel im und um den Fazialiskern 14 Tage nach Fazialisaxotomie. Fazialisaxotomie führte zum Auftreten stark Neuropeptid-immunfluoreszenter Wachstumskegel (kleine Pfeile) in der Nachbarschaft von axotomierten neuronalen Zellkörpern, mit einem Maximum am Tag 14. Vergleich nichtaxotomierte (nax) Seite mit der axotomierten (ax) Seite. HM: axotomierter Fazialis in höherer Vergrößerung (183x). Die Wachstumskegel (kleine Pfeile) waren besonders prominent in der weißen Substanz ventral zum Fazialiskern. Sie waren kleiner als die benachbarten Motoneurone (große Pfeile), zeigten jedoch eine weit stärkere Immunfluoreszenz für CGRP (obere beiden Reihen) und Galanin (untere beiden Reihen). IL6-Defizienz führte zu einer starken Zunahme in den Galanin-immunreaktiven Wachstumskegeln (Vergleich IL6^{-/-} mit IL6^{+/+}). Die weniger zahlreichen CGRP-positiven Wachstumskegel zeigten keinen Unterschied. Bemerkenswert ist die Abwesenheit neuronaler Galaninimmunreaktivität im nichtaxotomierten Fazialiskern. Maßbalken: 0,25mm linke und mittlere Spalte, 75µm rechte Spalte.

et al., 1999; Werner et al., 1999). Wie in Abb. 5, linke Spalte (S. 21) zu sehen, sind diese Wachstumskegel auf der kontralateralen Seite nicht nachzuweisen.

Beide Gruppen von Mäusen, IL6+/+ und IL6-/-, zeigten ein ähnlich mäßiges Aussprossen der CGRP-positiven Wachstumskegel 14 Tage nach Fazialisaxotomie (Abb. 5, erste und zweite Reihe, S. 21). Die Quantifizierung des Areals, in dem intensiv angefärbte CGRP-immunreaktive Wachstumskegel gemessen wurden (Material und Methoden, S. 90 ff), zeigte einen Anteil von 0,7 +/-0,1 Bildpunkten (englisch = pixel) pro Tausend (ppt) für IL6+/+ und 0,67 +/-0,11 ppt für IL6-/- (Mittelwert +/- Standardabweichung, n = 7 Tiere pro Gruppe, P = 0,87 im Student t-test) (Abb. 4, oben links, S. 20).

Die Galanin-immunreaktiven Wachstumskegel waren schon in der Wildtyp Gruppe zahlreicher (3,54 +/-0,43 ppt in IL6+/+ Mäusen). Diese ohnehin stärkere Antwort auf die Axotomie war in IL6-/- Tieren hochsignifikant um den Faktor 1,8 vermehrt (6,36 +/-0,68 ppt, mit P < 0,001) (Abb. 4, oben rechts, S. 20; zu sehen auch in Abb. 5, 3. und 4. Reihe, S. 21). Die Quantifizierung der Galanin-Immunreaktivität in den markierten Wachstumskegeln, durchgeführt mit dem modifizierten RISC Algorithmus (Material und Methoden, S. 90 ff), zeigte auch eine signifikant stärkere Neuropeptid Markierung in den IL6-/- Mäusen bei P < 0,001 (Abb. 4, Mitte rechts, S. 20). Die CGRP-Markierung war unverändert. Hingegen konnte mit einer Größe von je 100-150µm³ kein signifikanter Unterschied zwischen der Größe der Galanin-positiven und der CGRP-positiven Wachstumskegel festgestellt werden.

2.1.6 Mikrogliale Reaktion

IL6-Defizienz führte zu einer Reihe von mikroglialen Veränderungen im verletzten Fazialiskern. Dies betraf die Morphologie, die Zellzahl und die immunhistochemische Quantität der phasenspezifischen Aktivierungsmarker. Diese Veränderungen waren besonders deutlich während der frühen Reaktion auf die Verletzung, 1-4 Tage nach Fazialisaxotomie.

Wie in der Einleitung beschrieben, erfolgt die Aktivierung von Mikroglia schrittweise in verschiedenen Phasen (Raivich et al., 1999a). Diese Schritte sind durch Aktivierungsmarker definiert, die sich in der entsprechenden Phase immunhistochemisch in unterschiedlichem Maß nachweisen lassen. Diese spezifischen Antigene lassen sich durch Doppelimmunfluoreszenzmarkierung mit gleichzeitiger Immunreaktivität für mikrogliale typische Marker wie αMβ2-Integrin, Maus IgG oder ionisierter Ca-bindendes Adaptor Protein Typ 1 (IBA 1) auf der Mikroglia kolokalisieren. Die Quantifizierung erfolgte nach dem RISC Algorithmus (Raivich et al., 1998a; Werner et al., 1998; Kloss et al., 1999; siehe auch in Material und Methoden, S. 88 ff).

Von allen Markern, die auf der ruhenden Mikroglia der kontralateralen, unoperierten Seite des Fazialiskerns immunhistochemisch nachgewiesen wurden, zeigte lediglich die

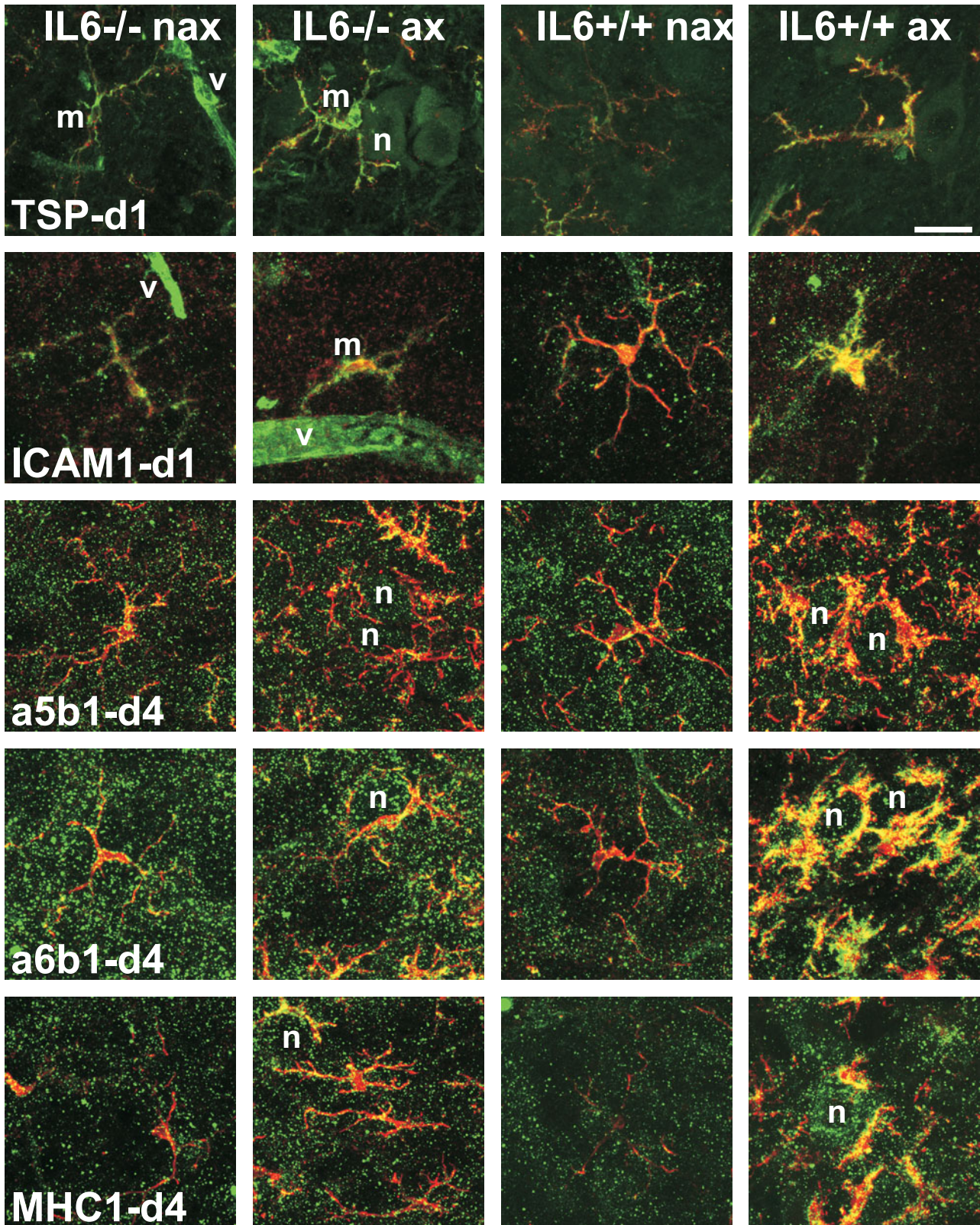


Abbildung 6. IL6-Defizienz beeinflusst das normale Muster früher mikroglialer Aktivierung im axotomierten Fazialiskern. Es zeigte sich ein Effekt auf Adhäsionsmoleküle und MHC1. Doppelimmunfluoreszenz für TSP, ICAM1, $\alpha 5\beta 1$ (a5b1) und $\alpha 6\beta 1$ (a6b1) Integrin, und MHC1 (grün), Kolokalisation mit $\alpha M\beta 2$ (TSP) oder IBA1 (ICAM1, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$, MHC1, rot) Tag 1 und 4 nach Fazialisaxotomie. In IL6+/+ Mäusen rief die Fazialisaxotomie eine stark erhöhte Immunreaktivität der oben genannten Marker hervor. IL6-Defizienz führte zu einer Verstärkung der Immunreaktivität für TSP auf ruhender Mikroglia (IL6-/- nax) und zu einer Verminderung von ICAM1, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$ und MHC1, Marker der aktivierten Mikroglia. Aktivierte IL6-/- Mikroglia (m) konnte sich an axotomisierte Neurone (n) anlegen. Jedoch kam es zu keinem Anschwellen des Zellkörpers und sie zeigten schlanke, fein verzweigte periphere Ausläufer. Bemerkenswert ist die Immunreaktivität von TSP, ICAM1 und $\alpha 6\beta 1$ auf benachbarten Blutgefäßen(v). Maßbalken: 25 μ m.

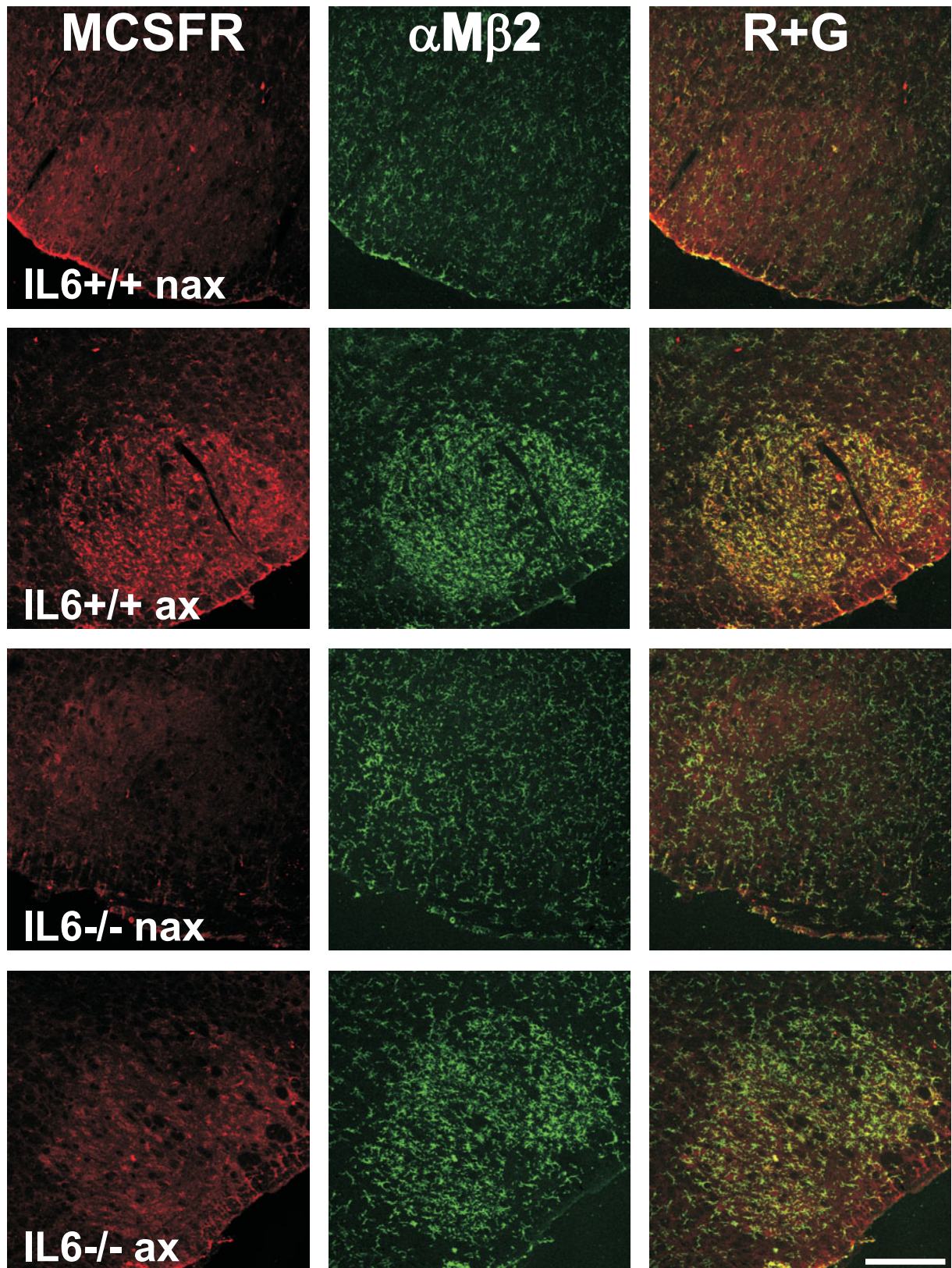


Abbildung 7. IL6-Defizienz beeinflusste die Induktion des Rezeptors für das mikrogliale Mitogen MCSF und die mikrogliale Proliferation. Die mikrogliale Antwort im Fazialiskern am Tag 3 nach Fazialisaxotomie (ax), Vergleich von IL6+/+ mit IL6-/- Mäusen und Vergleich der axotomierten (ax) mit der nichtaxotomierten (nax) Seite. Doppelimmunfluoreszenz für αMβ2 Integrin (grün), ein konstitutiv exprimierter Mikroglia marker, und MCSF Rezeptor (MCSFR, rot). Die Kolokalisation beider Marker wird gezeigt in gelb (R+G, rechte Spalte). IL6-/- Mäuse zeigten eine geringere Dichte von αMβ2 immunreaktiver Mikroglia im axotomierten Fazialiskern am Tag 3 und eine stark verminderte MCSFR Immunreaktivität. Maßbalken: 0,2mm.

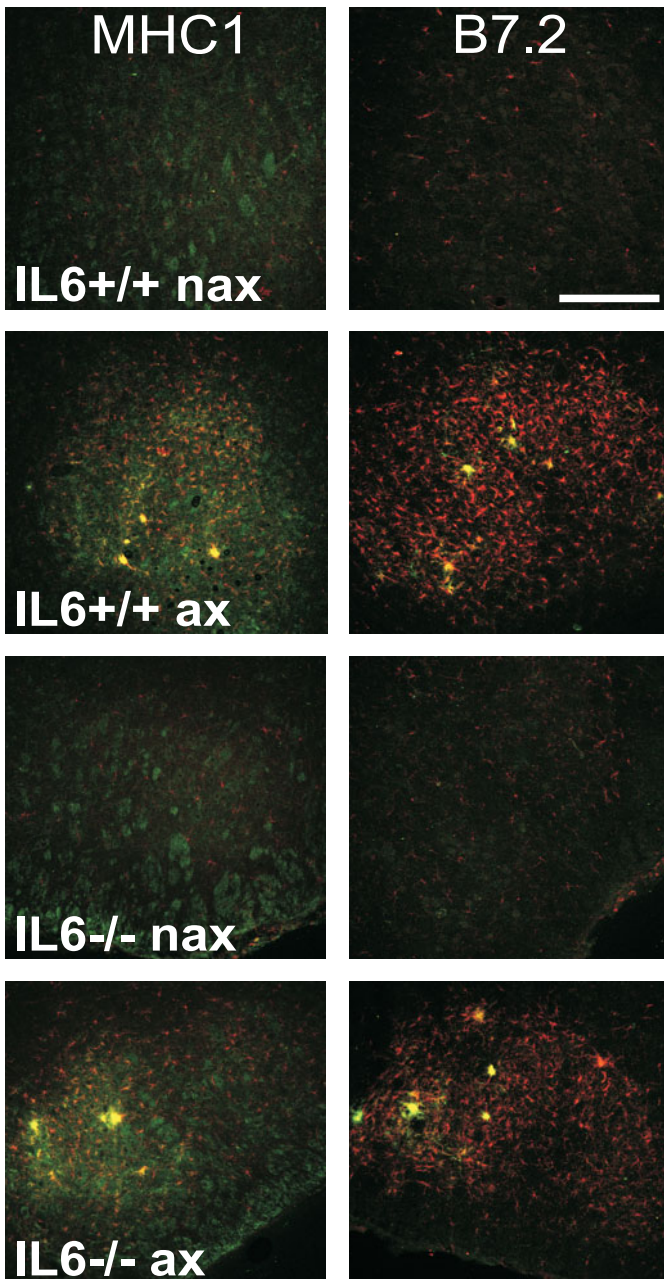


Abbildung 8.

IL6-Defizienz beeinflusst nicht die Immunreaktivität von MHC1 und B7.2 auf Mikrogliaknötchen im axotomierten Fazialiskern, 14 Tage nach Fazialisaxotomie (ax).

Doppelimmunfluoreszenz für MHC1 oder B7.2 (grün) und mikrogliale IBA1 Immunreaktivität (rot) zeigt eine starke gelbe Markierung auf den großen Zellstrukturen. Hier wurde die mikrogliale Farbintensität für MHC1 und B7.2 vermindert, um eine Übersteuerung der Fluoreszenz der sehr hellen immunreaktiven Mikrogliaknötchen zu vermeiden. Maßbalken: 0,25 mm.

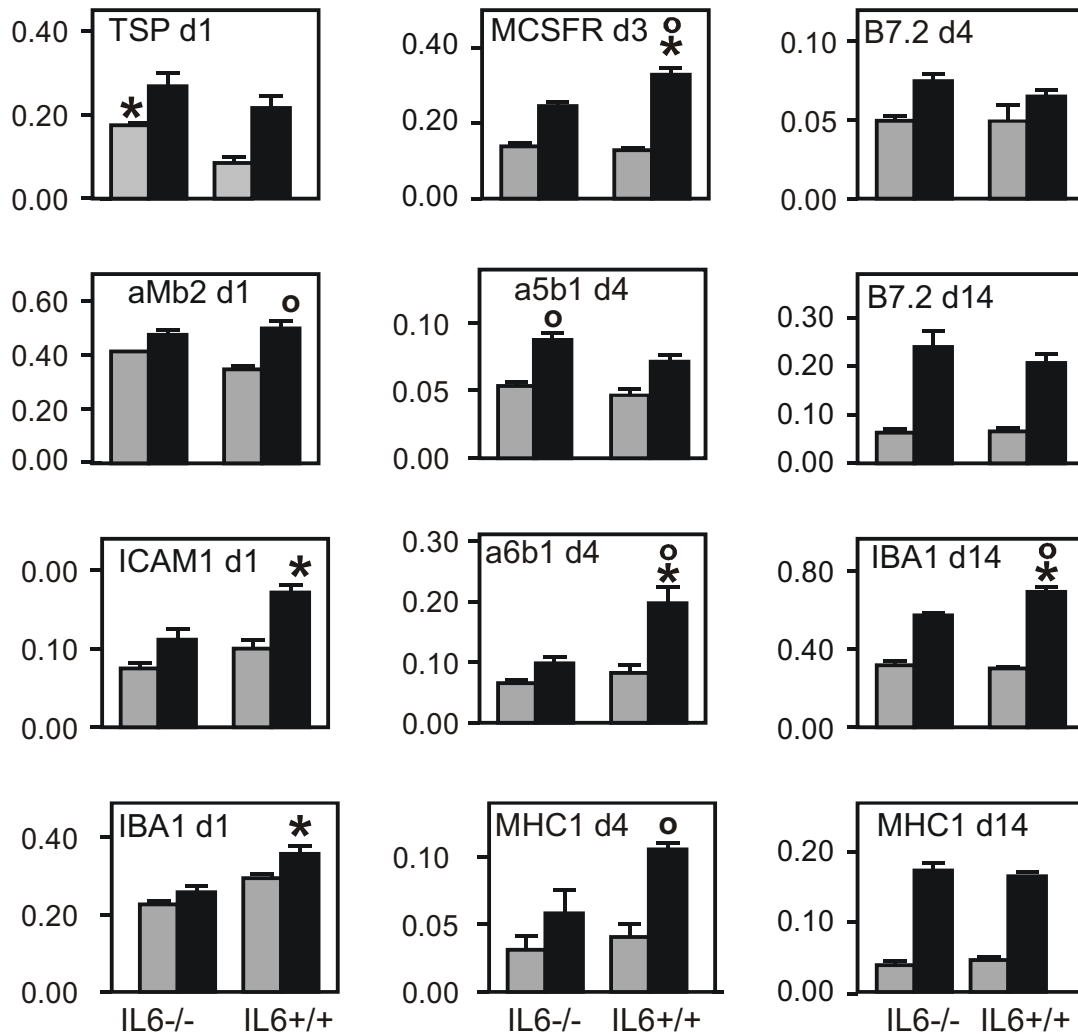


Abbildung 9. IL6-Defizienz (-/-) interferiert mit dem normalen Muster der Mikrogliaaktivierung. Gezeigt wird die quantitative Immunfluoreszenz für mikrogliale Aktivierungsmarker 1, 3, 4 und 14 Tage nach Fazialisaxotomie (d1-14). Immunreaktivität für α M β 2 und für polyklonale Antikörper (TSP, MCSFR) wurde in α M β 2 definierten Mikrogliaprofilen quantifiziert, für IBA1 und für andere monoklonale Antikörper (ICAM1, α 5 β 1, α 6 β 1, MHC1, B7.2) in IBA1 definierten Profilen, wobei der RISC Algorithmus (siehe Material und Methoden, S. 88ff) verwendet wurde. Schwarze Balken geben die axotomierte Seite wieder, die grauen Balken die kontralaterale nicht axotomierte Seite. Die Sterne zeigen eine statistisch signifikante Veränderung auf der gleichen Seite (axotomiert oder nicht axotomiert) für IL6^{+/+} gegenüber den Zytokin-defizienten Mäusen ($P < 0,05$ im Studenten t-Test, $n = 4 - 8$ Tiere je Gruppe). o: Eine statistisch signifikante Veränderung in der Differenz zwischen der axotomierten und der kontralateralen nicht axotomierten Seite zwischen IL6^{+/+} und IL6^{-/-} Gruppen. Beinahe alle Effekte der IL6-Defizienz auf die mikrogliale Aktivierung wurden während der frühen Zeitpunkte beobachtet (Tag 1 bis Tag 4). Mikrogliales IBA1 stellte die einzige Ausnahme dar, mit einer verminderten Immunreaktivität bei IL6^{-/-} zu allen untersuchten Zeitpunkten, am Tag 1 (linke Spalte), am Tag 14 (rechte Spalte) und Tag 4 (nicht gezeigt, siehe dazu Text). Beachte den starken Effekt von IL6 auf mikrogliales MHC1 am Tag 4 und seine Abwesenheit am Tag 14, dem Spätstadium der mikroglialen Aktivierung.

Immunreaktivität für Thrombospondin eine signifikante Veränderung mit einem 2-fachen Anstieg der Quantität in IL6^{-/-} Tieren verglichen mit den IL6^{+/+} Wildtypkontrollen (Abb. 9, oberste Reihe, S. 26; Abb. 6, oben links, S. 23) ($P < 0,001$, unpaariger Student-t Test). Keiner der anderen Marker (IBA1, ICAM1, MCSFR, α 5 β 6, α 6 β 1, MHC1 und B7.2) war

statistisch signifikant verändert, obwohl eine leicht verstärkte Immunreaktivität des mikroglialen α M β 2 Antigens in der IL6^{-/-} Gruppe nachzuweisen war ($P = 0,087$).

Die frühe mikrogliale Aktivierung ist normalerweise charakterisiert durch die Induktion von TSP, α M β 2 Integrin, ICAM1 und IBA1 innerhalb der ersten 24h nach der Verletzung (Abb. 6, erste und zweite Reihe, S. 23; Abb. 9, linke Spalte, S. 26). Zwei dieser Marker, ICAM1 und IBA1, zeigten ein signifikant niedrigeres Niveau auf den mikroglialen Zellprofilen im axotomierten Fazialiskern der IL6^{-/-} Tiere am Tag 1 nach Fazialisaxotomie ($P < 0,001$). Der Zuwachs von mikroglialer α M β 2 Aktivität (im Vergleich die operierte zur unoperierten Seite) war signifikant niedriger in den IL6-defizienten Tieren ($P < 0,002$). Dieses Phänomen könnte auch durch ein höheres Immunreaktivitätsniveau auf der kontralateralen Seite in der IL6^{-/-} Gruppe erklärt werden. Die mikrogliale TSP-Immunreaktivität auf der operierten Seite zeigte auch eine Tendenz zu höherer Aktivierung in den IL6^{-/-} Tieren, jedoch ohne statistische Signifikanz ($P = 0,24$).

Nach der anfänglichen Aktivierung beginnt, wie in der Einleitung detaillierter ausgeführt, die stimulierte Mikroglia rasch zu proliferieren. Sie lagert sich an die verletzten Neurone an, schwillt mit ihrem Zellkörper an und expremiert in hohem Maße Adhäsionsmoleküle α 5 β 1 und α 6 β 1-Integrin (Abb. 6, dritte und vierte Reihe, S. 23), MCSFR (Abb. 7, S. 24), das am Tag 3 – 4 nach Axotomie den Gipfel seiner immunhistochemischen Nachweisbarkeit hat (Raivich et al., 1998a, b; Kloss et al., 1999). Die Annäherung und die Adhäsion an Neurone wird auch begleitet von einer langsam gesteigerten mikroglialen Immunreaktivität für MHC1 (Abb. 6, fünfte Reihe, S. 23) und dessen kostimulierenden Faktor B7.2 (Bohatschek et al., 1999). Die meisten dieser mikroglialen Marker zeigten eine weit geringere immunhistochemische Nachweisbarkeit in den IL6^{-/-} Tieren verglichen zu den IL6^{+/+} Tieren der Kontrollgruppe.

Wie in Abb. 9 (S. 26) gezeigt werden konnte, war die Immunreaktivität zu 48% vermindert bei MCSFR ($P < 0,0001$), zu 55% bei α 5 β 1-Integrin ($P < 0,001$), zu 73% bei α 6 β 1-Intgerin ($P < 0,025$) und zu 61% bei MHC1 ($P < 0,002$).

Diese unterschiedliche Induzierung von Aktivierungsmarkern wurde von Veränderungen in der Zellzahl und der Morphologie begleitet. Die α M β 2 Markierung, siehe Abb. 7 (S. 24), zeigte eine reduzierte Dichte der Mikroglia im Fazialiskern 3 Tage nach Axotomie des Fazialisnerven in den IL6^{-/-} Mäusen. Diese war um das 1,5 fache reduziert, was mit Daten der früher beschriebenen ungleichen Mikroglia proliferation in den IL6-defizienten Mäusen übereinstimmt (Klein et al., 1997a). Auf der morphologischen Ebene zeigte die Mikroglia von IL6^{+/+} Tieren eine verminderte periphere Verästelung und ein starkes Anschwellen der Zellkörper, als sie sich an die axotomierten Motoneuronen 4 Tage nach Verletzung anlagerten (Abb. 6, dritte bis fünfte Reihe, 3. Spalte, S. 23). Die aktivierten Mikrogliazellen legten sich in IL6^{-/-} Mäusen zwar auch an die axotomierten Neurone an, beginnend am

Tabellarische Zusammenfassung: Auswirkungen der Interleukin 6-Defizienz

Zelltyp	Zeitpunkt	Veränderung
Axotomierte Motoneurone - axonale Regeneration - zentrales Neuritenauswachsen - Galanin Immunreaktivität - neuronales Überleben	Tag 4 Tag 14 Tag 14 Tag 30	mäßig vermindert stark gesteigert gesteigert unverändert
Lymphozyteneinwanderung (in den Fazialiskern)	Tag 1 Tag 4 Tag 14	sehr stark vermindert stark vermindert vermindert
Mikrogliale Reaktion - frühe Phase (state of alert) (ICAM1, α M β 2, IBA1) - mittlere Phase (homing) (a5b1, a6b1, MCSFR, MHC1) - späte Phase (Phagozytose) (MHC1, B7-2)	Tag 1 Tag 4 Tag 14	stark vermindert stark vermindert unverändert
Einwanderung in den Fazialisnerv - Granulozyten - Makrophagen	Tag 4 Tag 4	unverändert unverändert

ersten Tag nach Fazialisaxotomie (Abb. 6, oben, S. 23). Sie zeigten aber kein Anschwellen der Zellkörper und präsentierten sich mit langen, schmalen und verzweigten Fortsätzen (Abb. 6, dritte und fünfte Reihe, zweite Spalte, S. 23).

Der verzögerte neuronale Zelltod mit seinem Maximum am Tag 14 nach Verletzung (Möller et al., 1996) führt zu einer weiteren Veränderung der benachbarten Mikroglia. Sie wandeln sich in phagozytotische Zellen um, die mikrogliale Knötchen bilden und eine sehr starke Immunreaktivität für MHC1 und B7.2 haben (Bohatschek et al., 2004a, b; Raivich et al.; 1998a, b). Wie gezeigt werden konnte in Abb. 8 (S.25), war das Vorkommen dieser Marker bei IL6^{-/-} Tieren nicht beeinträchtigt. Zusätzlich zu diesen zellulären Veränderungen in mikrogliale Knötchen ist die Phagozytose der Neurone von einem zweiten Schub der Aktivierung benachbarter, nicht phagozytotischer Mikroglia begleitet. Dabei zeigte diese eine geringere Immunreaktivität für MHC1 und B7.2 und eine starke Immunreaktivität für IBA1 (Bohatschek et al., 2004a, b; Raivich et al., 1999a, b). Mit ungefähr 130 Zellen in IL6^{-/-} und 200 Zellen in IL6^{+/+} Tieren je 20 μ m messendem Gewebsschnitt am Tag 7 – 14 (Klein et al., 1997a) sind diese parenchymalen Zellen zahlreicher als die Mikrogliaknötchen (2 – 3 pro Schnitt) und stellen daher den Hauptanteil der gesamten mikroglialen Immunreaktivität dar. Anders als die Aktivierung in der mittleren Phase am Tag 4 war die Induktion des mikroglialen MHC1 Markers in der gesamten mikroglialen Population des axotomierten Fazialiskerns 14 Tage nach Verletzung von der IL6-Defizienz nicht beeinflusst. Das gleiche galt für B7.2 (Abb. 9, rechte Spalte, S. 26).

Allerdings führte die Defizienz von IL6 zu einer signifikanten Verminderung der posttraumatischen Immunreaktivität von IBA1 am Tag 14 (Abb. 9, rechts, dritte Reihe, S. 26), ebenso wie am Tag 1 (Abb. 9, unten links, S. 26) und am Tag 4 (-28%, $P < 0,005$).

2.2 Galanin, CGRP, eNOS und nNOS

2.2.1 Zeitverlauf für Galanin, CGRP und die NADPH-Diaphorase

Neben Interleukin 6 wurden die beiden Neuropeptide Galanin und CGRP und die das Akutphasemolekül Stickoxid (NO) bereitstellenden Enzyme endotheliale und neuronale Stickoxidsynthetase (eNOS und nNOS) hinsichtlich ihrer Rolle beim posttraumatischen Regenerationsprozess im Fazialiskern nach Fazialisaxotomie und bei der Regeneration des Fazialisnerven untersucht.

Die Experimente erfolgten, wie schon bei den Versuchen für IL6, an homozygot defizienten Mäusen im Vergleich zu deren Wildtyp-Kontrollgruppe. Abbildung 10 A und B (S. 30) zeigt im Vergleich von homozygot defizienten Tiere mit der Wildtyp Vergleichsgruppe den immunhistochemischen Nachweis für die Defizienz von CGRP am Tag 3 (Abb. 10 A, S. 30) und für Galanin am Tag 14 (Abb. 10 B, S. 30), jeweils die Zeitpunkte des stärksten immunhistochemischen Nachweises.

Galanin zeigte im Zeitverlauf in der Galanin-spezifischen Motoneuronenpopulation (Moore et al, 1989) einen kontinuierlichen Anstieg des immunhistochemischen Nachweises mit einem Gipfel am Tag 14 und einen anschließenden kontinuierlichen Abfall bis zum Tag 42 (Abb. 11 A und B, S. 31).

CGRP zeigte im Zeitverlauf in der CGRP-spezifischen Motoneuronenpopulation (Moore et al., 1989) einen raschen Anstieg mit einem ersten Gipfel um den Tag 3 und einem anschließenden erneuten Abfall mit einem zweiten, kleineren Gipfel des immunhistochemischen Nachweises am Tag 21, dem Zeitpunkt der erfolgreichen Reinnervation (Abb. 12 A und B, S. 32).

Im Fall des zeitlichen Aktivitätsmusters von eNOS und nNOS (Abb. 13 A und B, S. 33) erfolgte der Nachweis indirekt durch die bei beiden Enzymen coenzymatisch mitbeteiligte NADPH-Diaphorase mit Immunhistochemie mit Tetrazolium (siehe Material und Methoden, S. 84). Beim Nachweis der NADPH-Diaphorase zeigte sich immunhistochemisch ein rascher Anstieg mit einem Gipfel am Tag 3 und ein anschließender langsamer Abfall bis zum Tag 42, was der bekannten Funktion von NO als rasch bereitgestelltes Akutphasemolekül entspricht.

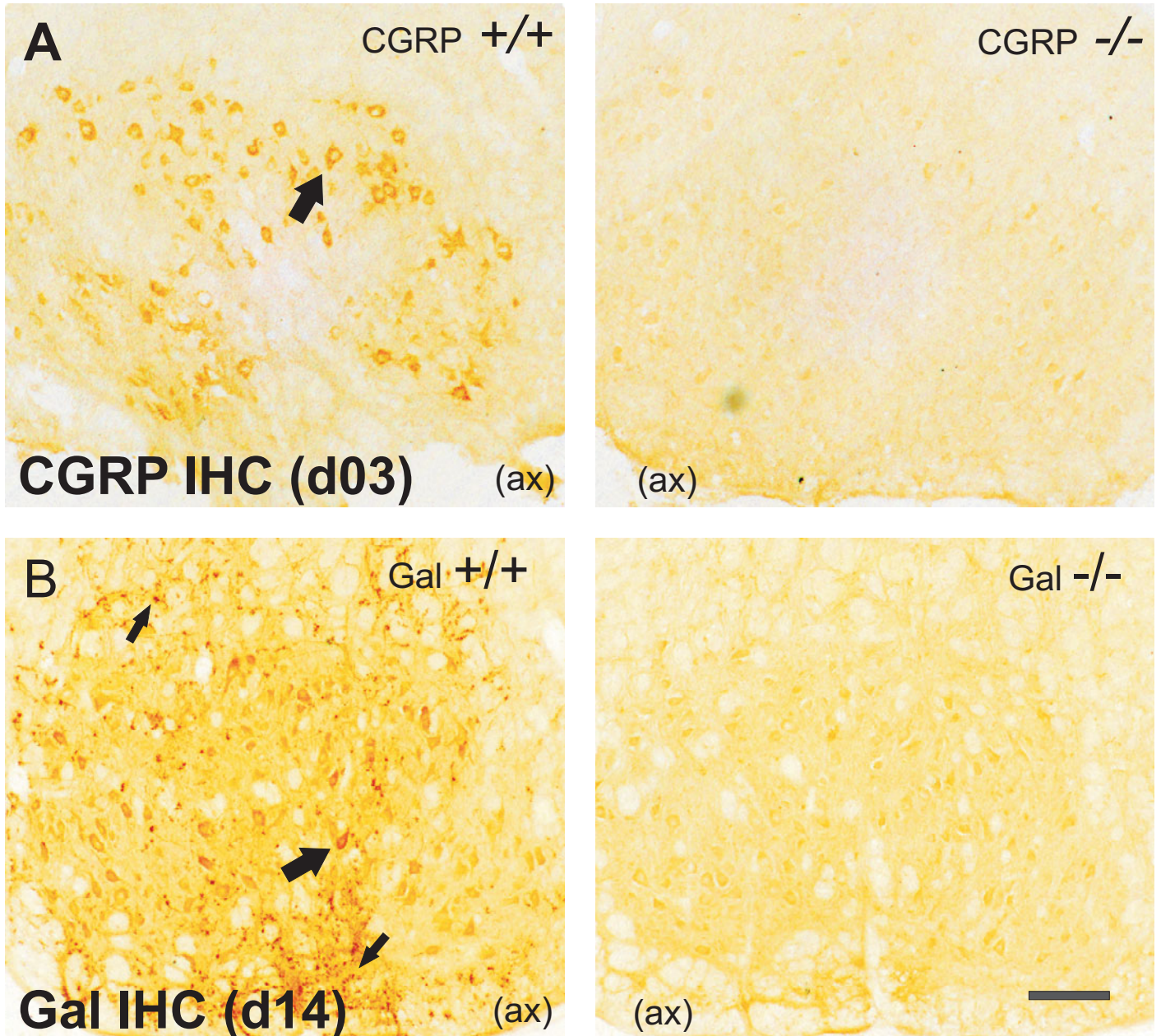


Abbildung 10 (A). CGRP Immunhistochemie nach Fazialisaxotomie am Tag 3. Vergleich von CGRP+/+ mit CGRP-/- Mäusen, jeweils die axotomierte Seite (ax). CGRP-/- Mäuse zeigten keine spezifische immunhistochemische Färbung, CGRP+/+ hingegen schon. Man beachte die deutliche immunhistochemische Anfärbung der neuronalen Zellkörper (große Pfeile). **(B)** Galanin Immunhistochemie nach Fazialisaxotomie am Tag 14. Vergleich von Galanin+/+ mit Galanin -/- Mäusen, jeweils die axotomierte Seite (ax). Gal-/- Mäuse zeigten keine spezifische immunhistochemische Färbung, Galanin+/+ hingegen schon mit spezifischer Färbung der neuronalen Zellkörper (große Pfeile) und der aussprossenden Axone mit ihren Wachstumskegeln (siehe kleine Pfeile). Maßbalken: 0,13mm

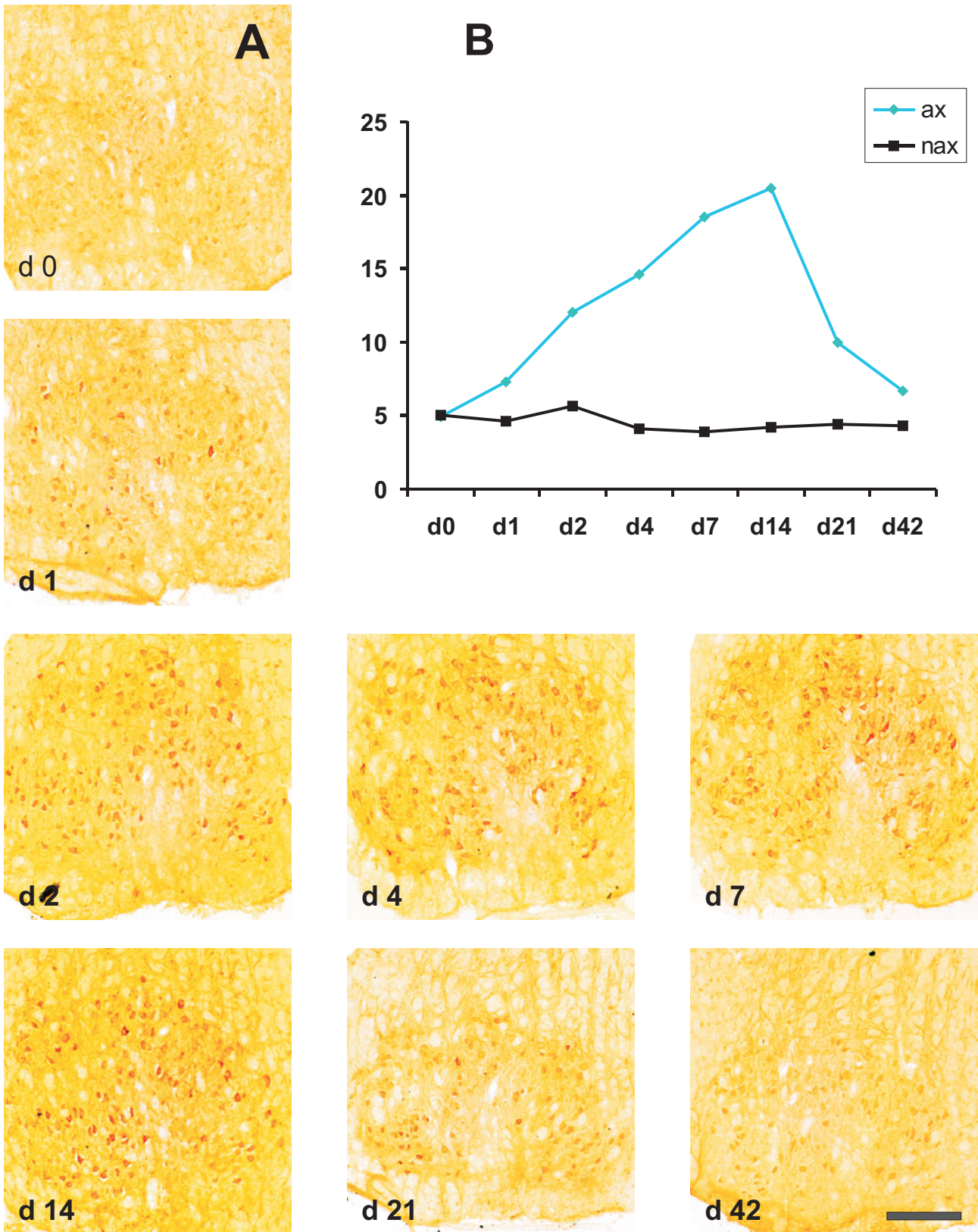


Abbildung 11. Immunhistochemie mit Galanin im Fazialiskern im Zeitverlauf nach Fazialisaxotomie morphologisch (**A**) und quantitativ (**B**). Nach Fazialisaxotomie (ax) kommt es im Verhältnis zur nichtaxotomierten Seite (nax) (siehe Graph **B**) zu einem deutlich vermehrten immunhistochemischen Nachweis von Galanin im axotomierten Fazialiskern (ax) mit Gipfel am Tag 14 und anschließendem kontinuierlichen Abfall (**A/B**). Graphische Darstellung (**B**) der immunhistochemischen Quantifizierung des Zeitverlaufs der Galanin Immunhistochemie im axotomierten Fazialiskern (ax) im Vergleich zum nichtaxotomierten Fazialiskern (nax), n = 5 je Zeitpunkt. Maßbalken: 0,2mm.

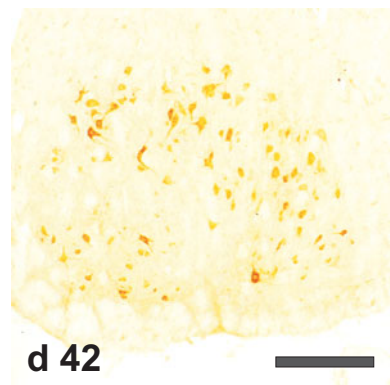
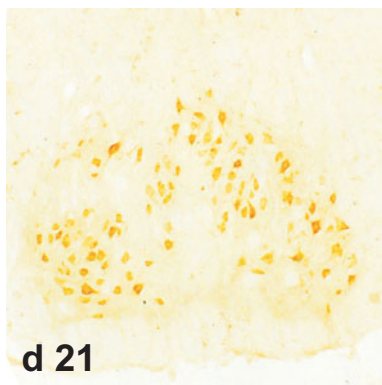
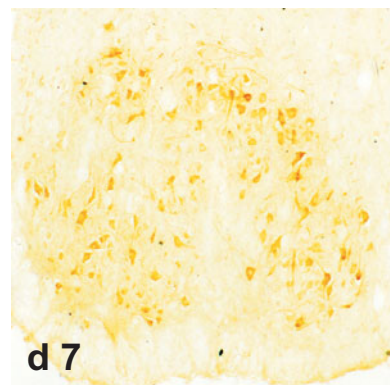
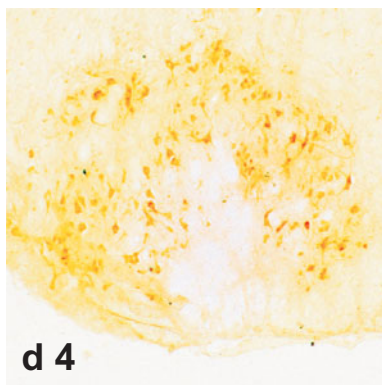
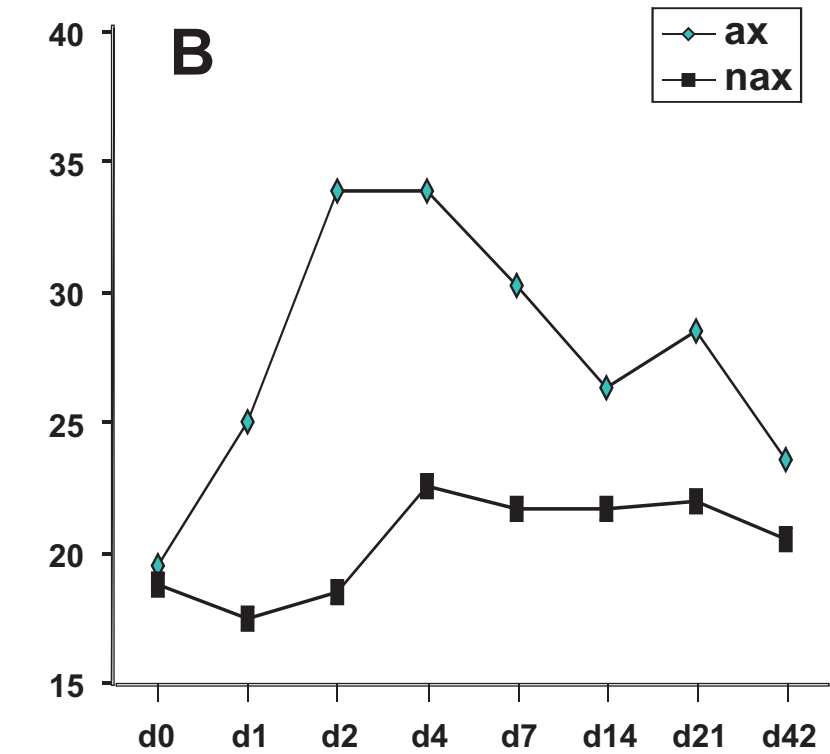
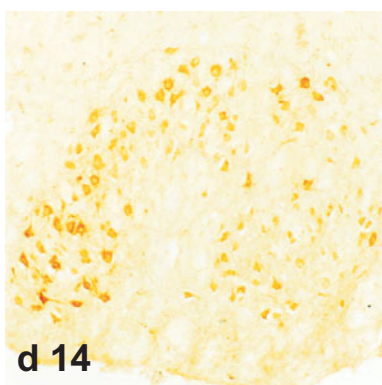
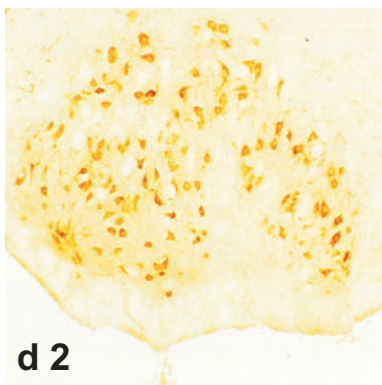
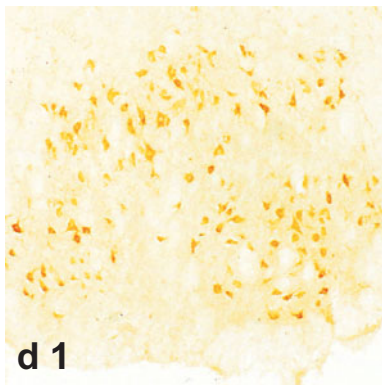
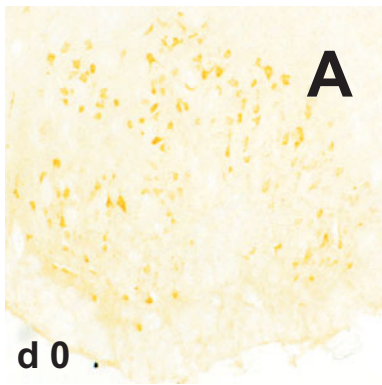


Abbildung 12. Immunhistochemie für CGRP im Zeitverlauf nach Fazialisaxotomie morphologisch (A) und quantitativ (B). Nach Fazialisaxotomie kommt es auf der operierten Seite (ax), verglichen mit der nicht axotomierten Seite (nax), zu einem deutlichen Anstieg von CGRP mit Gipfel am Tag 2 bis 4, mit einem anschließenden Abfall und einer erneuten Zunahme um den Tag 21 (dem Zeitpunkt der erfolgreichen Reinnervation der motorischen Endplatte), mit einem anschließenden Abfall am Tag 42. A: Immunhistochemie für CGRP im Zeitverlauf, hier die axotomierte Seite dargestellt. B: Vergleich der immunhistochemischen Quantifizierung der CGRP Immunreaktivität im axotomierten Fazialiskern (ax) und im nicht axotomierten Fazialiskern (nax) im Zeitverlauf, n = 5 je Zeitpunkt. Maßbalken: 0,2mm.

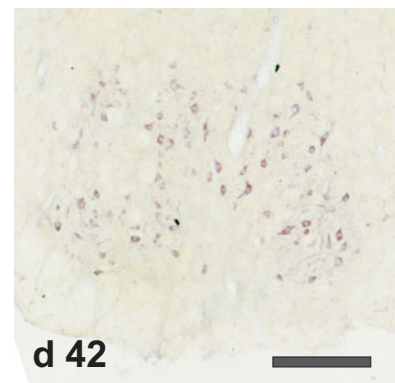
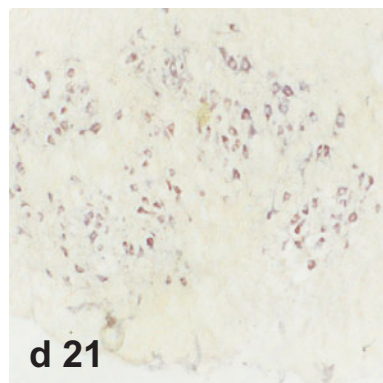
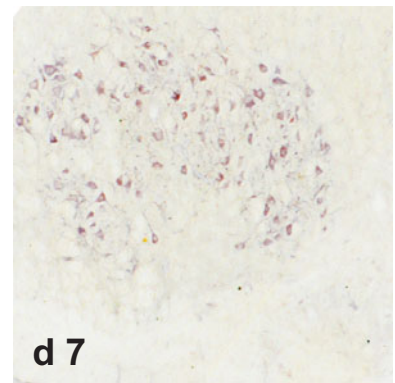
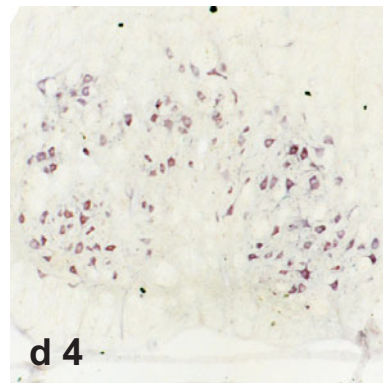
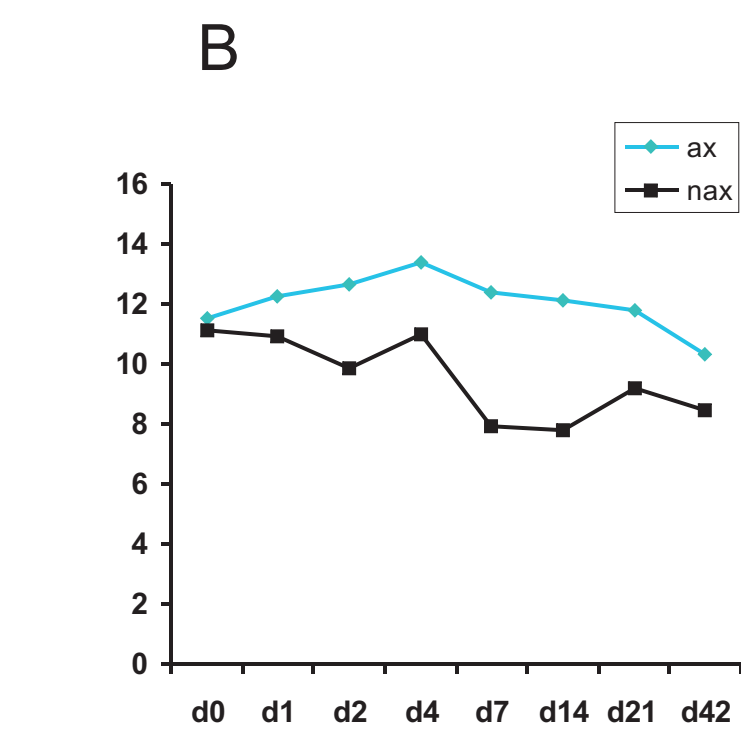
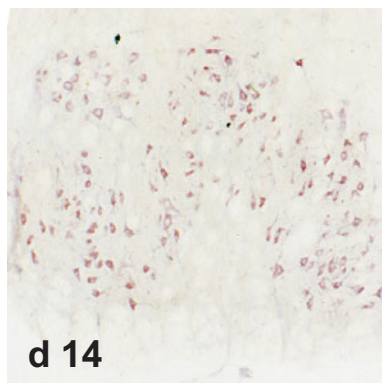
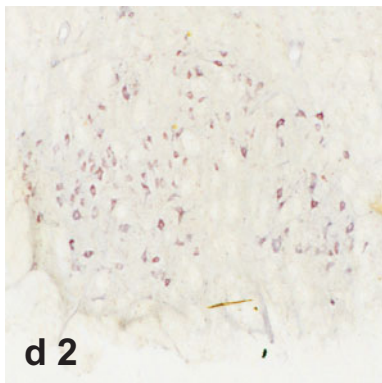
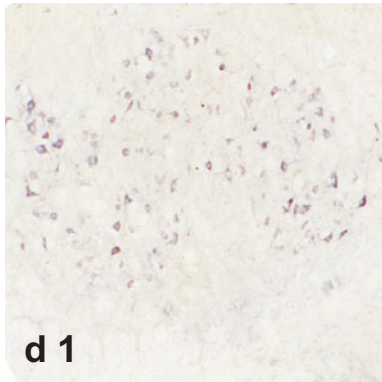
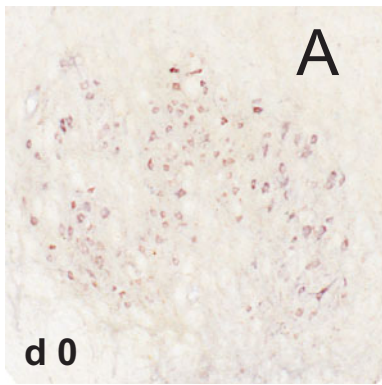


Abbildung 13. Immunhistochemie der nadph-Diaphorase mit Tetrazolium im Fazialiskern im Zeitverlauf nach Fazialisaxotomie morphologisch (A) und quantitativ (B). Nach Fazialisaxotomie kommt es im Verhältnis zur nichtaxotomierten Seite (nax) (siehe Graf B) zu einem mäßigen, immunhistochemischen Nachweis der nadph-Diaphorase im axotomierten Fazialiskern (ax) mit Gipfel am Tag 4 und einem anschließenden kontinuierlichen Abfall bis zum Tag 42 (siehe A/B) n = 5 zu jedem Zeitpunkt des Zeitverlaufs. Maßbalken: 0,2 mm.

2.2.2 Galanin-Defizienz und die zelluläre Antwort auf die Verletzung des Fazialisnervs

2.2.2.1 Axonale Regeneration des gequetschten Fazialisnervs

Die auswachsenden Neuriten der CGRP-positiven Neuronenpopulation der Galanin-Wildtypen zeigten eine maximale Regenerationsstrecke von 5,83mm +/-0,27 gegenüber jener der Galanin-defizienten Tiere von 5,64mm +/-0,19 ($P > 0,5$, Student-t-Test, Mittelwert +/- Standardabweichung SEM) (Abb. 14, oben links, S. 35). Damit wiesen die Galanin-defizienten Tiere eine unsignifikante, mit 5% leicht verminderte Wachstumsstrecke auf.

2.2.2.2 Makrophagen- und Granulozyteneinwanderung in den gequetschten Fazialisnerven

Der Nachweis der Makrophagen erfolgte durch Immunhistochemie für α M β 2 und jener der neutrophilen Granulozyten durch Immunhistochemie für die endogene Peroxidase der Granulozyten.

Homozygot Galanin-defiziente Tiere wiesen gegenüber der Wildtyp Vergleichsgruppe an der Verletzungsstelle eine 20%, 2mm distal eine 25% und 4mm distal eine 50% vermehrte Einwanderung von Granulozyten auf, die jedoch jeweils unsignifikant war ($P > 0,1$ an allen Lokalisationen, Student-t-Test, Mittelwert +/- Standardabweichung SEM) (Abb. 14, oben Mitte, S. 35).

Homozygot Galanin-defiziente Tiere zeigten im Vergleich zu der Wildtyp Gruppe an der Verletzungsstelle eine unwesentlich vermehrte Anzahl eingewanderter Makrophagen von 2%, 2mm und 4mm distal der Verletzungsstelle jedoch eine leicht verminderte Anzahl von 9% und 3%, die jeweils nicht signifikant war ($P > 0,5$ Verletzungsstelle, $P > 0,05$ 2mm distal, $P > 0,5$ 4mm distal, Student-t-Test, Mittelwert +/- Standardabweichung SEM) (Anzahl der Makrophagen pro Gesichtsfeld in einer Vergrößerung von x20 und die Anzahl pro Messgitterquadrat von 0,39mm²) (Abb. 14, oben rechts, S. 35).

Damit ergab die Galanin-Defizienz eine deutlich vermehrte Granulozyteneinwanderung, das Ergebnis war jedoch nicht signifikant. Die Zahl eingewanderter Makrophagen zeigte sich im Vergleich von Gal+/+ und Gal-/- kaum unterschiedlich.

2.2.2.3 Lymphozyteneinwanderung in den Fazialiskern

Homozygot Galanin-defiziente Tiere hatten auf der axotomierten Seite am Tag 3 im Durchschnitt 4 +/-0,66 gegenüber den Wildtyp Tieren 2,6 +/-0,46 und am Tag 14 im Durchschnitt 24,1 +/-7,86 gegenüber 24,8 +/-4,95 eingewanderte T-Lymphozyten pro Gewebsschnitt. Damit ergab sich am Tag 3 eine 1,5fach erhöhte Einwanderungszahl, die jedoch nicht signifikant war ($P > 0,1$, Student-t-Test). Am Tag 14 war ein vernachlässigbar geringer Unterschied in der Lymphozytenzahl zu zählen (Abb. 14, unten, S. 35).

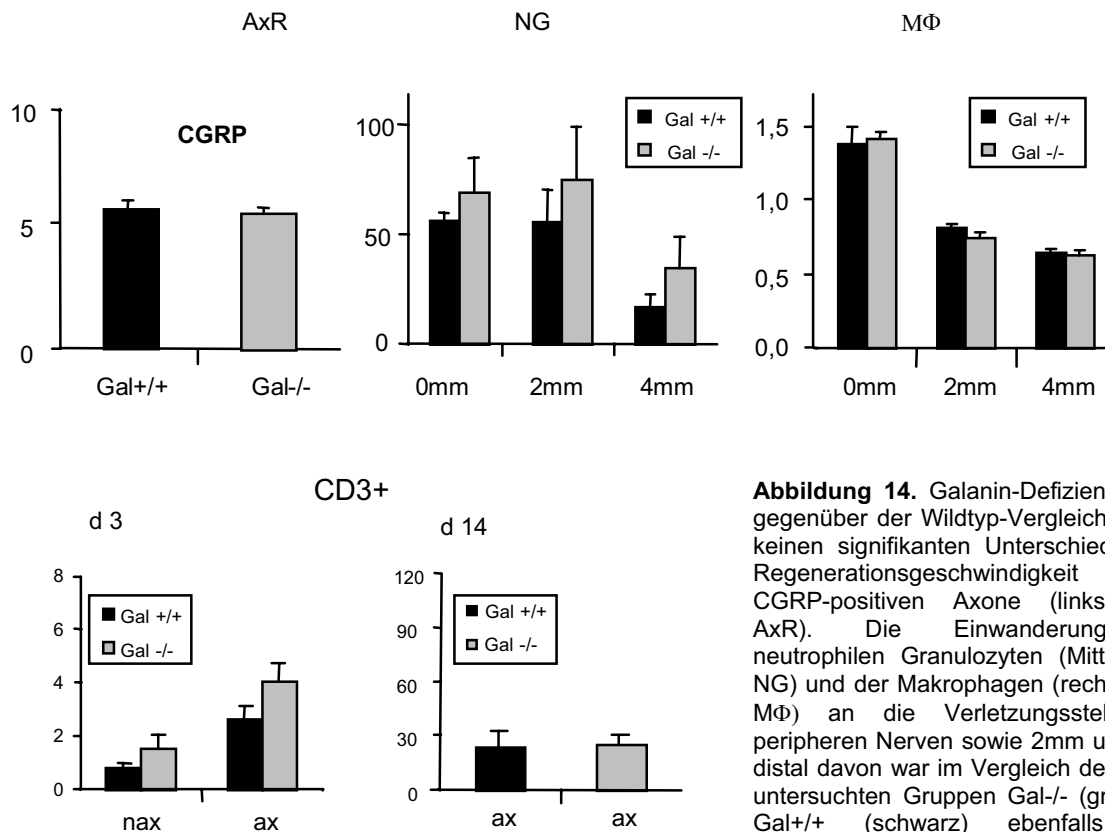


Abbildung 14. Galanin-Defizienz zeigte gegenüber der Wildtyp-Vergleichsgruppe keinen signifikanten Unterschied in der Regenerationsgeschwindigkeit der CGRP-positiven Axone (links oben, AxR). Die Einwanderung der neutrophilen Granulozyten (Mitte oben, NG) und der Makrophagen (rechts oben, MΦ) an die Verletzungsstelle des peripheren Nerven sowie 2mm und 4mm distal davon war im Vergleich der beiden untersuchten Gruppen Gal^{-/-} (grau) und Gal^{+/+} (schwarz) ebenfalls nicht signifikant verändert. Jeweils Tag 4 nach Nervcrush.

Die beiden Grafen unten zeigen die nicht signifikant veränderte Einwanderung von CD3+ Lymphozyten am Tag 3 (d3) und Tag 14 (d14). Galanin-Defizienz zeigte am Tag 3 eine 1-fach vermehrte Einwanderung in die nichtoperierte Seite (nax) und eine 1,5-fach vermehrte in die operierte Seite (ax), wobei beide Ergebnisse nicht signifikant waren. (Student-t-Test, Mittelwert der Regenerationsstrecke bzw. der Anzahl der eingewanderten Zellen, +/- Standardabweichung des Mittelwerts, SEM).

2.2.2.4 Neuronale Reaktion

Der Nachweis von CGRP bzw. der von Galanin in Galanin- bzw. CGRP-defizienten Tieren erfasst jeweils diejenige Neuronenpopulation, in der sich das defiziente Neuropeptid nicht nachweisen lässt, da Galanin bzw. CGRP in jeweils unterschiedlichen Neuronenpopulationen im Fazialiskern immunhistochemisch zum Nachweis kommen (Moore et al., 1989).

Je 1 Gewebsschnitt von 20µm Dicke wurde an den unterschiedlichen Zeitpunkten am Tag 2, Tag 3, Tag 7 und Tag 14 untersucht. An den ersten drei Zeitpunkten innerhalb der homozygot defizienten Gruppe und der Wildtyp Vergleichsgruppe wurden je n = 3-4 Tiere untersucht, am Tag 14 n = 6-7.

Homozygot Galanin-defiziente Tiere zeigten im Vergleich zu den Wildtyp Tieren im axotomierten Fazialiskern in der Quantifizierung von CGRP einen verminderten immunhistochemischen Nachweis am Tag 2 (19%) und am Tag 7 (17%) und einen vermehrten immunhistochemischen Nachweis von CGRP am Tag 3 (16%) und am Tag 14

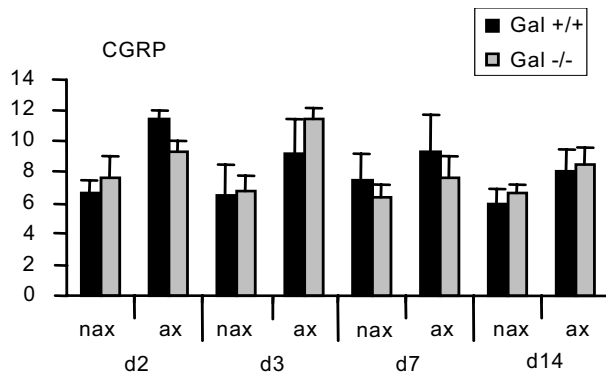


Abbildung 15. Grafische Darstellung der neuronalen Reaktion der Gruppen Gal+/+ (schwarz) und Gal-/- (grau) im Vergleich anhand des Neuropeptids CGRP. Die beiden untersuchten Gruppen zeigten zu den verschiedenen Zeitpunkten keinen signifikanten Unterschied, weder auf der axotomierten Seite (ax) noch auf der nicht axotomierten Seite (nax) (Student-t-Test, Mittelwert immunhistochemische Färbung, +/- Standardabweichung des Mittelwertes SEM).

(5%). Die immunhistochemische Quantifizierung war zu keinem Zeitpunkt signifikant (Tag 2 $P > 0,05$, Tag 3 $P > 0,1$, Tag 7 $P > 0,5$, Tag 14 $P > 0,5$, Student-t-Test, Standardabweichung +/- Mittelwert, SEM) (Abb. 15, S. 36).

2.2.2.5 Neuronales Überleben

Nach Fazialisaxotomie gehen etwa 30% der geschädigten Neurone zu Grunde. Es wurden Galanin-defiziente Tiere mit ihrer Wildtyp-Vergleichsgruppe auf die Anzahl der Neurone am Tag 30 nach Axotomie untersucht. Untersucht wurden je 10 Tiere pro Gruppe, ca. 34 Schnitte a 20µm Dicke pro Fazialiskern, Färbung nach Nissl, Auszählung der Neurone pro Schnitt und Korrekturberechnung nach Abercrombie (siehe Material und Methoden, S. 92 f). Die Überlebensrate der Neurone 30 Tage nach Fazialisaxotomie im Vergleich von Wildtyp Tieren gegenüber Galanin-defizienten Tieren war nicht signifikant verändert. So war die Überlebensrate mit 72% in der Wildtypgruppe im Vergleich zur unoperierten Seite und mit 74% Überlebensrate in der Galanin-defizienten Gruppe im Vergleich zur unoperierten Seite mit $P > 0,05$ ohne signifikanten Unterschied. Mit den genannten Überlebensraten entsprechen die hier gewonnenen Daten den vorbeschriebenen Raten neuronalen Überlebens nach Axotomie (Sendtner et al, 1997).

2.2.2.6 Zentrale Wachstumskegel

Nach Axotomie des Fazialisnervs kommt es mit einer zeitlichen Verzögerung von ca. 2 Tagen zu einem Wiederaussprossen von Axonen, ausgehend von den Motoneuronen des Fazialiskerns. Bei der Quantifizierung der Wachstumskegel im Zeitverlauf zeigte sich eine mäßige Regeneration beginnend am Tag 4 mit einem sehr deutlichen Regenerationsschub ab dem Tag 7 und einem Gipfel am Tag 14. Die Wachstumskegel waren im Fazialiskern und v.a. perinukleär in der weißen Substanz nachzuweisen. Nach erfolgter Regeneration und

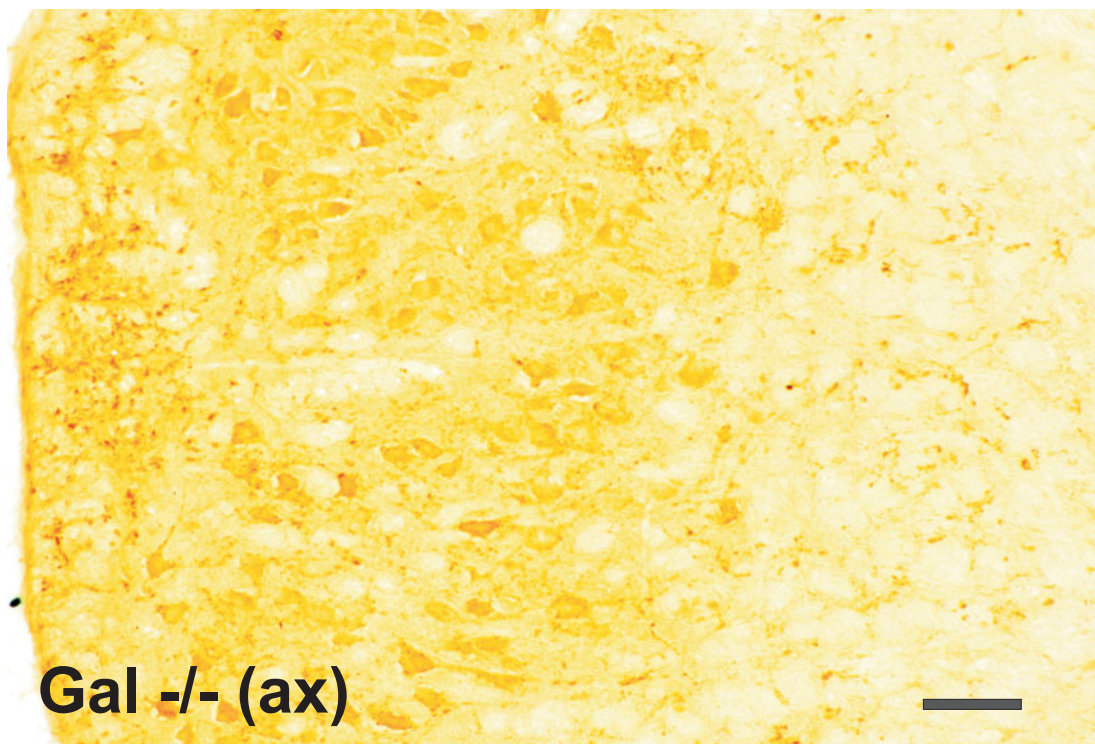
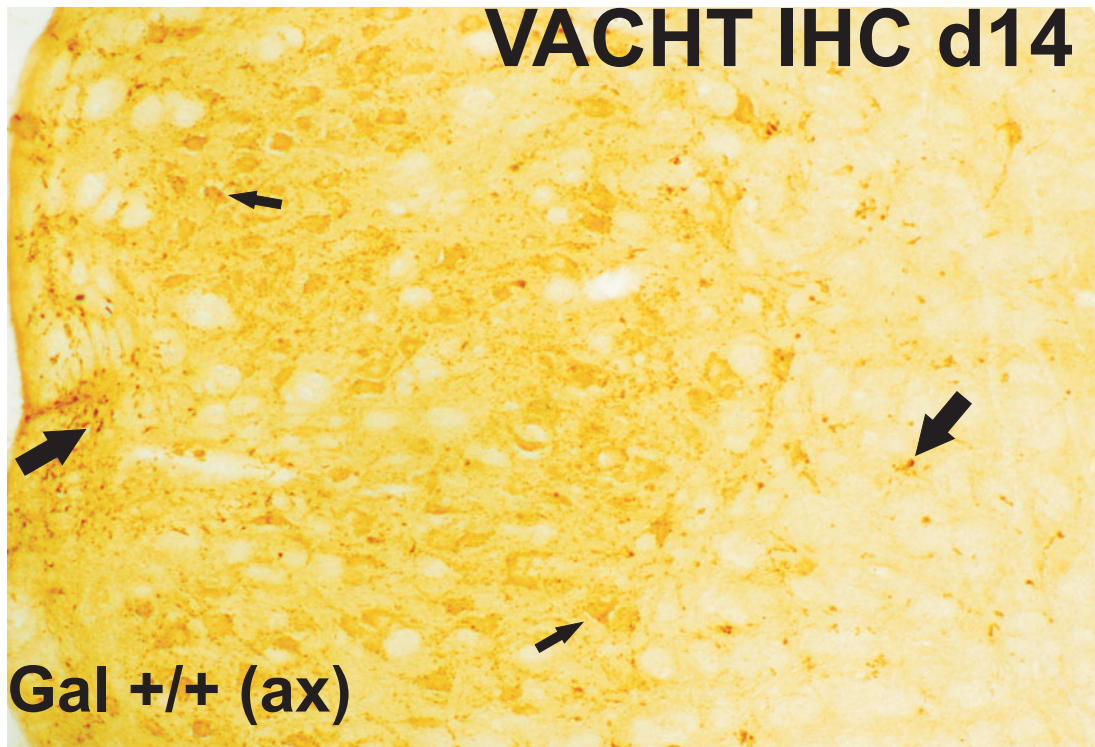


Abbildung 16. VACHT Immunhistochemie im Fazialiskern. Vergleich der zentralen Axonaussprossung der Motoneurone in Gal^{+/+} Mäusen zu denen in Gal^{-/-} Mäusen 14 Tage nach Fazialisaxotomie (ax). Beachte die deutliche Färbung von Neuronen (kleine Pfeile) und aussprossenden Axonen mit ihren Wachstumskegeln (große Pfeile), diese vor allem perinukleär in der weißen Substanz, hier vor allem ventral des Fazialiskerns. Morphologisch und quantitativ läßt sich im Hinblick auf die aussprossenden Wachstumskegel kein Unterschied bei Gal^{+/+} gegenüber Gal^{-/-} Mäusen erkennen. Maßbalken: 0,1mm

Reinnervation der muskulären Endplatte bzw. nach dem neuronalen Zelltod, mit einem Gipfel ebenfalls am Tag 14, fiel die Zahl der nachweisbaren Wachstumskegel ab (Abb. 1, S. 5).

Die Wachstumskegel sind hier, im Fall der Galanin-Defizienz, gegen VACHT (vesikulärer Acetylcholintransporter) gefärbt. Galanin-Defizienz zeigte keinen nachweisbaren Unterschied im Vergleich der homozygot defizienten Tiere gegenüber den Wildtypen in der morphologisch-quantitativen Beurteilung der VACHT-positiven Wachstumskegel (Abb. 16, S. 37).

2.2.2.7 Astrogliale Reaktion

Die astrogliale Reaktion lässt sich gut mit dem Marker GFAP erfassen. Der immunhistochemische Nachweis erfolgte je Tier an zwei 20µm dicken Schnitten in einem Abstand von ca. 200µm zueinander. An den ersten drei Zeitpunkten wurden innerhalb der homozygot defizienten Gruppe und der Wildtyp Vergleichsgruppe jeweils n = 3-4 Tiere untersucht, am Tag 14 n = 6-7.

Homozygot Galanin-defiziente Tiere zeigten im Vergleich zu den Wildtyp Tieren im axotomierten Fazialiskern in der Immunhistochemie für den astroglialen Marker GFAP zu den verschiedenen Zeitpunkten voneinander stark abweichende Ergebnisse, die daher nur eingeschränkt aussagekräftig sind. Es zeigte sich eine vermehrte immunhistochemische Färbung am Tag 2 um 18%, eine leicht verminderte am Tag 3 um -5%, sowie keine Differenz am Tag 14, wobei der Nachweis jeweils unsignifikant war ($P > 0,1$, Student-t-Test). Am Tag 7 zeigte sich jedoch eine gesteigerte, signifikante GFAP-positive Astrozytenreaktion um +13%, wobei diese als zufällig signifikant einzuschätzen ist ($P < 0,05$, Student-t-Test, Mittelwert Farbintensität +/- Standardabweichung SEM) (Abb. 17, oben links, S. 39).

2.2.2.8 Mikrogliale Reaktion

Die frühe Phase mikroglialer Aktivierung (Tag 1 bis 4) lässt sich gut durch das vermehrt nachweisbare Antigen α M β 2-Integrin erfassen, das neben anderen Antigenen den Beginn und den Verlauf der mikroglialen Aktivierung markiert.

Die zweite Phase um die Tage 7 - 14 wurde hier mit den Zelladhäsionsmolekülen MHC1 und dessen kostimulierenden Faktor B7.2 untersucht. Neben der Quantifizierung der mikroglialen Aktivierung lässt sich damit auch das Auftreten von mikroglialen Knötchen morphologisch aufzeigen, die als mikrogliale Konglomerate die „Phagozytosetrupps“ um zugrunde gegangene Neuronen repräsentieren. Ein indirekter Schluss auf das Ausmaß des neuronalen Zelltods ist durch die Anzahl der Mikrogliaknötchen möglich, lässt jedoch keine endgültige Aussage über diesen zu.

Homozygot Galanin-defiziente Tiere zeigten im Vergleich zu den Wildtyp Tieren im axotomierten Fazialiskern in der Immunhistochemie für den v.a. die frühe Phase

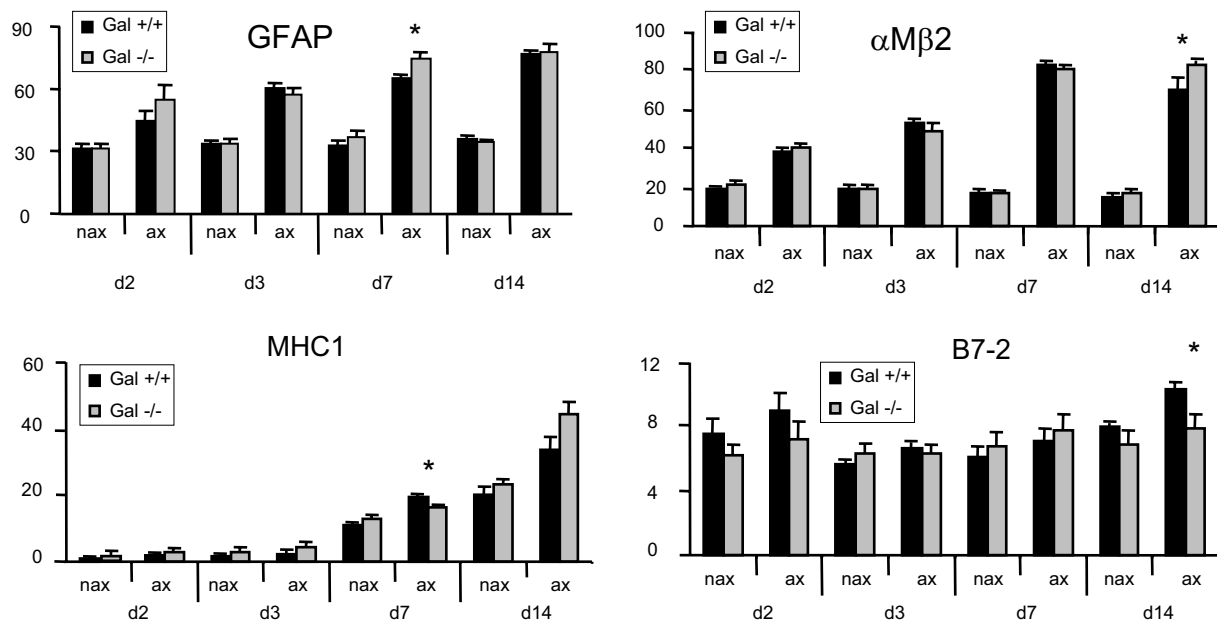


Abbildung 17. Links oben ist die astrogliale Reaktion anhand des Markers GFAP (glial fibrillary acid protein) bei der Galanin Wildtyp-Gruppe im Vergleich zu der Galanin-defizienten Gruppe nach Axotomie zu den verschiedenen Zeitpunkten dargestellt. Ebenso ist der Vergleich von der operierten (ax) und der unoperierten Seite (nax) gezeigt. Es zeigte sich ein uneinheitliches Bild unterschiedlicher immunhistochemischer Färbung zu den unterschiedlichen Zeitpunkten. Dies gilt auch für die Untersuchung der mikroglialen Marker α M β 2 (rechts oben), MHC1 (links unten) und B7-2 (rechts unten). Die signifikanten Ergebnisse am Tag 7 für GFAP, am Tag 14 für α M β 2, am Tag 7 für MHC1 und am Tag 14 für B7-2 sind vor dem Hintergrund der im Zeitverlauf uneinheitlichen immunhistochemischen Reaktion als zufällig signifikant einzuschätzen. Zu den weiteren Zeitpunkten waren die Ergebnisse nicht signifikant im Vergleich der beiden untersuchten Gruppen Gal+/+ (schwarz) und Gal-/- (grau) (Student-t-Test, Mittelwert, +/- Standardabweichung des Mittelwertes SEM).

markierenden Marker α M β 2-Integrin ein nahezu unverändertes Bild. So ergab sich ein vernachlässigbarer quantitativer Unterschied von +3% am Tag 2, -7% am Tag 3 und -3% am Tag 7, der jeweils unsignifikant war ($P > 0,1$, Student-t-Test). Am Tag 14 ließ sich jedoch eine signifikante, vermehrte Reaktion von 15% bei den homozygot Galanin-defizienten Tieren nachweisen ($P < 0,05$, Student-t-Test; Mittelwert Farbintensität +/- Standardabweichung SEM) (Abb. 17, oben rechts, S. 39). Auf Grund der erheblichen Schwankungen der Ergebnisse zu den unterschiedlichen Zeitpunkten ist das signifikante Ergebnis am Tag 14 als zufällig signifikant einzuschätzen.

MHC1 zeigte in den homozygot Galanin-defizienten Tieren im Vergleich zu der Wildtyp-Vergleichsgruppe eine signifikante, um 15% verminderte immunhistochemische Nachweisbarkeit am Tag 7, hingegen eine gesteigerte am Tag 2 von 50%, am Tag 3 von 100% und am Tag 14 von 30%, die bei relativ hoher Standardabweichung jeweils unsignifikant war ($P < 0,05$ am Tag 7, $P > 0,5$ am Tag 2 und Tag 3, $P > 0,05$ am Tag 14,

Tabellarische Zusammenfassung: Auswirkungen der Galanin-Defizienz

Zelltyp	Zeitpunkt	Veränderung
Axotomierte Motoneurone - axonale Regeneration - zentrales Auswachsen VACHT positiver Neuriten - CGRP Immunreaktivität - neuronales Überleben	Tag 4 Tag 14 Tag 14 Tag 30	unverändert unverändert unverändert unverändert
Lymphozyteneinwanderung (in den Fazialiskern)	Tag 3 Tag 14	unverändert unverändert
Mikrogliale Reaktion - frühe Phase (state of alert) (α M β 2, MHC1, B7-2) - mittlere Phase (homing) (α M β 2, MHC1, B7-2) - späte Phase (Phagozytose) (α M β 2, MHC1, B7-2)	Tag 2 Tag 3 Tag 7 Tag 14	unverändert unverändert unverändert unverändert
Astrogliale Reaktion - frühe Phase (GFAP) - späte Phase (GFAP)	Tag 2 Tag 3 (Tag 7) Tag 14	unverändert unverändert
Einwanderung in den Fazialisnerven - Granulozyten - Makrophagen	Tag 4 Tag 4	vermehrt (nicht signifikant) unverändert

Student-t-Test, Mittelwert Farbinintensität +/- Standardabweichung SEM) (Abb. 17, unten links, S. 39).

B7-2 zeigte eine nicht signifikante, verminderte immunhistochemische Nachweisbarkeit von 20% am Tag 2 und von 5% am Tag 3 und eine nicht signifikante, vermehrte von 8% am Tag 7. Am Tag 14 hingegen zeigte sich eine signifikante, verminderte quantitative Nachweisbarkeit im axotomierten Galanin-/- Fazialiskern von 25% (P <0,05, Student-t-Test, Mittelwert +/- Standardabweichung SEM) (Abb. 17, unten rechts, S. 39).

Für die Ergebnisse der Immunhistochemie gegen MHC1 wie für die der Immunhistochemie gegen B7-2 gilt, dass auf Grund der Unterschiedlichkeit der Ergebnisse zu den verschiedenen Zeitpunkten einzelne signifikante Ergebnisse als zufällig signifikant einzuschätzen sind.

Quantitativ-morphologisch waren die Anzahl und Dichte der Mikrogliaknötchen im Vergleich zu denen in den Fazialiskernen der Wildtyp-Vergleichsgruppe unverändert (nicht mitdargestellte Beobachtung).

2.2.3 CGRP-Defizienz und die zelluläre Antwort auf die Verletzung des Fazialisnervs

2.2.3.1 Axonale Regeneration des gequetschten Fazialisnervs

Zum Nachweis der Regenerationsstrecke der auswachsenden Axone wurden je Tier fünf, in ihrem Abstand zueinander gleichweite Nervenschnitte von 10µm Dicke verwandt (n = 5). Allerdings wurde in diesem Versuch lediglich die Galanin-positive Neuronen-/Axonenpopulation erfasst, die eine von der CGRP-positiven unterschiedliche Motoneuronenpopulation darstellt.

Die Galanin-positive Neuronenpopulation der CGRP Wildtypen zeigte eine maximale Regenerationsstrecke von 7,60mm +/-0,3 die der CGRP-defizienten Tiere von 7,71mm +/-0,22. Damit wiesen die CGRP-defizienten Tiere eine nicht signifikante, unwesentlich verminderte Wachstumsstrecke im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren auf (P > 0,5, Student-t-Test, Mittelwert +/- Standardabweichung SEM) (Abb. 18, oben links, S. 42).

2.2.3.2 Makrophagen- und Granulozyteneinwanderung in den gequetschten Fazialisnerven

Der Nachweis der Makrophagen erfolgte durch Immunhistochemie für α M β 2, der der neutrophilen Granulozyten durch den immunhistochemischen Nachweis der endogenen Peroxidase. Es wurden je Tier fünf, in ihrem Abstand zueinander gleichweite Nervenschnitte von 10µm Dicke verwandt.

Homozygot CGRP-defiziente Tiere wiesen gegenüber der Wildtyp Vergleichsgruppe an der Verletzungsstelle eine 25% vermehrte, jedoch nicht signifikante Einwanderung von Granulozyten auf (P > 0,1, Student-t-Test, Mittelwert +/- Standardabweichung). Die Anzahl eingewanderter Granulozyten 2mm und 4mm distal der Verletzungsstelle zeigte nahezu keinen Unterschied zu der Wildtyp Vergleichsgruppe (Abb. 18, oben Mitte, S. 42).

Homozygot CGRP-defiziente Tiere zeigten im Vergleich zu der Wildtyp Gruppe an der Verletzungsstelle eine um 30% vermehrte Einwanderung von Makrophagen, 2mm distal davon keinen Unterschied bzw. 4mm distal eine leicht vermehrte Anzahl von 10%, wobei keines der Ergebnisse signifikant war (P > 0,1 an der Verletzungsstelle, P > 0,5 2mm und 4mm distal; Student-t-Test, Mittelwert +/- Standardabweichung SEM) (Anzahl der Makrophagen pro Gesichtsfeld in einer Vergrößerung von x20 und die Anzahl pro Messgitterquadrat von 0,39mm²) (Abb. 18, oben rechts, S. 42). Somit hatte die Defizienz von CGRP keinen signifikanten Einfluss auf die Einwanderung von Granulozyten und Makrophagen in den gequetschten Fazialisnerven.

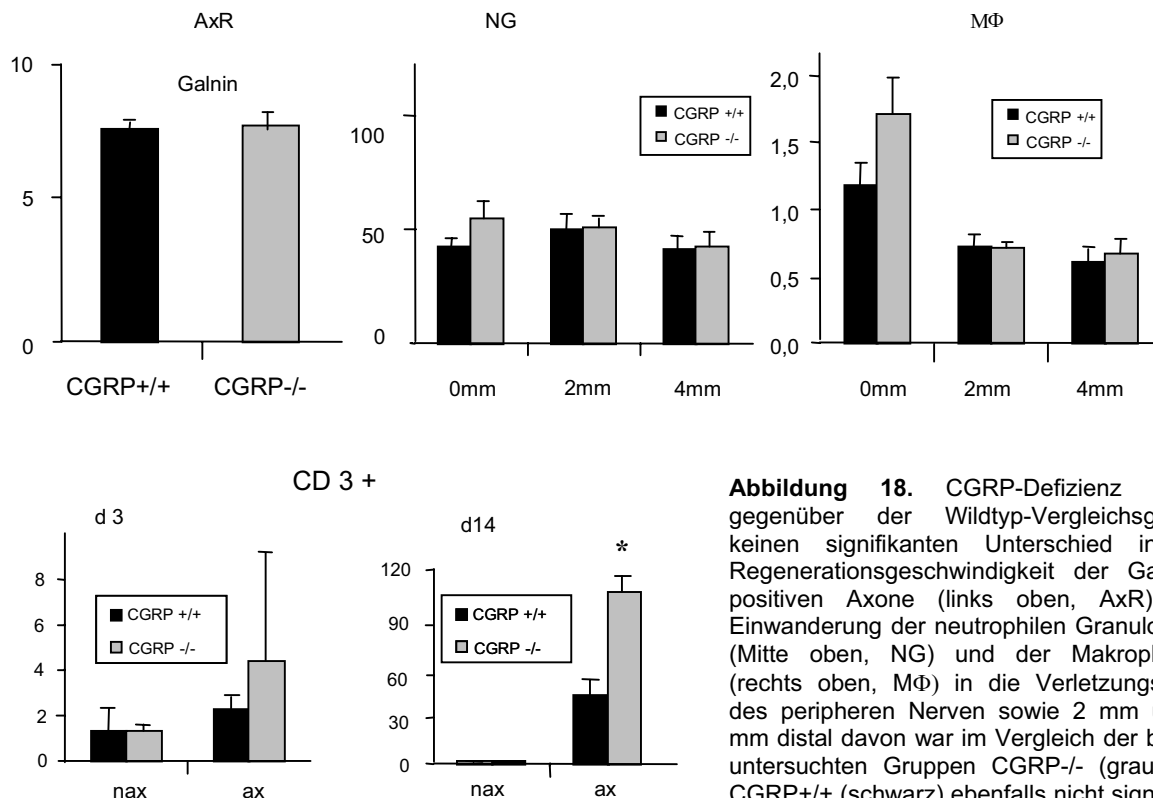


Abbildung 18. CGRP-Defizienz zeigte gegenüber der Wildtyp-Vergleichsgruppe keinen signifikanten Unterschied in der Regenerationsgeschwindigkeit der Galanin-positiven Axone (links oben, AxR). Die Einwanderung der neutrophilen Granulozyten (Mitte oben, NG) und der Makrophagen (rechts oben, MΦ) in die Verletzungsstelle des peripheren Nerven sowie 2 mm und 4 mm distal davon war im Vergleich der beiden untersuchten Gruppen CGRP-/- (grau) und CGRP+/+ (schwarz) ebenfalls nicht signifikant verändert. Jeweils Tag 4 nach Nervcrush.

Die beiden Grafen unten zeigen am Tag 3 eine zwar nicht signifikante, jedoch schon 3,4-fach vermehrte Anzahl von Lymphozyten bei hoher Standardabweichung bei $n = 3$. Am Tag 14 zeigte sich eine 2,4-fach vermehrte, signifikante Anzahl eingewandelter Lymphozyten in CGRP-/- gegenüber CGRP+/+ (* $P < 0,05$). Schön zu sehen ist die vernachlässigbare Anzahl an Lymphozyten am Tag 14 auf der nichtoperierten Seite (nax). (Student-t-Test, Mittelwert der Regenerationsstrecke bzw. der Anzahl der eingewanderten Zellen, +/- Standardabweichung des Mittelwerts SEM).

2.2.3.3 Lymphozyteneinwanderung in den Fazialiskern

Der Nachweis der T-Lymphozyten erfolgte mit Immunhistochemie für CD3 in sieben 20µm dicken Schnitten des Fazialiskerns in je gleichen Abständen zueinander (120µm Abstand) und in 2 Schnitten (340µm Abstand) am Tag 14. Durch die höhere Anzahl von Schnitten am Tag 3 gelang es, die höhere Variabilität der insgesamt noch niedrigen Anzahl eingewandelter Lymphozyten zu diesem Zeitpunkt auszugleichen. Anzahl der Tiere am Tag 3 $n = 3-4$ und am Tag 14 $n = 6-7$.

Homozygot CGRP-defiziente Tiere zeigten im Vergleich zu den Wildtyp Tieren auf der axotomierten Seite am Tag 3 eine 3,2-fach vermehrte, jedoch zu diesem Zeitpunkt unsignifikante Einwanderung CD3-positiver T-Lymphozyten. Die genaue Anzahl betrug bei CGRP-/- 4,4 Lymphozyten +/-0,51 gegenüber CGRP+/+ 0,89 Lymphozyten +/-0,51 ($P > 0,5$, Student-t-Test, SEM Mittelwert +/- Standardabweichung). Was sich als Tendenz am Tag 3 andeutete, ergab am Tag 14 ein signifikantes Ergebnis, wo CGRP-/- mit 114,6 Lymphozyten +/-12,5 gegenüber 46,5 Lymphozyten +/-11,4 eine signifikante, 2,45-fach vermehrte Lymphozyteneinwanderung in den Fazialiskern zeigte ($P < 0,05$, Student-t-Test) (Abb. 18, unten, S. 42).

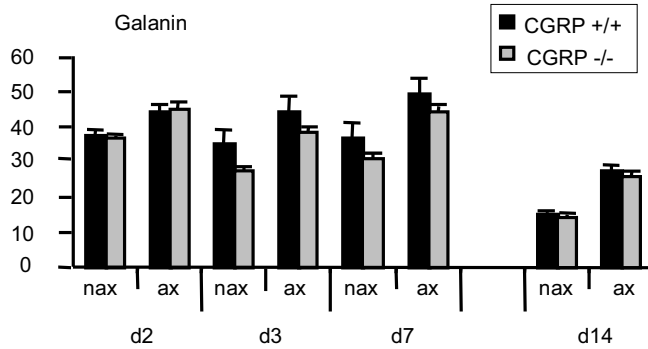


Abbildung 19. Grafische Darstellung der neuronalen Reaktion der Gruppen CGRP+/+ (schwarz) und CGRP-/- (grau) im Vergleich anhand des Neuropeptids Galanin. Die beiden untersuchten Gruppen zeigten keinen signifikanten Unterschied weder auf der axotomierten Seite (ax) noch auf der nicht axotomierten Seite (nax) zu den verschiedenen Zeitpunkten. Tag 14 bei eigenständigem Versuchsaufbau ist getrennt dargestellt. (Student-t-Test, Mittelwert der immunohistochemischen Intensität, +/- Standardabweichung des Mittelwertes SEM).

2.2.3.4 Neuronale Reaktion

Eine Möglichkeit, die posttraumatische neuronale Reaktion zu erfassen, ist die immunohistochemische Quantifizierung von neuronalen Markern wie Galanin und CGRP. Auch in diesem Versuchsaufbau wurden bei CGRP-Defizienz der untersuchten Tiere nur die Galanin-positiven Neurone erfasst, die eine eigene Population gegenüber den CGRP-positiven Neuronen darstellen (Moore et al., 1989). Untersucht wurde je 1 Gewebsschnitt von 20µm Dicke zu den unterschiedlichen Zeitpunkten Tag 2, Tag 3, Tag 7 und Tag 14, wobei zu den ersten drei Zeitpunkten innerhalb

der homozygot defizienten Gruppe und der Wildtyp Vergleichsgruppe je n = 3-4 Tiere untersucht wurden, am Tag 14 n = 6-7.

Homozygot CGRP-defiziente Tiere zeigten im Vergleich zu den Wildtyp Tieren im axotomierten Fazialiskern kaum einen Unterschied im immunohistochemischen Nachweis von Galanin am Tag 2. Am Tag 3, 7 und 14 zeigten sie einen mit 10% verminderten, nicht signifikanten Nachweis im Vergleich zu der Gruppe der Wildtyp Tiere ($P > 0,1$, Student-t-Test, Mittelwert immunohistochemische Färbung, +/- Standardabweichung des Mittelwertes SEM) (Abb. 19, S. 43).

2.2.3.5 Zentrale Wachstumskegel

Bei CGRP-Defizienz der untersuchten Gruppe wurde die Galanin-positive Neuronenpopulation und deren Wachstumskegel erfasst. Es lässt sich also keine Aussage über die Auswirkung der CGRP-Defizienz auf die von der Galanin-positiven Motoneuronenpopulation unabhängige CGRP-positve Neuronenpopulation machen.

Die CGRP-defizienten Tiere zeigten in der quantitativ-morphologischen Beurteilung der Galanin-positiven Wachstumskegel keinen nachweisbaren Unterschied im Vergleich zu der Wildtyp Gruppe (Abb. 20, S. 44).

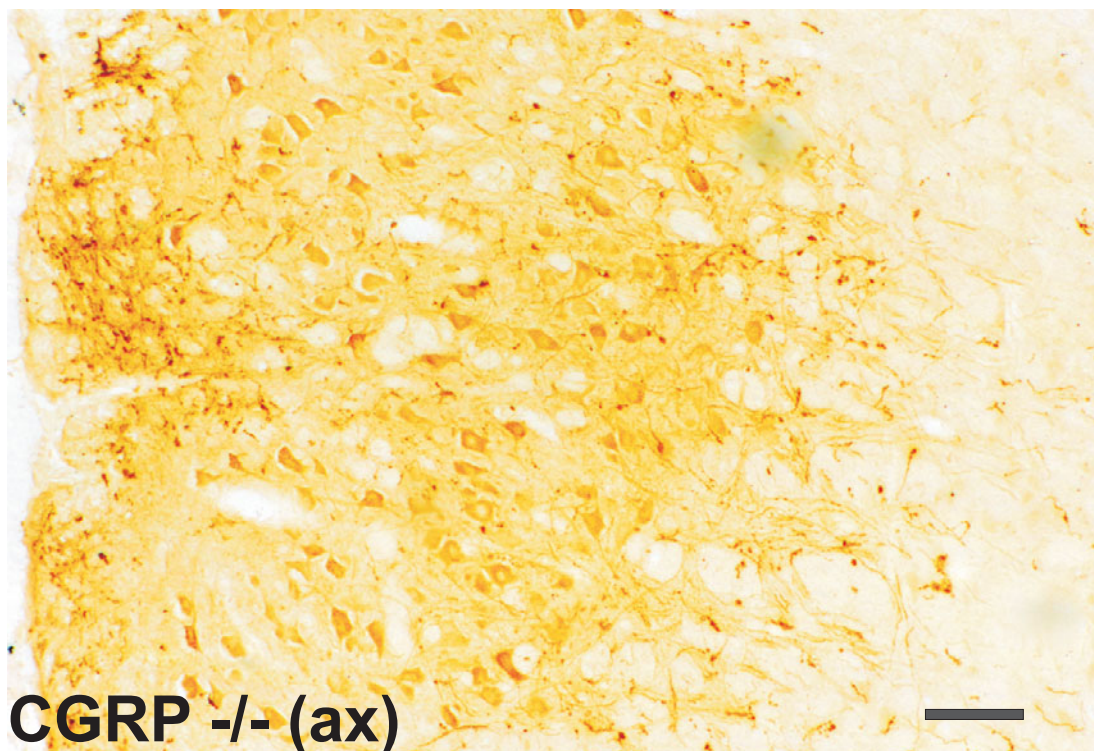
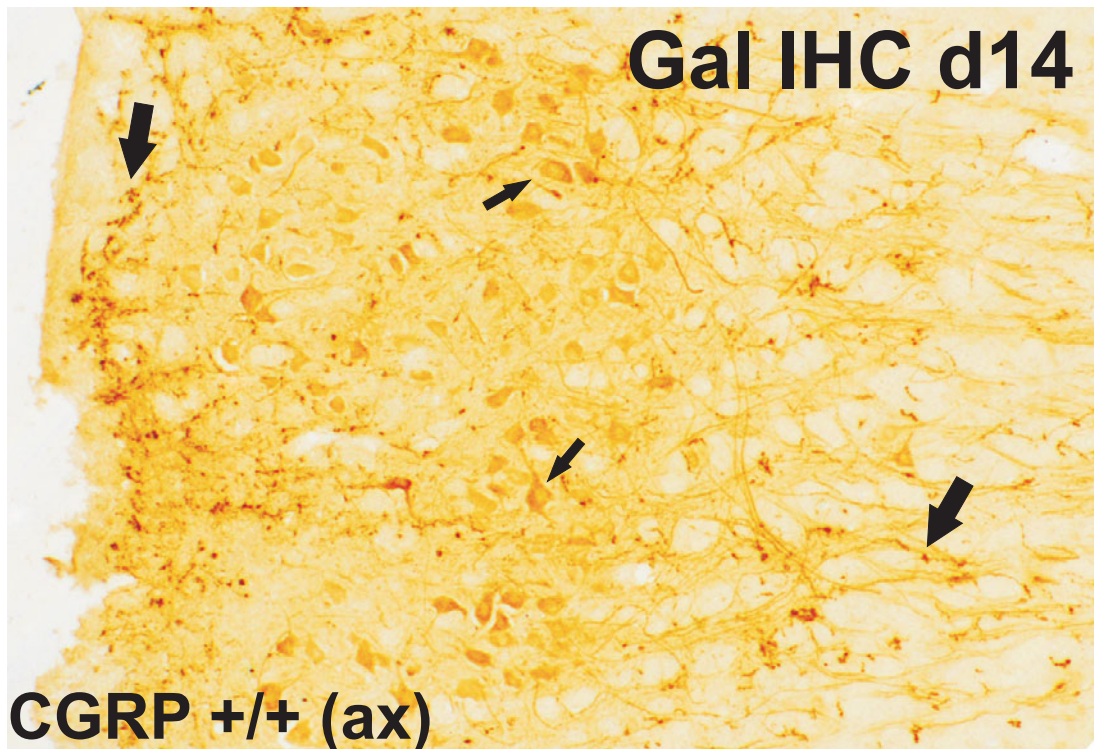


Abbildung 20. Galanin Immunohistochemie im Fazialiskern. Vergleich der zentralen Axonaussprossung der Motoneurone in CGRP+/+ Mäusen im Vergleich zu der in CGRP-/- Mäusen 14 Tage nach Fazialisaxotomie (ax). Beachte die deutliche Färbung von Neuronen (kleine Pfeile) und aussprossenden Axonen mit ihren Wachstumskegeln (große Pfeile), diese vor allem perinukleär in der weißen Substanz. Morphologisch und quantitativ lässt sich im Hinblick auf die aussprossenden Wachstumskegel kein Unterschied bei CGRP+/+ gegenüber CGRP-/- Mäusen erkennen. Maßbalken: 0,1mm

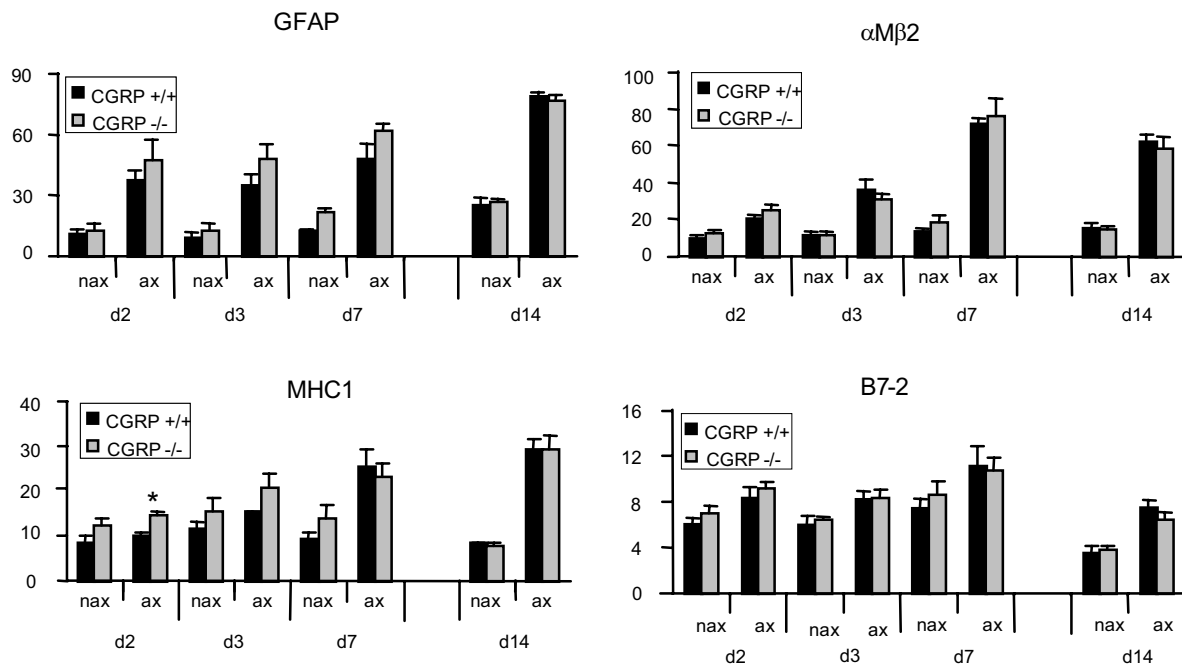


Abbildung 21. Links oben ist die astrogliale Reaktion anhand des Markers GFAP (glial fibrillary acid protein) bei der CGRP Wildtyp-Gruppe (schwarz) im Vergleich zu der CGRP-defizienten Gruppe (grau) nach Axotomie zu den verschiedenen Zeitpunkten dargestellt. Ebenso ist der Vergleich von der axotomierten (ax) und der nicht axotomierten Seite (nax) gezeigt. Es zeigte sich zu den Zeitpunkten Tag 2, 3 und 7 eine jeweils um ca. 25% verstärkte immunohistochemische Nachweisbarkeit bei CGRP-/- (ax) im Vergleich zu CGRP+/+, die jedoch nicht signifikant war. Am Tag 14 zeigte sich kaum ein Unterschied.

Ein uneinheitliches Bild ergab die jeweilige Immunhistochemie der mikroglialen Marker α M β 2 (rechts oben), MHC1 (links unten) und B7-2 (rechts unten). MHC1 war am Tag 2 bei CGRP-/- signifikant um 34% in seiner immunohistochemischen Intensität verstärkt. Außer bei MHC1 zu diesem Zeitpunkt zeigte sich bei diesem und den anderen mikroglialen Markern kein weiteres signifikantes Ergebnis im Vergleich der beiden untersuchten Gruppen CGRP+/+ und CGRP-/. Tag 14 ist bei eigenständigem Versuchsaufbau jeweils abgesetzt dargestellt (Student-t-Test, Mittelwert, +/- Standardabweichung des Mittelwertes SEM).

2.2.3.6 Astrogliale Reaktion

Die astrogliale Reaktion lässt sich gut mit dem Marker GFAP erfassen. Der immunhistochemische Nachweis erfolgte je Tier an zwei 20 μ m dicken Schnitten in einem Abstand von ca. 200 μ m zueinander. Die Anzahl der untersuchten Tiere war zu den unterschiedlichen Zeitpunkten Tag 2, Tag 3, Tag 7 je n = 3-4 und Tag 14 n = 6-7.

Homozygot CGRP-defiziente Tiere zeigten im Vergleich zu den Wildtyp Tieren im axotomierten Fazialiskern in der Immunhistochemie für den astroglialen Marker GFAP an den Zeitpunkten Tag 2, Tag 3 und Tag 7 eine zwar verstärkte, jedoch jeweils unsignifikante immunhistochemische Intensität von ca. 20–25%. Die Untersuchung der GFAP-Immunhistochemie am Tag 14, die in einem eigenständigen Versuchsaufbau erfolgte, ergab hingegen eine im Vergleich unwesentlich verminderte Reaktion ($P > 0,1$ am Tag 2, 3 und 7 und $P > 0,5$ am Tag 14, Student-t-Test, Mittelwert Farbintensität +/- Standardabweichung SEM) (Abb. 21, oben links, S. 45).

Tabellarische Zusammenfassung: Auswirkungen der CGRP-Defizienz

Zelltyp	Zeitpunkt	Veränderung
Axotomierte Motoneurone - axonale Regeneration - zentrales Neuritenauswachsen (Galanin positiv) - Galanin Immunreaktivität	Tag 4 Tag 14 Tag 14	unverändert unverändert unverändert
Lymphozyteneinwanderung (in den Fazialiskern)	Tag 3 Tag 14	vermehrt (nicht signifikant) stark vermehrt
Mikrogliale Reaktion - frühe Phase (state of alert) (α M β 2, MHC1, B7-2) - mittlere Phase (homing) (α M β 2, MHC1, B7-2) - späte Phase (Phagozytose) (α M β 2, MHC1, B7-2)	Tag 2 Tag 3 Tag 7 Tag 14	unverändert unverändert unverändert
Astrogliale Reaktion - frühe Phase (GFAP) - späte Phase (GFAP)	Tag 2 Tag 3 (Tag 7) Tag 14	unverändert unverändert
Einwanderung in den Fazialisnerv - Granulozyten - Makrophagen	Tag 4 Tag 4	vermehrt (nicht signifikant) vermehrt (nicht signifikant)

2.2.3.7 Mikrogliale Reaktion

Der immunhistochemische Nachweis erfolgte auch hier je Tier an zwei 20 μ m dicken Schnitten in einem Abstand von ca. 200 μ m zueinander. Die Anzahl der untersuchten Tiere war zu den unterschiedlichen Zeitpunkten Tag 2, Tag 3, Tag 7 je n= 3-4 und Tag 14 n = 6-7. Homozygot CGRP-defiziente Tiere zeigten im Vergleich zu den Wildtyp Tieren im axotomierten Fazialiskern für den frühen Aktivierungsmarker α M β 2 eine vermehrte immunhistochemische Färbung um 29% am Tag 2 und um 5% am Tag 7, hingegen eine verminderte immunhistochemische Färbung am Tag 3 um 20% und am Tag 14 um 7%, die jeweils nicht signifikant waren ($P > 0,05$ am Tag 2, $P > 0,5$ am Tag 3, 7 und 14, Student-t-Test, Mittelwert +/- Standardabweichung SEM) (Abb. 21, oben rechts, S. 45).

MHC1 als Marker der späten Phase zeigte in den homozygot CGRP-defizienten Tieren im Vergleich zu den Wildtyp Tieren am Tag 2 eine signifikante, vermehrte immunhistochemische Farbintensität von 34% ($P < 0,005$, Student-t-Test), hingegen eine nicht signifikante, vermehrte Färbintensität am Tag 3 von 27%, eine verminderte von 7% am Tag 7 und am Tag 14 keine differente Signalgebung ($P > 0,1$, Student-t-Test, Mittelwert +/- Standardabweichung SEM) (Abb. 21, unten links, S. 45). Bei sehr schwacher Signalgebung am Tag 2 ist dieses Ergebnis als zufällig signifikant einzustufen.

B7-2 zeigte in den homozygot CGRP-defizienten Tieren im Vergleich zu den Wildtyp Tieren keinen wesentlichen und zu allen Zeitpunkten einen nicht signifikanten Unterschied. So ergab sich eine leicht vermehrte immunhistochemische Intensität am Tag 2 von 9%, eine gleichbleibende am Tag 3 und eine leicht verminderte von 4% am Tag 7 und von 15% am Tag 14 ($P > 0,1$ zu allen Zeitpunkten, Student-t-Test, Mittelwert Farbinsensitivität \pm Standardabweichung SEM) (Abb. 21, unten rechts, S. 45).

Quantitativ-morphologisch waren die Anzahl und Dichte der Mikrogliaknötchen in den CGRP-defizienten Tieren im Vergleich zu denen in den Fazialiskernen der Wildtyp Mäuse unverändert (nicht dargestellte Beobachtung). Mikrogliaknötchen bilden sich v.a. um zu Grunde gegangene Neurone, womit auch gleichzeitig ein indirekter Schluss auf das Ausmaß des neuronalen Zelltods möglich ist. Im Vergleich der beiden Gruppen war jedoch die Anzahl der Mikrogliaknötchen unverändert.

2.2.4 eNOS-Defizienz und die zelluläre Antwort auf die Verletzung des Fazialisnervs

2.2.4.1 Axonale Regeneration des gequetschten Fazialisnervs

Zum Nachweis der Regenerationsstrecke der auswachsenden Axone wurden je Tier fünf, in ihrem Abstand zueinander gleichweite Nervenschnitte von 10 μ m Dicke verwandt ($n = 5$).

Normale Wildtyp Tiere zeigten eine Regenerationsstrecke von 6,88mm \pm 0,21 für Galanin- und 6,94mm \pm 0,1 für CGRP-immunreaktive Axone am Tag 4. Die homozygoten eNOS-defizienten Tiere zeigten dazu im Vergleich eine leicht verminderte Wachstumsstrecke für die Galanin-immunreaktiven Axone von 6,73mm \pm 0,14 (entspricht einer 0,15mm geringeren Wachstumsstrecke) und eine leicht erhöhte für die CGRP-immunreaktiven Axone von 7,04mm \pm 0,27 (entspricht einer 0,1mm längeren Wachstumsstrecke), wobei beide Ergebnisse nicht signifikant waren ($P > 0,5$ für Galanin und $P > 0,5$ für CGRP, Student-t-Test, Mittelwert \pm Standardabweichung SEM) (Abb. 22, oben links – Galanin, oben rechts – CGRP, S. 48).

2.2.4.2 Makrophagen- und Granulozyteneinwanderung in den gequetschten Fazialisnerven

Der Nachweis der Makrophagen erfolgte durch Immunhistochemie für α M β 2 und jener der neutrophilen Granulozyten durch den immunhistochemischen Nachweis der endogenen Peroxidase.

Homozygot eNOS-defiziente Tiere wiesen gegenüber der Wildtyp Vergleichsgruppe an der Verletzungsstelle und 2mm distal davon nahezu keinen Unterschied in der Anzahl eingewanderter neutrophiler Granulozyten auf, 4mm distal ließ sich eine um 40%

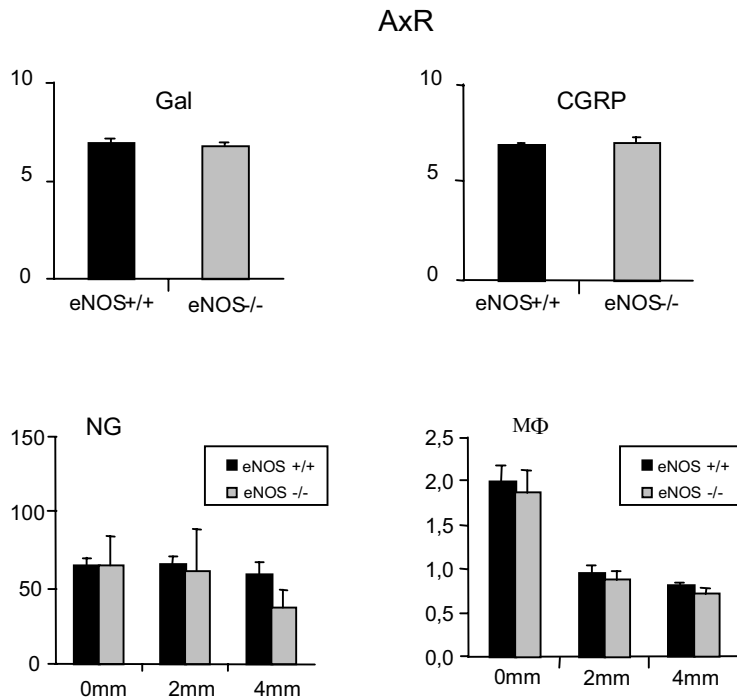


Abbildung 22. eNOS-Defizienz zeigte gegenüber der Wildtyp-Vergleichsgruppe keinen signifikanten Unterschied in der Regenerationsgeschwindigkeit der Galanin-positiven sowie der CGRP-positiven Axone (links und rechts oben, AxR). Die Einwanderung der neutrophilen Granulozyten (links unten, NG) und der Makrophagen (rechts unten, MΦ) in die Verletzungsstelle des peripheren Nerven sowie 2mm und 4mm distal davon war im Vergleich der beiden untersuchten Gruppen eNOS-/- (grau) und eNOS+/+ (schwarz) ebenfalls nicht signifikant verändert. Jeweils Tag 4 nach Axotomie bzw. Nervcrush. (Student-t-Test, Mittelwert der Regenerationsstrecke bzw. der Anzahl der eingewanderten Zellen, +/- Standardabweichung des Mittelwerts SEM).

verminderte Anzahl nachweisen, die jedoch nicht signifikant war ($P > 0,1$, Student-t-Test, Mittelwert +/- Standardabweichung SEM) (Vergrößerung von x20 pro Gesichtsfeld des Mikroskops) (Abb. 22, unten links, S. 48).

Homozygot eNOS-defiziente Tiere zeigten im Vergleich zu der Wildtyp Gruppe an allen drei gemessenen Stellen eine leicht verminderte Anzahl eingewanderter Makrophagen von 6% an der Verletzungsstelle, von 7% 2mm und von 12% 4mm distal davon, wobei auch hier die Ergebnisse nicht signifikant waren ($P > 0,5$ an der Verletzungsstelle und 2mm distal, $P > 0,1$ 4mm distal, Student-t-Test, Mittelwert +/- Standardabweichung SEM) (Anzahl der Makrophagen pro Gesichtsfeld in einer Vergrößerung von x20 und die Anzahl pro Messgitterquadrat von $0,39\text{mm}^2$) (Abb.22, unten rechts, S. 48).

Somit hatte die Defizienz von eNOS keinen signifikanten Einfluss auf die Einwanderung von Granulozyten und Makrophagen in den gequetschten Fazialisnerv.

2.2.4.3 Lymphozyteneinwanderung in den Fazialiskern

Der Nachweis der T-Lymphozyten erfolgte mit Immunhistochemie für CD3 in sieben $20\mu\text{m}$ dicken Schnitten des Fazialiskerns in je gleichen Abständen zueinander ($120\mu\text{m}$ Abstand) am Tag 4 und in 2 Schnitten ($340\mu\text{m}$ Abstand) am Tag 14. Durch die höhere Anzahl von Schnitten am Tag 4 gelang es, die höhere Variabilität der zu diesem Zeitpunkt noch niedrigen Anzahl eingewanderter Lymphozyten auszugleichen. Anzahl der Tiere am Tag 4 $n = 3-4$ und am Tag 14 $n = 6-7$.

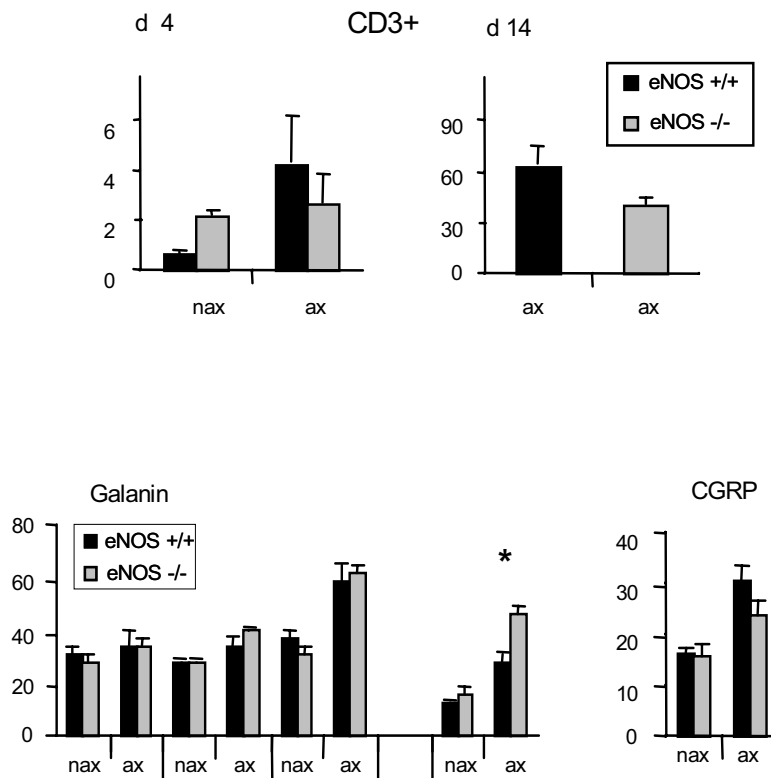


Abbildung 23. Die beiden Grafen oben zeigen sowohl am Tag 4 (links) als auch Tag 14 (rechts) eine unsignifikante, jeweils um 38% verminderte Einwanderung von CD3+ Lymphozyten bei eNOS-/- (grau) gegenüber eNOS+/+ (schwarz). Am Tag 14 ist lediglich die axotomierte Seite dargestellt (ax). Unten erfolgte der Nachweis der neuronalen Reaktion. Links zu sehen ist ein nahezu unveränderter immunhistochemischer Nachweis von Galanin am Tag 1,3 und 7, jedoch am Tag 14 zeigte sich eine signifikante um 58% gesteigerte immunhistochemische Nachweisbarkeit von Galanin im axotomierten Fazialiskern (ax). Desweiteren zeigte eNOS-/- eine um 22% verminderte immunhistochemische Intensität gegenüber eNOS+/+ für CGRP am Tag 14, die jedoch nicht signifikant war (unten rechts). (Student-t-Test, Mittelwert der eingewanderten Zellen bzw. immunhistochemische Färbung, +/- Standardabweichung des Mittelwertes SEM).

Die homozygot eNOS-defizienten Tiere zeigten am Tag 4 mit einer Anzahl eingewanderter Lymphozyten von 2,7 +/-1,12 im Vergleich zu den Wildtyp Tieren von 4,3 +/-1,87 eine um 38% verminderte, jedoch nicht signifikante verminderte Einwanderung auf der axotomierten Seite ($P > 0,1$, Student-t-Test). Ein relativ ähnliches Ergebnis ergibt sich für den Tag 14, wo eNOS-/- mit 40,9 +/-3,9 gegenüber eNOS+/+ 65,08 +/-9,8 eine 38% geringere Lymphozyteneinwanderung zeigte, wobei dieses Ergebnis knapp nicht signifikant war ($P > 0,05$, Student-t-Test) (Abb. 23, oben links – Tag 4 – und oben rechts – Tag 14, S. 49).

2.2.4.4 Neuronale Reaktion

Zum Nachweis der neuronalen Reaktion wurden die Neurone gegen Galanin und CGRP gefärbt. Untersucht wurde je Tier 1 Gewebsschnitt von 20µm Dicke am Tag 2, Tag 3, Tag 7, je Zeitpunkt $n = 3-4$, und am Tag 14 $n = 6-7$.

Die homozygot eNOS-defizienten Tiere zeigten im Vergleich zu den Wildtyp Tieren im axotomierten Fazialiskern in der Immunhistochemie für Galanin am Tag 2 und Tag 7 einen leicht verstärkten immunhistochemischen Nachweis, der nicht signifikant war. Am Tag 3 gelang ein um 10% intensiverer immunhistochemischer Nachweis in der eNOS-defizienten Gruppe gegenüber den Wildtyp Tieren, der mit $P = 0,06$ fast signifikant war. Was sich an den früheren Zeitpunkten schon andeutete, kam am Tag 14 zum Tragen, wo eNOS-Defizienz einen 40% farbintensiveren Nachweis in der Immunhistochemie für Galanin zeigte als die

Wildtyp Kontrollgruppe, der signifikant war ($P < 0,05$, Student-t-Test, Standardabweichung +/- Mittelwert) (Abb. 23, unten links, S. 49).

Anders verhält es sich bei dem immunhistochemischen Nachweis der CGRP-positiven Neurone, die zu der Galanin-positiven Neuronen verschieden sind. Hier zeigte sich bei den homozygot eNOS-defizienten Tieren am Tag 14 eine um 22% verminderte, nicht signifikante immunhistochemische Farbintensität im Vergleich zur Wildtyp Kontrollgruppe ($P > 0,1$, Student-t-Test, Mittelwert +/- Standardabweichung) (Abb. 23, unten rechts, S. 49).

2.2.4.5 Zentrale Wachstumskegel

Die homozygot eNOS-defizienten Tiere zeigten im Vergleich zu den eNOS-positiven Tieren am Tag 14, dem Gipfel des Aussprossens von Neuriten (siehe Abb. 1, S. 5), eine signifikante um 72% höhere Anzahl Galanin-positiver aussprossender Neurite und ihrer Wachstumskegel (Abb. 24, S. 51). Dieses Ergebnis korreliert zu der oben aufgezeigten signifikant vermehrten immunhistochemischen Quantifizierung von Galanin von 58% am Tag 14 im axotomierten Fazialiskern (siehe Abb. 23, S. 49).

Dazu im Vergleich wird in Abbildung 25 (S. 52) die immunhistochemische Färbung mit Galanin an homozygot eNOS-defizienten Tieren und an der Wildtyp Vergleichsgruppe im nichtaxotomierten Fazialiskern gezeigt, wo sich keine aussprossenden Neurite und deren Wachstumskegel anfärben. Die immunhistochemische Färbung der Wachstumskegel gegen das Neuropeptid Galanin ist also als spezifisch anzusehen.

Trotz der höheren Anzahl aussprossender Galanin positiver Neurite hat eNOS-Defizienz keinen Einfluss auf die Wachstumsgeschwindigkeit der aussprossenden Neurite im Vergleich zu der Gruppe der Wildtyp Tiere (Abb.22, oben links, S. 48).

2.2.4.6 Astrogliale Reaktion

Die astrogliale Reaktion lässt sich gut mit dem Marker GFAP erfassen. Der immunhistochemische Nachweis erfolgte je Tier an zwei 20 μ m dicken Schnitten in einem Abstand von ca. 200 μ m zueinander. Die Anzahl der untersuchten Tiere war am Tag 2, Tag 3, Tag 7, je Zeitpunkt $n = 3-4$, und am Tag 14 $n = 6-7$. Die Gruppe der homozygot eNOS-defizienten Tiere zeigte im Vergleich zu der Gruppe der Wildtyp Tiere im axotomierten Fazialiskern in der Immunhistochemie für den astroglialen Marker GFAP am Tag 2, am Tag 3 und am Tag 7 eine um 7% verminderte immunhistochemische Reaktion und am Tag 14 eine leicht vermehrte Reaktion von 5%. Zu allen Zeitpunkten waren die Ergebnisse unsignifikant bei $P > 0,1$ (Student-t-Test) (Abb. 26, oben links, S. 53).

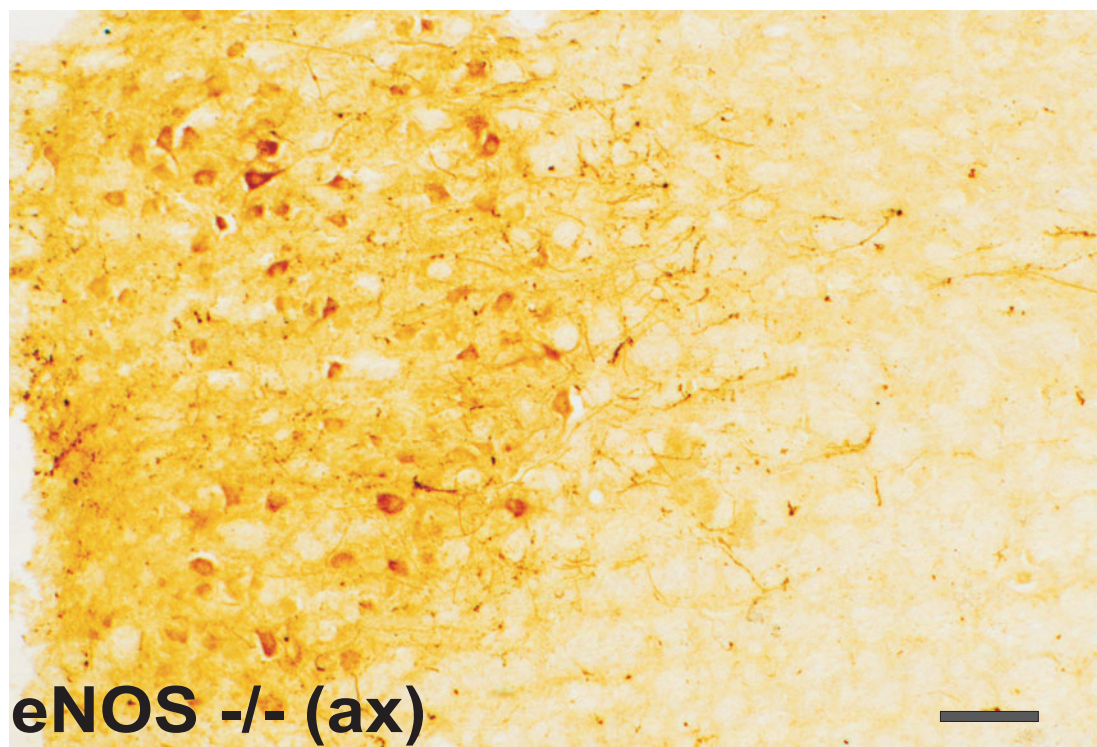
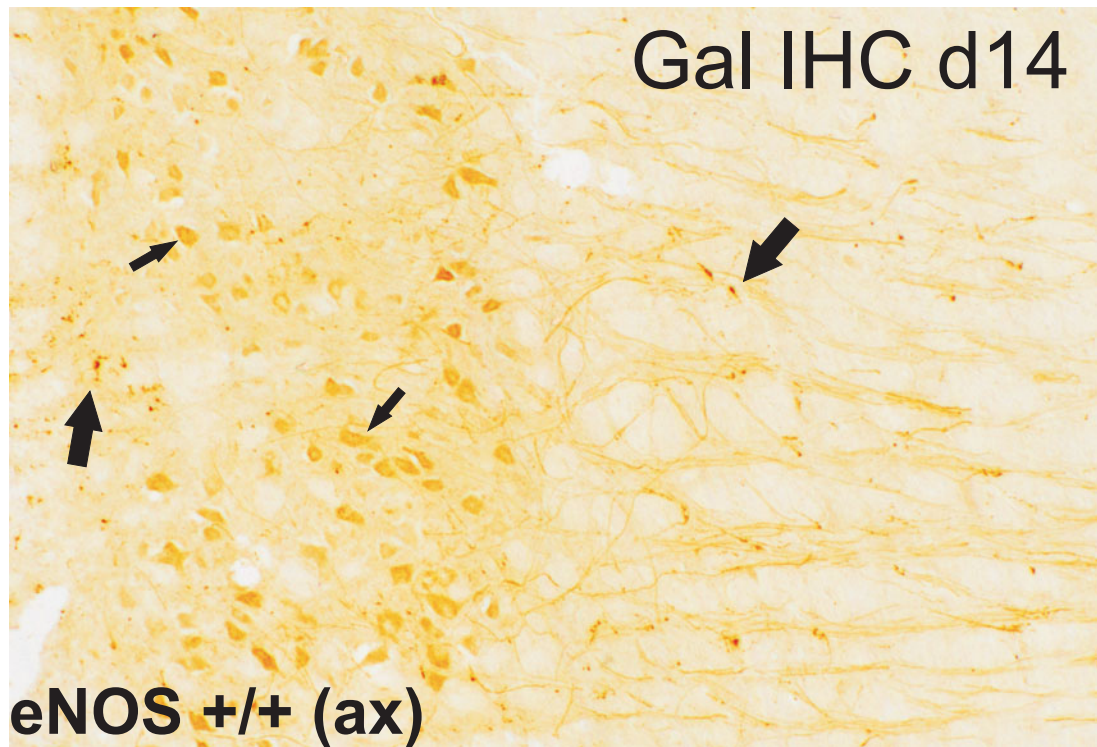


Abbildung 24. Galanin Immunhistochemie im Fazialiskern. Vergleich der zentralen Axonaussprossung der Motoneurone in eNOS+/+ im Vergleich zu der in eNOS-/- Mäusen 14 Tage nach Fazialisaxotomie (ax). Beachte die deutliche Färbung der Neurone (kleine Pfeile) und aussprossenden Axonen mit ihren Wachstumskegeln (große Pfeile), diese vor allem perinukleär in der weißen Substanz, hier vor allem ventral des Fazialiskerns. Quantitativ kommt es zu einer deutlichen, 58% signifikant stärkeren immunhistochemischen Anfärbung für Galanin bei eNOS-/- (P = 0,01, Student-t-Test) (siehe auch Abb.: 23, S. 49 unten links). Ebenso lässt sich v.a. perinukleär in der weißen Substanz eine 72%, signifikant höhere Anzahl axonaler Wachstumskegel bei eNOS-/- nachweisen (P = 0,02, Student-t-Test). Maßbalken: 0,1 mm

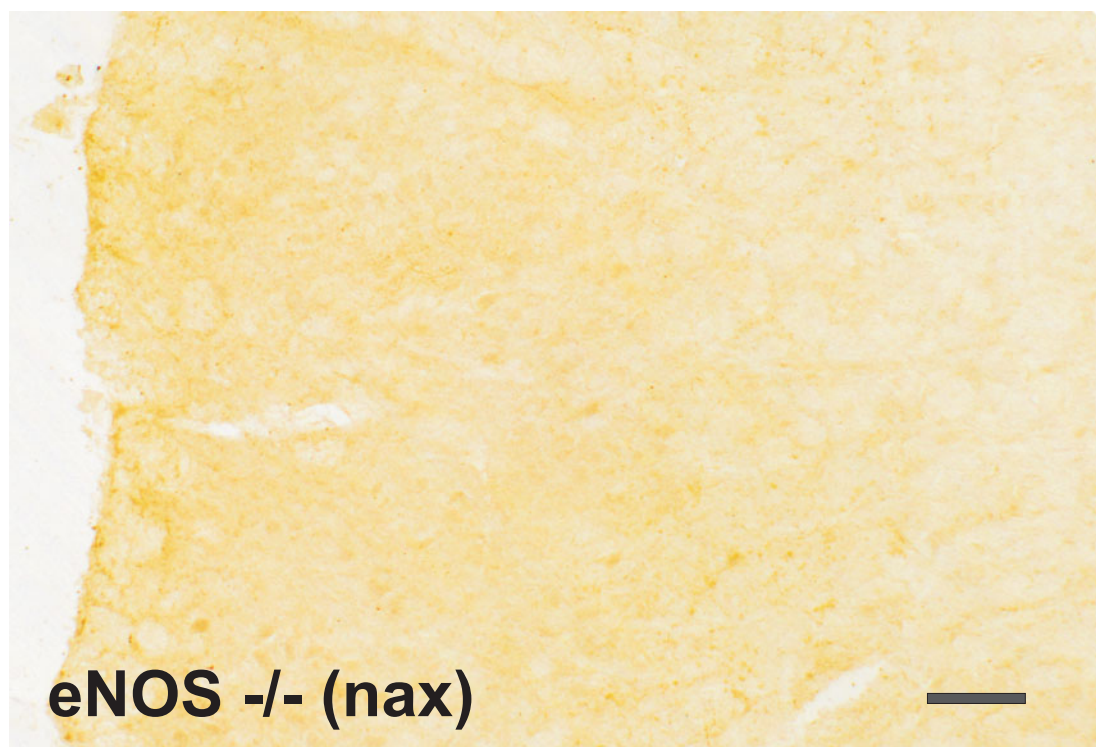
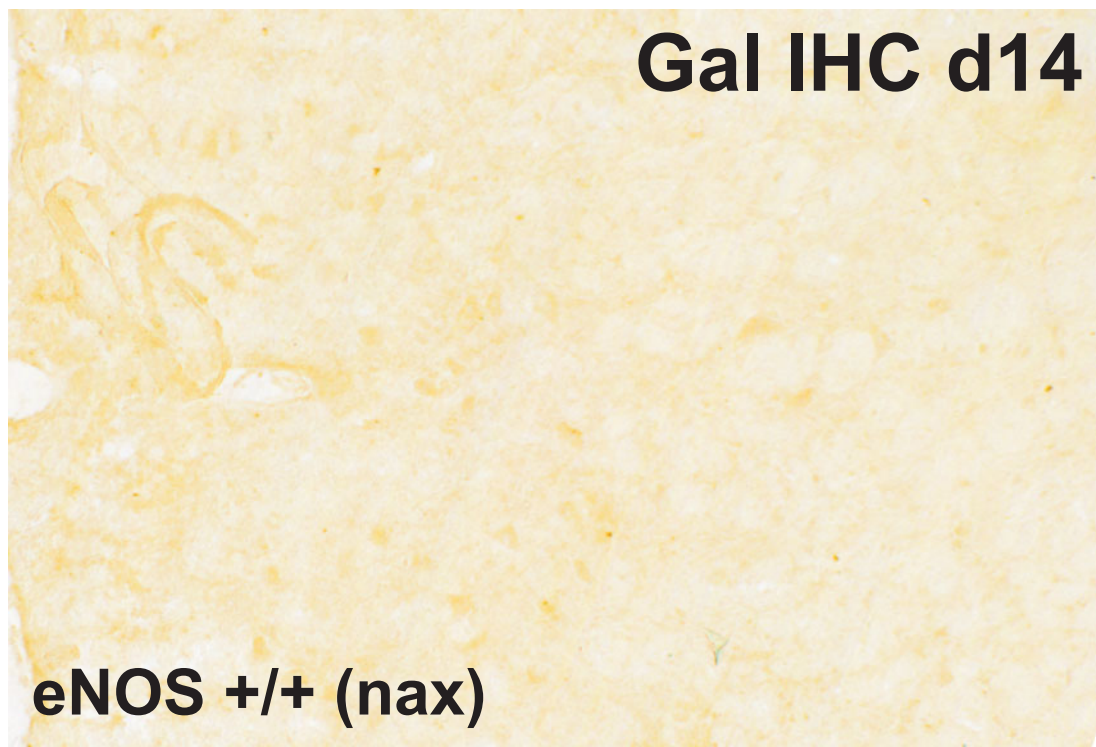


Abbildung 25. Galanin Immunhistochemie im Fazialiskern. Vergleich eNOS+/+ zu eNOS-/- Mäusen 14 Tage nach Fazialisaxotomie, hier gezeigt die unoperierten Seiten (nax) als Kontrollversuch. Im Gegensatz zu den Fazialiskernen der axotomierten Seiten (siehe Abb. 24, S. 51) kommt es hier zu keiner spezifischen Färbung der Neurone. Des Weiteren sind auf der nichtoperierten Seite keine Wachstumkegel nachweisbar. Maßbalken: 0,1mm.

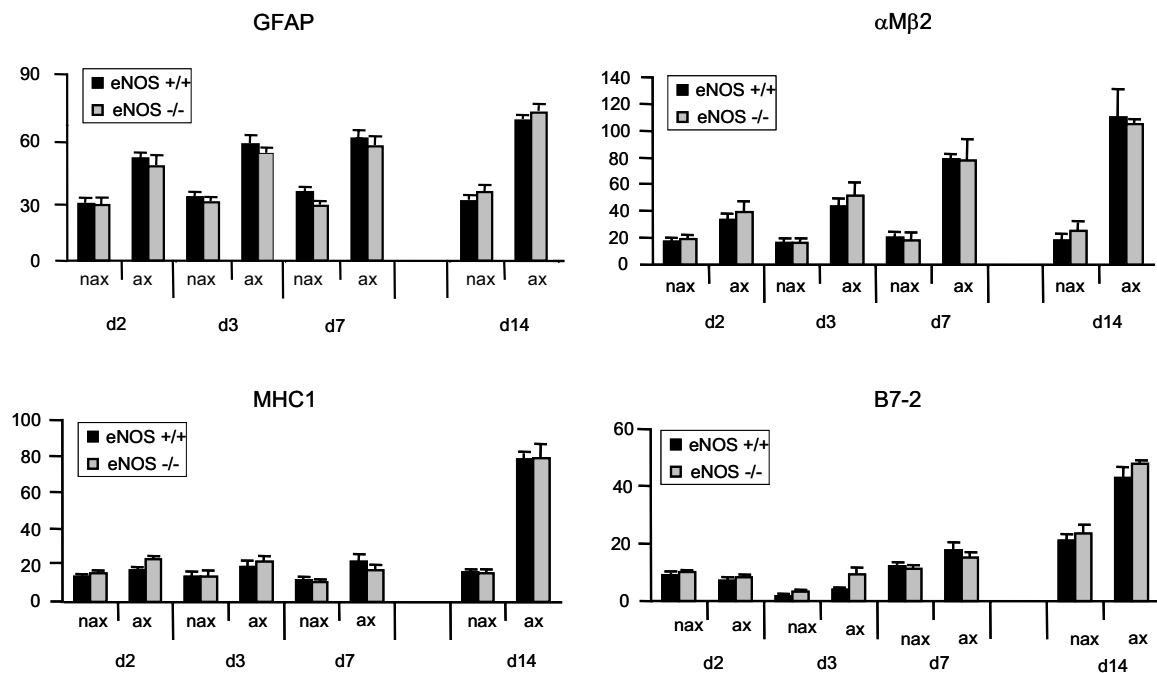


Abbildung 26. Links oben ist die astrogliale Reaktion anhand des Markers GFAP (glial fibrillary acid protein) bei der eNOS Wildtyp-Gruppe (schwarz) im Vergleich zu der eNOS-defizienten Gruppe (grau) nach Axotomie zu den verschiedenen Zeitpunkten dargestellt. Ebenso ist der Vergleich von der operierten (ax) und der unoperierten Seite (nax) gezeigt. Es zeigte sich ein uneinheitliches Bild von nur gering unterschiedlicher immunhistochemischer Färbung für GFAP in den axotomierten Fazialiskernen beider Gruppen zu den unterschiedlichen Zeitpunkten, wobei die Unterschiede jeweils nicht signifikant waren.

Dies galt auch für die Untersuchung der mikroglialen Marker α M β 2 (rechts oben), MHC1 (links unten) und B7-2 (rechts unten). Es zeigte sich zu keinem Zeitpunkt ein signifikantes Ergebnis im Vergleich der beiden untersuchten Gruppen eNOS+/+ und eNOS-/- bei insgesamt Uneinheitlichkeit zwischen den unterschiedlichen Zeitpunkten und geringen immunhistochemischen Unterschieden zwischen +/+ und -/- (ax). Tag 14 ist bei eigenständigem Versuchsaufbau abgesetzt dargestellt. (Student-t-Test, Mittelwert der immunhistochemischen Färbung, +/- Standardabweichung des Mittelwertes SEM).

2.2.4.7 Mikrogliale Reaktion

Homozygot eNOS-defiziente Tiere zeigten im Vergleich zu den Wildtyptieren im axotomierten Fazialiskern für den frühen Aktivierungsmarker α M β 2 ein zu allen Zeitpunkten nicht signifikantes Ergebnis. Es zeigte sich eine vermehrte immunhistochemische Färbung von jeweils 15% am Tag 2 und am Tag 3 und kaum ein Unterschied von <5% am Tag 7 und am Tag 14 ($P > 0,1$ zu allen Zeitpunkten, Student-t-Test, Mittelwert Farbtintensität +/- Standardabweichung SEM) (Abb. 26, oben rechts, S. 53).

Die Immunhistochemie für MHC1 zeigte in den homozygot eNOS-defizienten Tieren im Vergleich zu den Wildtyp Tieren ein zu allen Zeitpunkten nicht signifikantes Ergebnis mit einer vermehrten Quantifizierung am Tag 2 von 33% und 13% am Tag 3, sowie einer verminderten Quantifizierung von 13% am Tag 7 und keinem Unterschied am Tag 14 ($P > 0,05$ zu allen Zeitpunkten, Student-t-Test, Mittelwert Farbtintensität +/- Standardabweichung SEM) (Abb. 26, unten links, S. 53).

Die Immunhistochemie für B7.2 zeigte in den homozygot eNOS-defizienten Tieren im

Tabellarische Zusammenfassung: Auswirkungen der eNOS-Defizienz

Zelltyp	Zeitpunkt	Veränderung
Axotomierte Motoneurone - axonale Regeneration - zentrales Neuritenauswachsen - CGRP Immunreaktivität - Galanin Immunreaktivität	Tag 4 Tag 14 Tag 14 Tag 14	unverändert stark vermehrt unverändert stark vermehrt
Lymphozyteneinwanderung (in den Fazialiskern)	Tag 4 Tag 14	vermindert (nicht signifikant) vermindert (knapp nicht signifikant)
Mikrogliale Reaktion - frühe Phase (state of alert) (α M β 2, MHC1, B7-2) - mittlere Phase (homing) (α M β 2, MHC1, B7-2) - späte Phase (Phagozytose) (α M β 2, MHC1, B7-2)	Tag 2-3 Tag 3-7 Tag 14	unverändert unverändert unverändert
Astrogliale Reaktion - frühe Phase (GFAP) - späte Phase (GFAP)	Tag 2-3 Tag (7)-14	unverändert unverändert
Einwanderung in den Fazialisnerv - Granulozyten - Makrophagen	Tag 4 Tag 4	unverändert unverändert

Vergleich zu den Wildtyp Tieren ebenfalls ein zu allen Zeitpunkten nicht signifikantes Ergebnis mit einer höheren Quantifizierung bei den eNOS-defizienten Tieren von 17% am Tag 2, einer 2,3-fach höheren am Tag 3 und einer um 11% höheren am Tag 14, sowie einer um 17% verminderten am Tag 7 ($P > 0,1$, Student-t-Test, Mittelwert Farbtintensität +/- Standardabweichung SEM) (Abb. 26, unten rechts, S. 53).

Die Anzahl und Dichte der Mikrogliaknötchen in den Fazialiskernen waren in den homozygot defizienten Tieren im Vergleich zu denen in den Wildtyp Fazialiskernen unverändert. Dies lässt auch einen indirekten Schluss auf einen quantitativ unveränderten neuronalen Zelltod in den beiden Vergleichsgruppen zu (nicht dargestellte Beobachtung).

2.2.5 nNOS-Defizienz und die zelluläre Antwort auf die Verletzung des Fazialisnervs

2.2.5.1 Axonale Regeneration des gequetschten Fazialisnervs

Zum Nachweis der Regenerationsstrecke der auswachsenden Axone wurden je Tier fünf, in ihrem Abstand zueinander gleichweite Nervenschnitte von 10 μ m Dicke verwandt ($n = 5$).

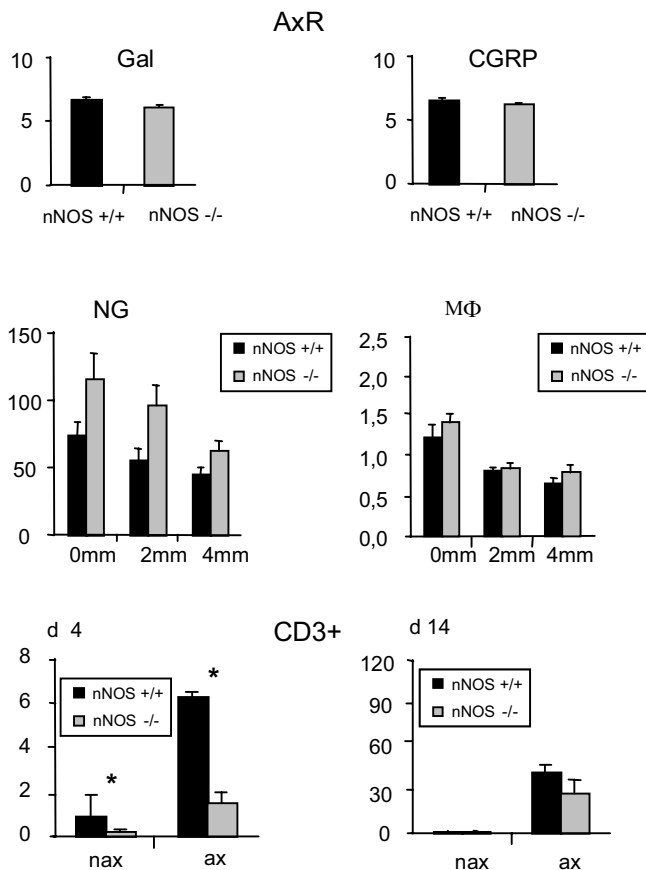


Abbildung 27. nNOS-Defizienz zeigte gegenüber der Wildtyp-Vergleichsgruppe keinen signifikanten Unterschied in der Regenerationsgeschwindigkeit (in mm) der Galanin-positiven sowie der CGRP-positiven Axone (links und rechts oben, AxR). Die Einwanderung der neutrophilen Granulozyten (Mitte links, NG) war bei nNOS-/- in die Verletzungsstelle des peripheren Nerven um 37%, 2 mm distal um 42% und 4 mm distal davon um 28% vermehrt im Vergleich zu nNOS+/+, wobei die Ergebnisse knapp nicht signifikant waren. Die Einwanderung der Makrophagen (Mitte rechts, MΦ) war im Wesentlichen unverändert im Vergleich +/+ mit -/-. Jeweils Tag 4 nach Nervcrush. Die beiden Grafen unten zeigen am Tag 4 eine signifikante (*) um 76% verminderte Lymphozyteneinwanderung bei nNOS-/- (ax) gegenüber nNOS+/+. Dies ist auch am Tag 14 nachweisbar mit einer bei nNOS-/- um 35% verminderten Lymphozyteneinwanderung, die jedoch nicht signifikant ist. (Student-t-Test, Mittelwert der Regenerationsstrecke bzw. der Anzahl der eingewanderten Zellen, +/- Standardabweichung des Mittelwerts SEM).

Wildtyp Tiere zeigten eine Regenerationsstrecke von 6,61mm +/-0,17 für Galanin-immunreaktive und 6,52mm +/-0,11 für CGRP-immunreaktive Axone am Tag 4. Die homozygoten nNOS-defizienten Tiere zeigten eine leicht verminderte Wachstumsstrecke für die Galanin-immunreaktiven Axone von 6,11mm +/-0,19 (entspricht einer 0,6mm oder 8% geringeren Wachstumsstrecke) und für die CGRP-immunreaktiven Axone von 6,21mm +/-0,09 (entspricht einer 0,31mm oder 5% geringeren Wachstumsstrecke). Beide Befunde in beiden Zell-/Neuritenpopulationen waren knapp nicht signifikant ($P > 0,05$ für Galanin und $P > 0,05$ für CGRP, Student-t-Test, +/- Standardabweichung SEM) (Abb. 27, oben links – Galanin – und oben rechts – CGRP, S. 55).

2.2.5.2 Makrophagen- und Granulozyteneinwanderung in den gequetschten Fazialisnerven

nNOS-defiziente Tiere zeigten an der Verletzungsstelle eine um 37% vermehrte Einwanderung von Granulozyten (nNOS+/+ 73,2 +/-10,9 gegenüber nNOS-/- 115,7 +/-18,1, $P = 0,09$, Student-t-Test), 2mm distal eine um 45% vermehrte Einwanderung (nNOS+/+ 55,1 +/-9,2 gegenüber nNOS-/- 95,7 +/-15,1, $P = 0,06$, Student-t-Test) und 4mm distal eine um 28% vermehrte Einwanderung (nNOS+/+ 45,2 +/-5 gegenüber nNOS-/- 62,7 +/-7,2; $P = 0,09$,

Student-t-Test) (Vergrößerung von x20, ein Gesichtsfeld des Mikroskops) (Abb. 27, Mitte links, S. 55).

Ähnlich wie schon bei der Granulozyteneinwanderung zeigte sich bei den homozygot nNOS-defizienten Tieren auch bei der Einwanderung der Makrophagen eine Tendenz zur vermehrten Einwanderung gegenüber der Wildtyp Gruppe. An der Verletzungsstelle kam es zu einer um 13%, 2mm distal zu einer um 4% und 4mm distal zu einer um 19% vermehrten Einwanderung, wobei alle Ergebnisse ebenfalls nicht signifikant waren ($P > 0,1$ an allen Messpunkten, Student-t-Test, Mittelwert \pm Standardabweichung SEM) (Abb.27, Mitte rechts, S. 55).

Die homozygot nNOS-defizienten Tiere wiesen gegenüber der Wildtyp Vergleichsgruppe zu allen Messpunkten eine vermehrte Einwanderung neutrophiler Granulozyten und Makrophagen auf, die bei den Granulozyten nur knapp nicht signifikant war.

2.2.5.3 Lymphozyteneinwanderung in den Fazialiskern

Der Nachweis der T-Lymphozyten erfolgte mit Immunhistochemie für CD3 in sieben 20 μ m dicken Schnitten des Fazialiskerns in je gleichen Abständen zueinander (120 μ m Abstand) am Tag 4 und in 2 Schnitten (340 μ m Abstand) am Tag 14. Durch die höhere Anzahl von Schnitten am Tag 4 gelang, es die höhere Variabilität der niedrigen Anzahl eingewanderter Lymphozyten auszugleichen. Die Anzahl der Tiere war am Tag 4 $n = 3-4$ und am Tag 14 $n = 6-7$.

Homozygot nNOS-defiziente Tiere zeigten im Vergleich zu den Wildtyp Tieren am Tag 4 eine signifikante, um 76%, bzw. 4,2fach verminderte Lymphozyteneinwanderung. nNOS $^{-/-}$ 1,5 \pm 0,5 gegenüber nNOS $^{+/+}$ 6,3 \pm 0,2 ($P < 0,05$, Student-t-Test, Mittelwert \pm Standardabweichung). Eine verminderte Lymphozyteneinwanderung ließ sich auch am Tag 14 nachweisen, wobei nNOS $^{-/-}$ Tiere mit 27,1 \pm 9,9 gegenüber nNOS $^{+/+}$ Tieren mit 41,8 \pm 4,7 eine um 35% verminderte, jedoch unsignifikante Lymphozyteneinwanderung aufwiesen ($P > 0,1$) (Abb. 27, unten links – Tag 4 – und unten rechts – Tag 14, S. 55).

2.2.5.4 Neuronale Reaktion

Die homozygot nNOS-defizienten Tiere zeigten im Vergleich zu den Wildtyp Tieren in der Immunhistochemie für Galanin eine geringfügig unterschiedliche immunhistochemische Intensität, die jeweils unsignifikant war (Tag 4 nNOS $^{-/-}$ weniger 9%, Tag 14 nNOS $^{-/-}$ 4% mehr, jeweils $P > 0,1$, Student-t-Test). Die Immunhistochemie für CGRP zeigte bei nNOS zu den beiden Zeitpunkten eine leicht verminderte Farbintensität von weniger als 10% am Tag 4

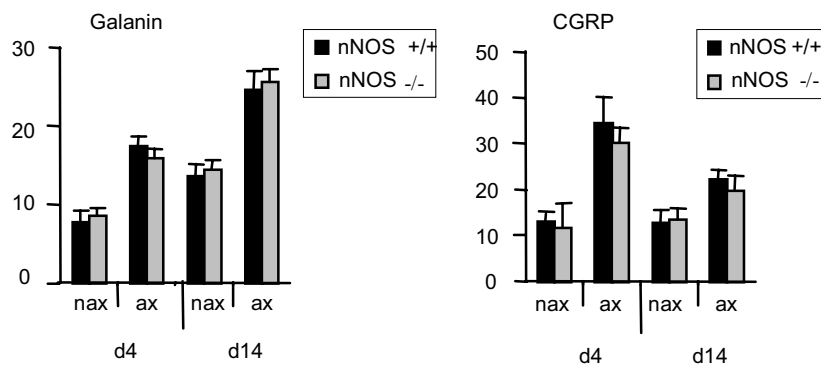


Abbildung 28. Die immunhistochemische Quantifizierung der beiden Neuropeptide Galanin (links) und CGRP (rechts) zeigten bei nNOS-/- (grau) gegenüber nNOS+/+ (schwarz) keinen signifikanten Unterschied 4 und 14 Tage nach Axotomie (ax). (Student-t-Test, Mittelwert des immunhistochemischen Intensitätsunterschieds, +/- Standardabweichung des Mittelwertes SEM).

und weniger als 5% am Tag 14 ($P > 0,5$, Student-t-Test) (Abb. 28, links – Galanin –, rechts – CGRP, S. 57).

2.2.5.5 Zentrale Wachstumskegel

Es zeigte sich kein nachweisbarer Unterschied im Vergleich der homozygot defizienten Tiere zu den Wildtypen (Abb. 29, S. 58) in der quantitativ-morphologischen Beurteilung der Wachstumskegel am Tag 14, dem Zeitpunkt der höchsten Dichte an Wachstumskegeln (Abb. 1, S. 5).

2.2.5.6 Astrogliale Reaktion

Die Astrozytenaktivierung lässt sich gut durch den astroglialen Marker GFAP bestimmen. Es wurden je Tier zwei 20µm dicken Schnitte in einem Abstand von ca. 200µm zueinander verwandt. Zu den unterschiedlichen Zeitpunkten betrug die Anzahl Tag 4 $n = 4$ und Tag 14 $n = 14$.

Homozygot nNOS-defiziente Tiere zeigten im Vergleich zu den Wildtyp Tieren im axotomierten Fazialiskern in der Immunhistochemie für den astroglialen Marker GFAP einen minimal verstärkten Nachweis von +3% am Tag 4 und einen verminderten von -7% am Tag 14, die jeweils unsignifikant waren ($P > 0,5$, Student-t-Test, Mittelwert Farbinintensität +/- Standardabweichung SEM) (Abb. 30, oben links, S. 59).

2.2.5.7 Mikrogliale Reaktion

Die homozygot nNOS-defizienten Tiere zeigten im Vergleich zu den Wildtyp Tieren im axotomierten Fazialiskern für den frühen Aktivitätsmarker $\alpha M\beta 2$ eine nicht signifikante, verminderte immunhistochemische Färbung von 30% am Tag 4 und von 6% am Tag 14 ($P > 0,1$ zu beiden Zeitpunkten, Student-t-Test, Mittelwert) (Abb. 30, oben rechts, S. 59). Für MHC1 ergab die immunhistochemische Quantifizierung im Vergleich der Wildtyp Gruppe zu der homozygot nNOS-defizienten Gruppe keinen Unterschied am Tag 4 und eine nicht

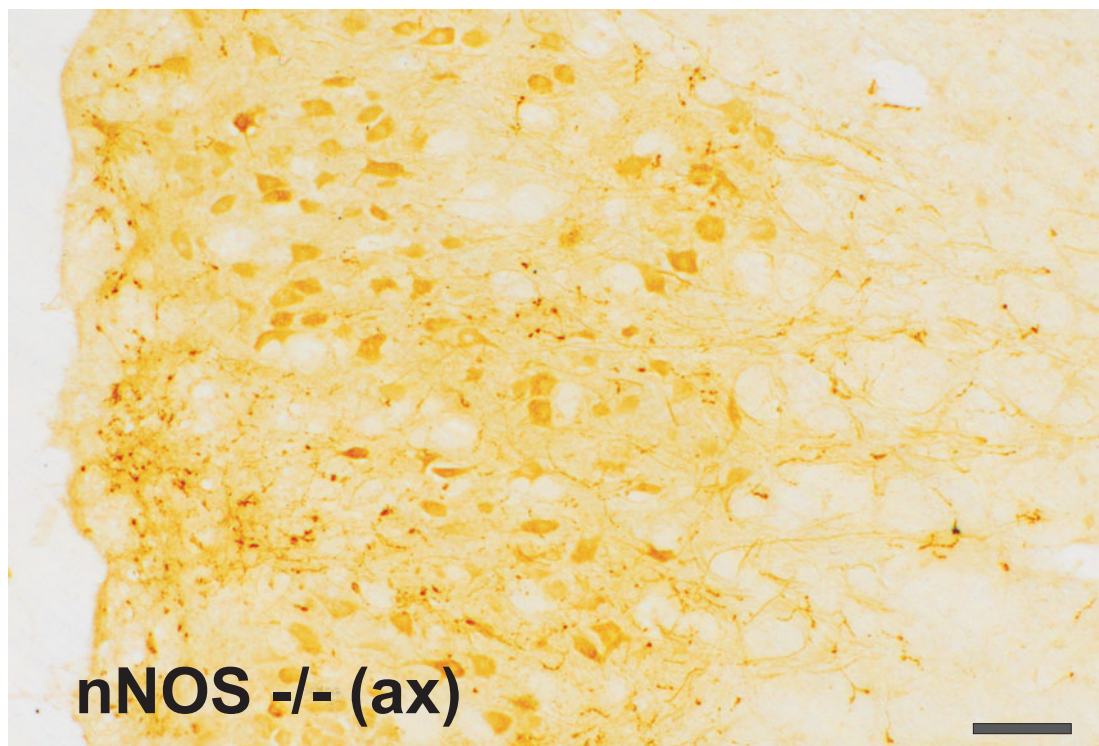
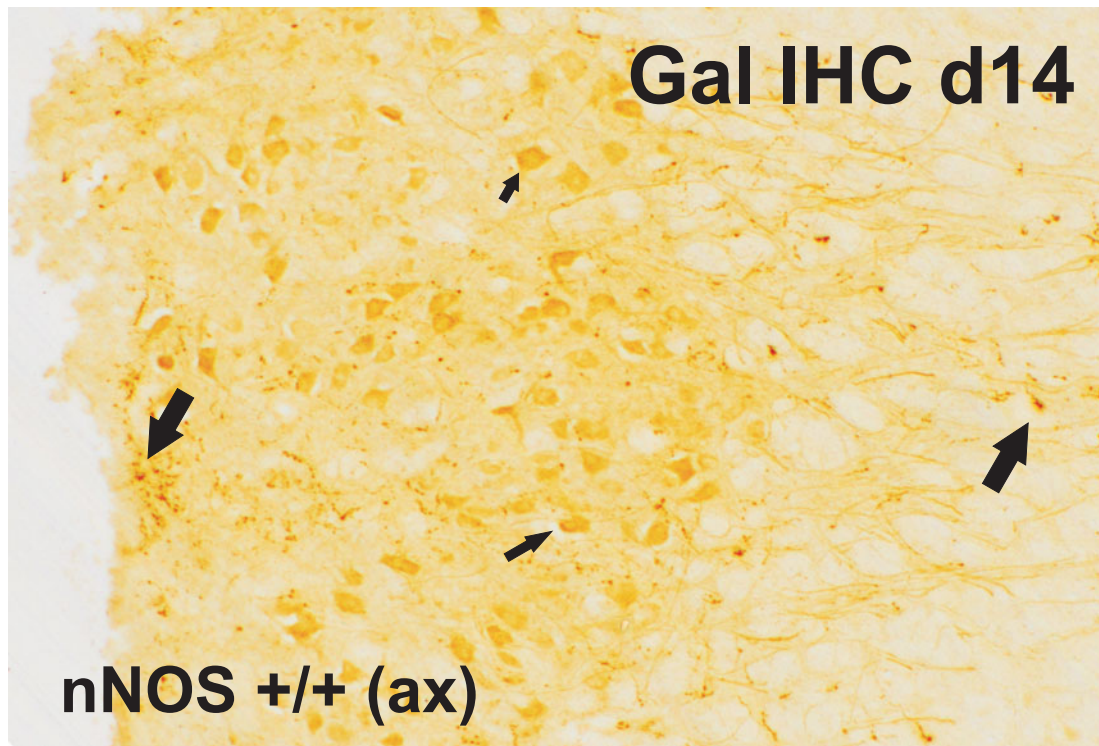


Abbildung 28 Galanin Immunhistochemie im Fazialiskern. Vergleich der zentralen Axonaussprossung der Motoneurone in nNOS+/+ Mäusen mit denen in den nNOS-/- Mäusen 14 Tage nach Fazialisaxotomie. Beachte die deutliche Färbung von Neuronen (kleine Pfeile) und aussprossenden Axonen mit ihren Wachstumskegeln (große Pfeile), diese vor allem perinukleär in der weißen Substanz, hier vor allem ventral des Fazialiskerns. Morphologisch wie quantitativ läßt sich im Hinblick auf die aussprossenden Wachstumskegel kein Unterschied bei nNOS+/+ Mäusen gegenüber nNOS-/- Mäusen erkennen. Maßbalken: 0,1mm

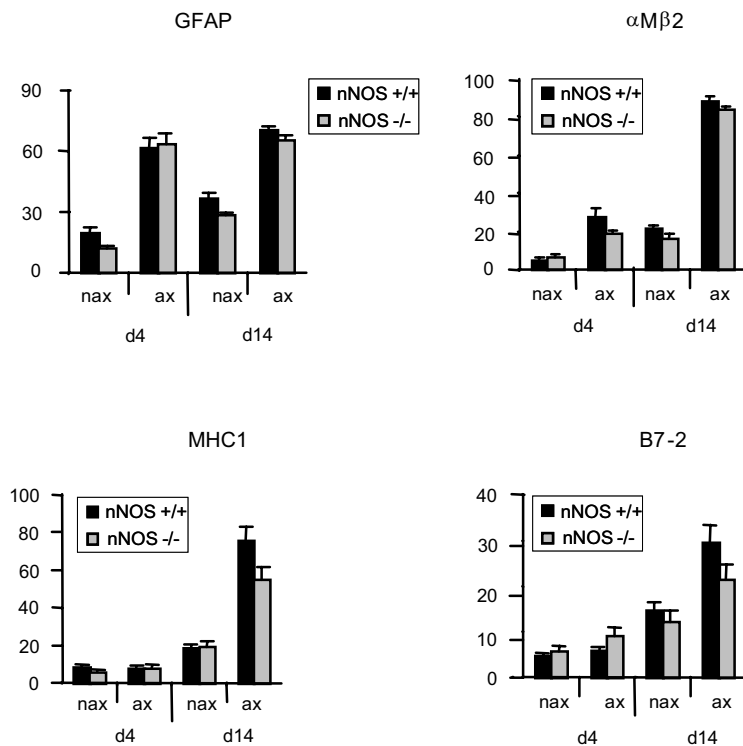


Abbildung 30. Links oben ist die astrogliale Reaktion anhand des Markers GFAP (glial fibrillary acid protein) bei der nNOS Wildtyp-Gruppe (schwarz) im Vergleich zu der nNOS-defizienten Gruppe (grau) nach Axotomie zu den verschiedenen Zeitpunkten dargestellt. Ebenso ist der Vergleich von der operierten (ax) und der unoperierte Seite (nax) gezeigt. Es zeigte sich ein uneinheitliches Bild von nur gering unterschiedlicher immunohistochemischer Färbung für GFAP in den axotomierten Fazialiskernen beider Gruppen am Tag 4 und 14, die jeweils nicht signifikant war. Dies galt auch für die Untersuchung der mikroglialen Marker α M β 2 (rechts oben), MHC1 (links unten) und B7-2 (rechts unten).

Es zeigte sich zu keinem Zeitpunkt ein signifikantes Ergebnis im Vergleich der beiden untersuchten Gruppen nNOS+/+ und nNOS-/. Am Tag 14 zeigten jedoch alle drei mikroglialen Marker einen verminderten, nicht signifikanten immunohistochemischen Nachweis bei n-NOS-/- α M β 2 -6%, MHC1 -30%, B7.2 -27% (Student-t-Test, Mittelwert des immunohistochemischen Intensitätsunterschieds, +/- Standardabweichung des Mittelwertes SEM).

signifikante, um 30% verminderte Quantifizierung am Tag 14 ($P > 0,1$, Mittelwert +/- Standardabweichung SEM) (Abb. 30, unten links, S. 59).

Homozygot nNOS-defiziente Tiere zeigten für B7.2 eine 1,5fach gesteigerte, immunohistochemische Quantifizierung am Tag 4 und eine um 27% verminderte am Tag 14, wobei beide Ergebnisse unsignifikant waren ($P > 0,1$, Mittelwert +/- Standardabweichung SEM) (Abb. 30, unten rechts, S. 59).

Neben der Quantifizierung war auch quantitativ-morphologisch das Auftreten von mikroglialen Knötchen aufzuzeigen, die als „Phagozytose-trupps“ um zugrunde gegangene Neurone gruppiert waren. Die Anzahl von diesen war bei den homozygot defizienten Mäusen zu deren Wildtyp Vergleichsgruppe nicht unterschiedlich, was den indirekten Schluss zulässt, dass die Anzahl der zu Grunde gegangenen Neuronen nicht unterschiedlich war.

Tabellarische Zusammenfassung: Auswirkungen der nNOS-Defizienz

Zelltyp	Zeitpunkt	Veränderung
Axotomierte Motoneurone - axonale Regeneration - zentrales Neuritenauswachsen - CGRP Immunreaktivität - Galanin Immunreaktivität	Tag 4 Tag 14 Tag 14 Tag 14	unverändert unverändert unverändert unverändert
Lymphozyteneinwanderung (in den Fazialiskern)	Tag 4 Tag 14	stark vermindert vermindert (nicht signifikant)
Mikrogliale Reaktion - frühe Phase (state of alert) (α M β 2, MHC1, B7-2) - mittlere Phase (homing) (α M β 2, MHC1, B7-2) - späte Phase (Phagozytose) (α M β 2, MHC1, B7-2)	Tag 4 Tag 14	unverändert (unverändert) vermindert (nicht signifikant)
Astrogliale Reaktion - frühe Phase (GFAP) - späte Phase (GFAP)	Tag 4 Tag 14	unverändert unverändert
Einwanderung in den Fazialisnerv - Granulozyten - Makrophagen	Tag 4 Tag 4	vermehrt (nicht signifikant) vermehrt (nicht signifikant)

Tabellarische Zusammenfassung aller positiven, tlw. signifikanten Ergebnisse

Gen-Defizienz	Zellulär-molekulare Veränderungen	Zeitpunkt	Ausprägungsgrad
IL6	axonale Regeneration	Tag 4	mäßig vermindert
	zentrales Neuritenauswachsen	Tag 4	stark vermehrt
	Galanin Immunreaktivität	Tag 14	stark vermehrt
	Lymphozyteneinwanderung (in den Fazialiskern)	Tag 1 Tag 4 Tag 14	sehr stark vermindert stark vermindert mäßig vermindert
	Mikrogliale Reaktion - frühe Phase (state of alert) (ICAM1, α M β 2, IBA1) - mittlere Phase (homing) (a5b1, a6b1, MCSFR, MHC1)	Tag 1 Tag 4	stark vermindert stark vermindert
Galanin	Granulozyten (in den peripheren Nerv)	Tag 4	vermehrt (nicht signifikant)
CGRP	Lymphozyteneinwanderung (in den Fazialiskern)	Tag 3 Tag 14	vermehrt (nicht signifikant) stark vermehrt
	Granulozyten (in den peripheren Nerv)	Tag 4	vermehrt (nicht signifikant)
	Makrophagen (in den peripheren Nerv)	Tag 4	vermehrt (nicht signifikant)
eNOS	zentrales Neuritenauswachsen	Tag 4	stark vermehrt
	Galanin Immunreaktivität (Neurone)	Tag 14	stark vermehrt
	Lymphozyteneinwanderung (in den Fazialiskern)	Tag 4 Tag 14	vermindert (nicht signifikant) vermindert (knapp nicht signifikant)
nNOS	Lymphozyteneinwanderung (in den Fazialiskern)	Tag 4 Tag 14	stark vermindert vermindert (nicht signifikant)
	Granulozyten (in den peripheren Nerv)	Tag 4	vermehrt (nicht signifikant)
	Makrophagen (in den peripheren Nerv)	Tag 4	vermehrt (nicht signifikant)
	Mikrogliale Reaktion - späte Phase (α M β 2, MHC1, B7.2)	Tag 14	vermindert (nicht signifikant)

3 DISKUSSION

Die Verletzung von peripheren Nerven ruft, wie in der Einleitung beschrieben, eine Vielzahl von zellulären Veränderungen im zentralen Nervensystem hervor. Diese sind bei der anterograden Degeneration des peripheren Nervenabschnittes, bei den retrograd reagierenden Neuronen und schließlich in dem nicht-neuronalen Umfeld, wie der Mikro- und Astroglia und den einwandernden Lymphozyten zu finden. Das verhältnismäßig stereotype Muster dieser Veränderungen wurde am experimentellen Modell des Fazialiskerns der Maus nach Fazialisaxotomie untersucht. Den zellulären Veränderungen liegt ein wohl orchestriertes, interzelluläres Kommunikationsnetzwerk unterschiedlicher Moleküle zu Grunde. Bisherige Untersuchungen konnten zeigen, dass aus der Vielzahl der posttraumatisch hochregulierten Moleküle nicht alle, sondern nur einige davon eine unterschiedlich wichtige Funktion während der einzelnen, voneinander abzugrenzenden Stadien innehaben. Einigen von diesen kommt dabei wiederum eine Schlüsselrolle zu.

Interleukin 6, die Neuropeptide Galanin und CGRP sowie die endotheliale und neuronale Stickoxidsynthetase, sind ebensolche Moleküle, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten in den axonal traumatisierten Motoneuronen des Fazialiskerns der Maus immunhistologisch verstärkt nachweisbar sind. Zusammen mit den vorbeschriebenen Effekten der einzelnen Moleküle (siehe Einleitung) lag die Vermutung nahe, dass ihnen eine Rolle innerhalb der posttraumatischen Signalkaskade zukommen könnte.

Grob zusammengefasst zeigte IL6 wesentlichen Einfluss in der frühen, weniger in der mittleren und späten Phase bei der im weiteren Sinne immunologischen Antwort (Lymphozyten, Mikroglia, Astroglia). Daneben zeigte es einen wachstumsfördernden Einfluss bei der axonalen Regeneration. nNOS zeigte bei der frühen Lymphozyteneinwanderung und CGRP bei der späten Lymphozyteneinwanderung milde Effekte. eNOS-Defizienz führte zu einer verstärkten Immunreaktivität für Galanin und vermehrt nachweisbaren Galanin-positiven Wachstumskegeln. Galanin, mit einem deutlichem Gipfel des immunhistochemischen Nachweises in den Neuronen am Tag 14, zeigte hingegen keinen Einfluss auf die zelluläre Reaktion.

3.1 Das Akutphaseprotein Interleukin 6: seine Bedeutung vor allem in der frühen posttraumatischen Phase

Vorhergehende Studien konnten eine wichtige Rolle von IL6 für die Aktivierung von Astrozyten (Klein et al., 1997a; Penkowa et al. 1999; Raivich et al., 1999a, b; Sugiura et al., 2000) und für das Überleben sensorischer Neurone zeigen (Murphy et al., 1999a; Zhong et al., 1999). Daneben ließ sich sein Einfluss auf die Expression von Neuropeptiden in

verletzten Neuronen nachweisen (Klein et al., 1997a; Murphy et al., 1999b). IL6 wird nach Trauma sowohl im peripheren als auch im zentralen Nervensystem rasch exprimiert (Kiefer et al., 1993a; Bolin et al., 1995; Klein et al., 1997; Murphy et al., 1999a; Legos et al., 2000). Mit seiner frühen Expression rückt es in eine zentrale strategische Position, die posttraumatischen zellulären Veränderungen mit zu bestimmen.

3.1 Interleukin 6-Defizienz: Bedeutung für die Lymphozyteneinwanderung

Die durch IL6 induzierten Veränderungen sind bei den unterschiedlichen Zellpopulationen vielfältig. Wie die hier vorliegenden Ergebnisse zeigen, ist IL6 ein starker Stimulus für die zweiphasige Lymphozyteneinwanderung um die Tage 1-4 und den Tag 14 (Raivich et al., 1998a, b). Die Einwanderung von Lymphozyten in den posttraumatischen Fazialiskern während der frühen Phase der Lymphozytenrekrutierung ist in den IL6-defizienten Tieren nahezu komplett unterbunden. IL6-Defizienz führt zu einer drastisch verminderten T-Lymphozyteneinwanderung (-90%) am Tag 1 und immer noch zu einer 2,5-fach verminderten Einwanderung am Tag 14. Dies unterstreicht die Bedeutung von IL6 als Lymphozytenstimulus (Hirano et al., 1986; Lotz et al., 1988). Die Ergebnisse stimmen zudem zeitlich mit der frühen Hochregulierung von IL6 in den ersten 48 Stunden nach Trauma überein und unterstreichen seine Bedeutung als ein früh immunaktivierendes Zytokin (Kiefer et al., 1997; Klein et al., 1997a; Legos et al., 2000).

Es ist der Einwand zu bedenken, dass die Abwesenheit von IL6 im Gesamtorganismus IL6-defizienter Tiere die Aktivierung von T-Lymphozyten vermindern könnte, bevor sie in das ZNS einwandern. Dagegen spricht allerdings, dass die unterschiedliche Anzahl rekrutierter T-Lymphozyten zu verschiedenen Zeitpunkten und der mangelnde Effekt auf die Einwanderung in die ungeschädigte kontralaterale Seite, klar auf die Bedeutung von IL6 für die Lymphozyteneinwanderung in die verletzte Gehirnregion verweisen.

3.1.2 Interleukin 6-Defizienz: Bedeutung für die Mikrogliaaktivierung

Die meisten frühen und mittelfristigen Aktivierungsmarker waren bei den IL6-defizienten Tieren in der immunhistochemischen Intensität reduziert. Dazu zählen IBA1, ICAM1, MCSF Rezeptor, MHC1 und die Integrine $\alpha6\beta1$ und $\alpha5\beta1$. Ebenso war eine etwas geringere mikrogliale Proliferation während der frühen und mittleren Phase der Aktivierung der Mikroglia nachzuweisen (Klein et al., 1997a), was eine mäßig verminderte mikrogliale Zelldichte zur Folge hatte. Unserer Beobachtung entsprechend führte IL6 bei in vitro Versuchen zu einem stimulierenden Effekt (+ 35%) bei ramifizierter Mikroglia, die auf Astrozytenboden kultiviert wurde (Kloss et al., 1997) sowie auch bei reinen Mikrogliaulturen (Streit et al., 2000). Dieser Effekt ist moderat im Vergleich zu dem, der durch die Hinzugabe klassischer mikroglialer Mitogene wie MCSF, GMCSF und IL3 erzielt wurde und der mit einer

bis zu sechsfach stärkeren Proliferation am stärksten bei MCSF nachweisbar war (Kloss et al., 1997). Wie in vorhergehenden Studien gezeigt werden konnte, ist bei MCSF-defizienten Mäusen die mikrogliale Proliferation vollkommen unterbunden (Raivich et al., 1994b; Berezovskaya et al., 1995). Die Verminderung des mikroglialen MCSF Rezeptors um mehr als 50%, die in unserem Versuchsmodell nachgewiesen wurde, kann deswegen zu einem indirekten, hemmenden Effekt bei der posttraumatischen mikroglialen Proliferation führen. Das Fehlen der IL6 Rezeptoren auf der Mikroglia in vivo (Klein et al., 1997a) und die starke Expression des MCSF Rezeptors auf der Mikroglia (Raivich et al., 1998a; Kalla et al., 2001) unterstützen die Hypothese eines indirekten Signalweges.

Dagegen zeigte die IL6-Defizienz keine Auswirkungen auf die späte mikrogliale Aktivierung am Tag 14, die durch den immunhistochemischen Nachweis von MHC1 und B7-2 belegt ist. Dies ist besonders bemerkenswert für MHC1, für das am Tag 4 eine mehr als 60%ige Reduktion zu beobachten war. IL6-Defizienz hatte keinen Einfluss auf den mehr als zweifachen Anstieg von MHC1 am Tag 14. Dies trifft auch auf die Bildung von mikroglialen Knötchen und ihre sehr starke Expression von MHC1 und B7-2 zu, so dass zusätzliche proinflammatorische Stimuli angenommen werden müssen. Dabei kommen vor allem IL1-beta, TNF-alpha und Interferon-gamma in Frage. Wie die Arbeiten von Bohatschek zeigen, beruht dies vor allem auf Signalwegen, die über den TNF Rezeptor Typ 1 laufen (Bohatschek et al., 2004a, b; siehe auch Raivich et al., 2002a, b, 2003; Liu et al., 2005)

3.1.3 Interleukin-6-Defizienz: Bedeutung für die Astrogliaaktivierung

IL6-Defizienz führt bei der Astroglia zu einer starken Reduktion von 80% in der Ausbildung stellarer Formationen (Klein et al., 1997a; Penkowa et al., 1999). Diese kommen sonst häufig ab dem Tag 3 vor (Graeber und Kreutzberg, 1988a). Damit geht einher, dass die Anzahl von 30-60µm großen, diffus GFAP-positiven, runden Formationen deutlich reduziert ist. Diese sind sonst in voller Ausprägung vor allem ab dem Tag 7 zu sehen (Raivich et al., 1999a, b). IL6 ist damit an der Umwandlung in sternförmige Astrozyten und an der Ausbildung des astroglialen Narbengewebes durch die Aktivierung und die regelrechte intrazelluläre Verteilung der zytoskeletalen Proteine, vor allem des GFAP, beteiligt. GFAP und Vimentin sind wesentliche Elemente bei der reaktiven Gliose, die dem Gewebe Stabilität, Erhalt der Blut-Hirn-Schranke und protektive Abgrenzung verleiht (Eliasson et al., 1999; Raivich et al., 1999a; Lepekin et al., 2001). Geht man von IL6 und seiner Funktion als ein frühes Aktivierungszytokin des Immunsystems aus, so liegt es nahe, dass es auch auf der Ebene der Parenchym-Architektur in der frühen Phase schützende Funktion ausübt.

3.1.4 Interleukin-6-Defizienz: Bedeutung für die neuronale Reaktion

Der Einfluss der IL6-Defizienz auf die Motoneurone war relativ gering. Das Ausmaß axonaler Regeneration am Tag 4 war bei den Galanin-immunreaktiven Motoneuriten um 14% reduziert und bei den CGRP-immunreaktiven um 12%. Ebenso war das spätere perineuronale Auswachsen um den Tag 14 vermehrt für Galanin-positve, nicht aber für CGRP-positve Wachstumskegel. Eine Erklärung für das vermehrte Regenerationsgeschehen kann die teils stark verminderte astrogliale Narbenbildung bei IL6-Defizienz sein (Klein et al., 1997a, Penkowa et al., 1999), da eine Verminderung der Gliose axonales Aussprossen erleichtert (Menet et al., 2000; Moon et al., 2000).

Hingegen war kein Effekt auf die neuronale Überlebensrate zu sehen. Die lediglich leichte Tendenz zu etwas geringerem neuronale Zelltod (-3%) bei den IL6-/- Mäusen war nicht signifikant. In axotomierten sensorischen Neuronen ist der Zelltod bei IL6-/- Tieren um 13% vermehrt (Murphy et al., 1999a, b). In einem Ischämiemodell des Vorderhirns kommt es zu keinem Unterschied der Rate neuronalen Zelltods bei IL6 defizienten Tieren (Clark et al., 2000). Dies steht im Gegensatz zu beobachteten protektiven Effekten von IL6 für postischämische Vorderhirnneurone oder axotomierte Motoneurone, das in vivo (Ikeda et al., 1996; Loddick et al., 1998) oder in vitro (Ali et al., 2000) appliziert worden ist. Ebenso verursacht eine kombinierte, transgene Überexpression des IL6 und seines Rezeptors eine raschere Reinnervation des peripheren Ziels im regenerierenden Hypoglossusmodel (Hiorata et al., 1996).

Die Auswirkungen der IL6-Defizienz auf Lymphozyten, Mikroglia und Astrozyten unterstreichen die Hypothese, dass IL6 eine starke Rolle in der Initiierung der Immunantwort im axotomierten Fazialiskern innehat. Dagegen waren die rein neuronalen und axonalen Auswirkungen vergleichsweise mild. All dies legt nahe, dass endogenes IL6 eher daran beteiligt ist, die Ausbreitung potentieller Infektionen zu verhindern als neuronale Regeneration zu ermöglichen.

3.2 Die Neuropeptide Galanin und CGRP sowie die endotheliale und neuronale Stickoxidsynthetase: geringe posttraumatische Bedeutung

3.2.1 Galanin-Defizienz: kein Einfluss auf das posttraumatische Geschehen

Das Neuropeptid Galanin lässt sich nach Fazialisaxotomie in Motoneuronen immunhistochemisch am stärksten am Tag 14 nachweisen. Es definiert gegenüber den CGRP-positiven Neuronen eine von diesen abgegrenzte Motoneuronen-Population (Moore et al., 1989). Entsprechend ist es am Tag 4 für eben diese definierte Motoneuronen-

Population in den auswachsenden, regenerierenden Axone und am Tag 14 in den auswachsenden, perineuronalen Wachstumskegeln nachweisbar (Werner et al., 1999; Bird et al., 2003). Deswegen lag die Vermutung nahe, dass Galanin eine Rolle in der posttraumatischen Regeneration innehaben könnte, wie es für andere Bereiche des ZNS beschrieben worden ist (Mahoney et al., 2003). Mit dem Gipfel der Nachweisbarkeit am Tag 14 konnte auch über einen Einfluss auf die vor allem späte Phase der Immunantwort spekuliert werden. Galanin zeigte allerdings in den hier durchgeführten Untersuchungen posttraumatisch keine Auswirkungen auf die Immunantwort oder auf das Regenerationsverhalten.

Das Überleben von Motoneuronen am Tag 30 ist bei Galanin-defizienten Tieren gegenüber der Wildtyp-Vergleichsgruppe mit einem neuronalen Zelltod von ca. 30% unverändert. Demgegenüber zeigten axotomierte sensorische Neurone bei Galanin-Wildtyp-Tieren eine bessere Überlebensrate verglichen mit den Galanin-defizienten Mäusen. Dies geht einher mit einer 2,6 - 2,8fach geringeren neuronalen Apoptose-Rate postnatal im Wildtyp gegenüber Galanin-defizienten Tieren (Holmes et al., 2000). Diese neuroprotektive Wirkung von Galanin konnte in unserem Versuchsaufbau für die motorischen Neurone des Fazialiskerns nicht nachgewiesen werden.

Der immunhistochemisch gegen Galanin gefärbte Zeitverlauf der auswachsenden Axone mit einem deutlichen Gipfel am Tag 14 verwies ebenso auf die zumindest immunhistochemisch dominante Präsenz dieses Neuropeptids in den Wachstumskegeln. Ein Unterschied in der Quantität der aussprossenden Wachstumskegel am Tag 14 nach Trauma im Vergleich von Galanin-defizienten zu Wildtyp-Tieren war jedoch nicht nachweisbar.

In vitro Versuche zeigten ein deutlich vermindertes Neuritenwachstum bei Galanin-defizienten sensorischen Neuronen in Zellkultur, beziehungsweise ein vermehrtes Neuritenwachstum bei Zugabe von Galanin in Zellkultur sensorischer Neurone, was die regenerationsfördernde Wirkung von Galanin belegt (Holmes et al., 2000; Mahoney et al., 2003). Dabei scheint dieser Effekt von Galanin wesentlich von GalR2 abzuhängen (Holmes et al., 2000; Mahoney et al., 2003). Wenn Galanin an GalR1 und GalR3 bindet, hemmt es die Adenylat-Zyklase. Bindet Galanin an GalR2, aktiviert es die Phospholipase C mit nachfolgender Steigerung des Inositoltriphosphat-Umsatzes (Wang et al., 1998). GalR2 und auch dessen Hochregulierung im Fazialiskern nach Axotomie ist beschrieben (Burazin et al., 1998; O'Donnell et al., 1999). Ein eventuell verzögerter Regenerationseffekt bei Galanin-defizienten Mäusen im Vergleich zum Wildtyp war jedoch zumindest für die CGRP positiven Neuriten nicht nachweisbar.

Die Immunantwort ist bei den homozygot defizienten Tieren im Vergleich zu den Wildtypen ebenfalls unverändert. Dies beinhaltet sowohl die Einwanderung von T-Lymphozyten im

Fazialiskern als auch die der Makrophagen und Granulozyten im peripheren Nerv, an der Quetschungsstelle und distal davon.

Auch die Induktion von Aktivierungsmarkern der Mikroglia der frühen und mittleren Phase wie $\alpha 5\beta 6$ und MHC1 und der späten Phase MHC1 und B7.2 war bei den Galanin-defizienten Tieren gegenüber den Wildtyp Tieren unverändert. Ebenso blieb die Bildung der mikroglialen Knötchen durch die Galanin-Defizienz unbeeinflusst. Dies trifft ebenso für die Astrozyten zu, die weder in ihrer Morphologie noch in der Induktion des zytoskelettalen Proteins GFAP Unterschiede zeigten, wohingegen bei in vitro Versuchen ein aktivierender Effekt von Galanin auf Astrozyten durch Induktion von mRNA früh aktivierten Faktoren (c-fos, junB und Tis11) beobachtet wurde (Priller et al., 1998). Die signifikanten Ergebnisse am Tag 7 für GFAP, am Tag 14 für $\alpha M\beta 2$, am Tag 7 für MHC1 und am Tag 14 für B7-2 sind vor dem Hintergrund der im Zeitverlauf uneinheitlichen immunhistochemischen Reaktion als zufällig signifikant einzuschätzen. Diese Ergebnisse haben keinen Einfluss auf die Einschätzung, dass Galanin für die Regulation der jeweiligen Marker keine Bedeutung hat.

3.2.2 CGRP-Defizienz: Einfluss auf das posttraumatische Immungeschehen

Das Neuropeptid CGRP weist nach Fazialisaxotomie sein Maximum des immunhistochemischen Nachweises um den Tag 3 in einer von den Galanin positiven Neuronen unterschiedlichen Neuronenpopulation auf (Moore et al., 1989). Wie bei Galanin ist CGRP am Tag 4 nach Fazialisaxotomie immunhistochemisch in den aussprossenden Motoneuriten und am Tag 14 in den Wachstumskegeln nachweisbar (Werner et al., 1999; Bird et al., 2003). Als Neuropeptid, das vor allem in der frühen Phase nach Trauma hochreguliert wird, lag die Vermutung nahe, dass CGRP Einfluss auf die Reparaturmechanismen und die immunologische Antwort in der frühen Phase nimmt.

Tatsächlich führt die CGRP-Defizienz zu einer erhöhten Lymphozyteneinwanderung sowohl am Tag 3 wie auch am Tag 14. Dieser Befund stimmt mit der vorbeschriebenen immunsuppressiven Wirkung von CGRP überein (Wang et al., 1992; McGillis et al., 1993; Richter et al., 1992; Jansen et al., 1999; Liu et al., 2000). Mit seinem Maximum zwischen Tag 3 und Tag 7 liegt CGRP am Ende der frühen Phase und reicht in die mittlere Phase der zellulären Reaktion. Das kann die Auswirkung auf die frühe und die späte Phase der immunologischen Antwort erklären.

Die immunsuppressive Wirkung von CGRP zentral im Fazialiskern zeigte sich als Tendenz auch am peripheren Nerv. Hier führte CGRP-Defizienz an der Quetschungsstelle bei Makrophagen zu einer um 30% und bei Neutrophilen zu einer um 25% vermehrten Einwanderung. Die weiter distal gelegenen Messpunkte (2mm und 4mm) zeigten keinen Unterschied zum Wildtyp. Die Befunde waren untereinander konsistent und lagen knapp an der 5% Signifikanzschwelle.

Es ist zu spekulieren, ob CGRP die immunologische Antwort herabsetzt und so eine überschießende immunologisch-autodestruktive Reaktion dämpft, die eine erfolgreiche Regeneration eventuell verhindern würde. Diese protektive Wirkung würde auch zu einer anderen hier gemachten Beobachtung passen, dass die in vitro beschriebene vermehrte Astroglie, die bei der Applikation von CGRP zu beobachten war (Haas et al., 1991a, b, c; Lazar et al., 1991), in vivo im Fazialismodell nicht bestätigt werden konnte. Ein regenerationshemmender Effekt von CGRP, der durch eine vermehrte Astroglie entstünde, ist somit nicht zu sehen.

CGRP-Defizienz zeigte ebenso keinen Effekt auf die mikrogliale Antwort, weder in der frühen noch in der späten Phase. Ein verändertes mikrogliales Verhalten wäre zu erwarten gewesen, nachdem ein deutlicher Effekt von CGRP auf die Lymphozytenrekrutierung gezeigt werden konnte und posttraumatisch eine enge lymphozytär-mikrogliale Interaktion vorliegt. Allerdings ergab sich bei der quantitativen Immunhistochemie kein Unterschied bei den frühen, mittleren und späten Aktivierungsmarkern ($\alpha 5\beta 6$ – früh-, MHC1 und B7.2 – mittlere und späte Phase). Quantitativ wie morphologisch-deskriptiv zeigte sich auch kein Unterschied bei den um den Tag 14 auftretenden mikroglialen Knötchen in den beiden Vergleichsgruppen.

Kein Unterschied zeigte sich bei den Motoneuronen im Vergleich der CGRP-defizienten und der Wildtyp Vergleichsgruppe. Die Morphologie und die immunhistochemische Quantifizierung der Galanin-positiven Motoneurone, die Anzahl der aussprossenden Wachstumskegel am Tag 14 und die Regenerationsgeschwindigkeit des auswachsenden Fazialisnerven am Tag 4 - beides gegen Galanin gefärbt - waren alle unverändert. Allerdings lässt die Immunhistochemie gegen Galanin keine Aussage über die Auswirkung der CGRP-Defizienz auf die CGRP-positiven Motoneurone zu (Moore et al., 1989).

Dieser wiederholte Hinweis ist wichtig, denn wie es auch in unserem Versuchsaufbau bestätigt werden konnte, ist CGRP in hohem Maße während der Reinnervationsphase der muskulären Endplatte nach Trauma exprimiert (Borke et al., 1993). Zudem scheint CGRP durch Steigerung des cAMP's in Schwannschen Zellen einen indirekt mitogenen Effekt durch Steigerung des fibroblast growth factors (FGF) und des platelet-derived growth factors (PDGF) zu haben und somit an dem Regenerationsgeschehen beteiligt zu sein (Raivich et al., 1992). Die hier gewonnenen Ergebnisse könnten darauf verweisen, dass CGRP lediglich eines von mehreren synergistisch an der Stimulation der Schwannzellen bzw. Interaktion der auswachsenden Neuriten und der Schwannzellen beteiligten Molekülen ist. Dabei kommen eine Reihe anderer Substanzklassen in Frage wie Integrine (Kloss et al., 1999; Condic und Letourneau, 1997; Werner et al., 2000), Cadherine, Zelladhäsionsmoleküle (Seilheimer und Schachner, 1988; Doherty et al.; 1990; Martini 1994) und Laminine (LeBeau et al., 1994; Ide et al., 1996; Agius und Cochard, 1998).

3.2.3 eNOS-Defizienz: Einfluss auf die posttraumatische neuronale Reaktion

Die endotheliale Stickoxidsynthetase (endothelial Nitric Oxide Synthase, eNOS) zeigt im neuronalen Bereich Einfluss auf die immunhistochemische Quantität von Galanin. Dies lässt sich bei eNOS-defizienten Tieren verglichen mit den eNOS+/+ Kontrollen deutlich vermehrt im axotomierten Fazialiskern am Tag 14 nachweisen. Dieser Befund stimmt mit einer stark gesteigerten Anzahl von Galanin-positiven Wachstumskegeln am Tag 14 überein. Allerdings muss dieses Ergebnis vorsichtig interpretiert werden, da die verstärkte, immunhistochemische Intensität von Galanin bei eNOS-defizienten Tieren die Galanin-positiven Wachstumskegel besser kenntlich macht. So könnte es zu einem falsch positiven Ergebnis kommen, weil relativ mehr Wachstumskegel erfasst werden, ohne dass deren Anzahl absolut gesehen tatsächlich erhöht wäre.

Interessanterweise führte das Fehlen von eNOS zu keinem Einfluss auf die immunhistochemische Quantität von CGRP. Genausowenig hatte eNOS-Defizienz Einfluss auf die Wachstumsgeschwindigkeit der regenerierenden Motoraxone.

Die im weiteren untersuchten posttraumatisch zellulären Reaktionen im Fazialiskern nach Fazialisaxotomie blieben ebenso unverändert. So zeigte sich bei eNOS Defizienz zwar kein signifikanter Einfluss im Sinne einer vermehrten Einwanderung von T-Lymphozyten, weder in der frühen noch in der späten Phase, was zu dem bekannten leukozytenhemmenden Effekt in gewissem Gegensatz steht (Lefer et al., 1999; Sanz et al.; 2001, Altay et al., 2004). Hingegen konnte beobachtet werden, dass parallel zu dem signifikanten Ergebnis der verminderten T-Lymphozyteneinwanderung bei nNOS-/- (s.u.) es am Tag 4 und am Tag 14 zu einer deutlich verminderten, jedoch unsignifikanten T-Lymphozyteneinwanderung kommt. Keinerlei Einfluss war auf die Einwanderung von Makrophagen und Granulozyten am Tag 4 nach Fazialisquetschung an der Quetschstelle selbst, 2mm und 4mm distal davon zu sehen, obwohl eNOS in hoher Konzentration in den vasa vasorum des Nervstumpfs exprimiert ist (Gonzalez-Hernandez et al., 1999).

Der immunhistochemische Nachweis von GFAP in den Astrozyten und die morphologische Veränderung der Astrozyten in ihre aktivierte stellare Form waren in den beiden Vergleichsgruppen zu allen Zeitpunkten ohne Unterschied. Ebenso wenig waren die Morphologie der Mikroglia und der dort geführte immunhistochemische Nachweis der mikroglialen Marker α 5 β 6 und MHC1 für die frühe und MHC1 und B7.2 für die späte Phase im Vergleich der beiden Gruppen verändert. Bezüglich der Mikroglia in ihrer Anzahl, Dichte und Morphologie zeigte sich ebenso kein Unterschied. Dabei ist für eNOS eine Migrationshemmung der Mikroglia beschrieben (Chen et al., 2001).

3.2.4 nNOS-Defizienz: Einfluss auf das posttraumatische Immungeschehen

nNOS-Defizienz zeigte am Tag 4 eine stark verminderte und am Tag 14 eine immerhin noch leicht verminderte Einwanderung der CD3-positiven T-Lymphozyten. Dies steht im Widerspruch zu der beschriebenen hemmenden Wirkung von nNOS auf die Lymphozytenmigration (Lefer et al., 1999; Sanz et al., 2001), passt jedoch gut zu Ergebnissen, die eine proinflammatorische, leukozytenmigrationsstimulierende Wirkung von nNOS zeigte (Altay et al., 2004). Dahingegen zeigte sich bei nNOS-Defizienz eine vermehrte Einwanderung von Granulozyten von 32% an der Quetschungsstelle, 42% 2mm und 28% 4mm distal davon, wobei diese Ergebnisse sich knapp oberhalb des 5% Signifikanz-Niveaus befanden. Ein ähnliches Ergebnis war bei den Makrophagen festzustellen. Diese unterschiedlichen Ergebnisse unterstreichen die unterschiedliche Wirkung von NO auf unterschiedliche Leukozytenpopulationen.

Die Defizienz der neuronalen Stickoxidsynthetase zeigte im neuronalen Bereich keinen Unterschied in der immunhistochemischen Quantität für die beiden Neuropeptide CGRP und Galanin. Auch die Wachstumsgeschwindigkeit, gemessen am Tag 4, und die Anzahl der aussprossenden Wachstumskegel am Tag 14 waren unverändert.

nNOS-Defizienz hatte ebenso keine Einfluss auf die Astrozyten bezüglich ihrer Morphologie und des immunhistochemischen Nachweises von GFAP. Die Morphologie der Mikroglia und der immunhistochemische Nachweis der mikroglialen Marker $\alpha 5\beta 6$ und MHC1 für die frühe und MHC1 und B7.2 für die späte Phase waren ebenso unverändert. Bezüglich der Mikrogliaknötchen in ihrer Anzahl, Dichte und Morphologie zeigte sich ebenfalls kein Unterschied.

3.3 Zusammenfassung

Die in der Einleitung ausführlich beschriebenen, zentral zellulären Veränderungen zielen vor allem auf die regenerativen und degenerativen Veränderungen der Neurone und auf die Stimulation des Immunsystems (Mikroglia, Leukozyten und Astroglia). Dieser Prozess nimmt seinen Anfang in den verletzten Neuronen. Die die Neurone umgebende Neuroglia und deren Interaktion mit in den indirekt verletzten Fazialiskern eingewanderten immunkompetenten Zellen unterhält im weiteren das posttraumatische Geschehen.

Während der ersten frühen Phase schwellen die Neurone an, die Axone degenerieren. Die aktivierte Mikroglia sucht ihr Umfeld nach rekrutierten T-Zellen, gebundenen Antikörpern und aufzunehmenden Antigenen ab. Dies ist möglich durch neu exprimierte Rezeptoren für Immunglobuline, Komplement und Lymphozytenantigene. Daran schließt sich die Adhäsion von Mikroglia an die Zellkörper der verletzten Neurone an. Die Mikroglia exprimiert zeitgleich MHC1, was eine Schlüsselrolle in der Antigenpräsentation innehat. Die Anlagerung der Mikroglia an die Nervenzellkörperoberfläche platziert sie in eine strategisch günstige

Position, um lösliche Moleküle aufzunehmen, die von den verletzten Neuronen abgegeben werden. Daran schließt sich die intrazelluläre Aufarbeitung und Präsentation von Molekülen an die aktivierten T-Lymphozyten an, die in das zentrale Nervensystem eingewandert sind. Die morphologischen Veränderungen der aktivierten Mikroglia, das Schwellen des Zellkörpers und die Proliferation lysosomaler Organellen in der Nähe der Neurone unterstützen diesen Prozess. Die astrogliale Antwort verstärkt die physikalische Stabilität des geschädigten Gewebes.

IL6 hat eine Schlüsselrolle zu Beginn und im frühen Verlauf der Immunantwort. Die Abwesenheit von IL6 ist mit einer mäßig verminderten Geschwindigkeit der axonalen Regeneration, mit einer verminderten astroglialen und mikroglialen Antwort, einer verminderten Lymphozytenrekrutierung und einem verstärkten, späten perineuronalen Aussprossen der Galanin-positiven Neuriten verbunden. Diese zellulären Effekte sind jedoch alle in unterschiedlichem Ausmaß zu beobachten. IL6-Defizienz hat im Besonderen eine starke immunologische Wirkung hinsichtlich einer verminderten Lymphozytenrekrutierung zu den frühen Zeitpunkten (Tag 1 und Tag 4) und einer verminderten mikroglialen Aktivierung. Durch diese Ergebnisse konnte die bestimmende Rolle von IL6 in der Initiierung der immunologischen Antwort im verletzten zentralen Nervensystem erneut hervorgehoben werden.

Von den anderen hier untersuchten neuronalen Molekülen, die nach Fazialisaxotomie ein zeitlich spezifisch gesteigertes, immunhistochemisches Muster haben, wies lediglich nNOS Defizienz in der frühen Phase eine deutliche Verminderung der T-Lymphozytenrekrutierung und eine unsignifikante leichte Verminderung am Tag 14 auf. Ähnlich zeigte auch eNOS in der frühen und in der späten Phase eine jedoch unsignifikante verminderte Einwanderung von Lymphozyten. CGRP-Defizienz zeigte das Gegenteil mit einer deutlich vermehrten Rekrutierung in der frühen Phase am Tag 3 wie auch am Tag 14. Auswirkungen auf die mikrogliale oder astrogliale Aktivierung zeigten sich nicht. Keine Effekte auf die immunologische Antwort zeigten das Neuropeptid Galanin.

So ließe sich nNOS (und in geringem Maß eNOS) bzw. das von diesen gebildete Stickstoffmonoxid (NO) als immunstimulierender Faktor neben IL6 interpretieren. Die Aktivität von nNOS (und eNOS) ist ebenso wie IL6 zu einem frühen Zeitpunkt nachweisbar. Deswegen kann NO als rasch hochkonzentriert vorhandenes Molekül Einfluss auf die frühe Phase der Immunantwort nehmen. Somit sind die neuronale Stickoxidsynthetase, in geringerem Maße die endotheliale Stickoxidsynthetase und das von ihnen gebildete NO zusätzliche Moleküle, die das zentrale Nervensystem in den ersten Tagen nach Trauma schützen. Durch ein rasch stimuliertes Immunsystem können weitere Schäden durch Ausbreitung möglicher Pathogene vermieden werden.

Anders lässt sich hingegen die Rolle von CGRP interpretieren. Als Neuropeptid ist der erste Gipfel seiner Expression um die Tage 3 bis Tag 7. Die immunsuppressive Wirkung kann als neuronaler Schutz vor einer überschießenden Immunantwort gedeutet werden. Die schon zu einem frühen Zeitpunkt deutliche, jedoch noch unsignifikante vermehrte Lymphozytenrekrutierung in CGRP-defizienten Tieren, die am Tag 14 signifikant wird, zeigt größte Wirkung in der Phase des Beginns des neuronalen Zelltods. Eine überschießende Immunantwort kann zu vermehrtem neuronalen Zelltod führen. CGRP scheint diese abzumildern. Mikroglia, eng interagierend mit Lymphozyten, bilden um geschädigte Neurone sog. Mikrogliaknötchen, die, im Auswahlmuster noch unverstanden, Teile der Population der geschädigten Neurone phagozytieren. Gegenseitige Immunstimulierung (Mikroglia–T-Lymphozyten) könnte zu einer überschießenden Immunantwort mit einer vermehrten Phagozytose geschädigter Neurone führen. Eine Quantifizierung der überlebenden Neurone am Tag 30 wäre die adäquate Methode, um dieser Spekulation gerecht zu werden. Eine gewisse Entkräftung dieser Vermutung ist die Tatsache, dass die Anzahl von Mikrogliaknötchen am Tag 14 bei den CGRP-defizienten Tieren im Vergleich zur Wildtyp-Gruppe unverändert ist. Dies lässt eine vorsichtige Extrapolation auf das Ausmaß des zu erwartenden neuronalen Zelltods zu, der damit unverändert zum Wildtyp wäre.

Von den hier untersuchten Substanzen führten IL6-Defizienz und eNOS-Defizienz zu deutlich vermehrtem Aussprossen von Wachstumskegeln. Zusätzlich zeigte sich bei beiden eine vermehrte Nachweisbarkeit in der immunhistochemischen Quantifizierung für Galanin am Tag 14. Während IL6-Defizienz die mikrogliale und astrogliale Reaktion vermindert und auch zu einer verringerten Astrogliose führt, war dieses Phänomen bei e-NOS nicht zu beobachten.

Astroglia kann im Rahmen der Aktivierung durch Astrogliose das Auswachsen von regenerierenden Axonen verhindern. Damit, so die These, kann zugleich die mögliche Ausbreitung pathogener Keime und toxischer Substanzen entlang auswachsender Axone oder durch einwandernde nichtneuronale Zellen verhindert werden. Die niedrigere Dichte auswachsender Axone in der grauen Substanz des Fazialiskerns, verglichen mit den intranukleären und perinukleären Arealen weißer Substanz, würde die These der astroglialen Reaktion der grauen Substanz und ihren inhibitorischen Effekt unterstützen. Die Verhinderung des axonalen Auswachsens kann als rationale Strategie gedeutet werden, drohende Infektionen zu vermeiden. Demgegenüber steht die Notwendigkeit einer erfolgreichen axonalen Regeneration als Bedingung für eine wiederhergestellte neurologische Funktion. Diese wird durch jenen Schutzmechanismus zum Teil verhindert.

Trotz der Relativität aller experimentellen Modelle im Sinne ihrer Übertragbarkeit, hier z.B. auf das gesamte ZNS, haben diese Ergebnisse wichtigen Aussagewert. Als in vivo Modell lassen sich die Effekte gegenüber in vitro Untersuchungen im natürlichen Milieu aufzeigen. Unter anderem deswegen sind die hier vorliegenden Ergebnisse ein weiterer wichtiger Schritt im Verständnis der Orchestrierung interzellulärer Signalkaskaden im posttraumatischen ZNS. Dabei konnte vor allem für Interleukin 6 eine entscheidende Rolle in der frühen Phase der zellulären Reaktion erkannt werden. Auch die vereinzelt Effekte von CGRP, nNOS und eNOS müssen als weitere wichtige Aspekte im Verstehen des komplexen Ablaufs gedeutet werden. Gerade die Beteiligung an der lymphozytären Rekrutierung in der frühen Phase (nNOS) bzw. die Unterdrückung lymphozytärer Einwanderung in der späten Phase (CGRP) sind bei der engen Interaktion von Lymphozyten und Mikroglia/ Astroglia und deren möglicher Auswirkung für das neuronale Überleben und die axonale Regeneration von Bedeutung. Ebenso ist der Effekt von eNOS am Tag 14 auf die Neurone mit verstärktem immunhistochemischen Nachweis von Galanin und vermehrter Anzahl aussprossender Neuriten eine weitere wichtige Erkenntnis.

Aber nicht nur die Ergebnisse über ein verändertes zelluläres Verhalten, sondern auch die Ergebnisse über ein im Vergleich zum Wildtyp unverändertes zelluläres Verhalten sind für das Verständnis der interzellulären Signalkaskaden wesentlich. Insbesondere dann, wenn sich durch den posttraumatisch immunhistochemisch vermehrten Nachweis einzelner Moleküle die Vermutung aufdrängt, diese könnten an den posttraumatischen zellulären Veränderungen beteiligt sein. Dies trifft für die hier untersuchten Moleküle, die beiden Neuropeptide Galanin und CGRP sowie für e- und nNOS zu. Umso wichtiger ist es, durch die Summation von positiven wie auch negativen Befunden im Knock out Modell der Maus das Verständnis der posttraumatischen Reaktion im peripheren wie im zentralen Nervensystem voranzutreiben; hier am Modell des Fazialiskerns nach Fazialisaxotomie bzw. -quetschung.

Diese einzelnen Aspekte ließen sich dann in der Zusammenschau verschiedener experimenteller Modelle auf unterschiedlichen Ebenen in ein Gesamtkonzept vereinen und können wegweisend sein für den Entwurf zukünftiger, therapeutischer Strategien.

4 MATERIAL UND METHODEN

4.1 Material

4.1.1 Primäre Antikörper

4.1.1.1 Primäre monoklonale Antikörper

<i>Antigen</i>	<i>Wirt</i>	<i>Spezifität/Klon</i>	<i>Konzentration*</i>	<i>Azeton</i>	<i>Hersteller/ Herkunft</i>
$\alpha 5\beta 1$	Ratte	Maus/ 5H10-27	1 : 2000	+	Pharmigen; Hamburg, Deutschland
$\alpha 6\beta 1$	Ratte	Maus/ GoH3	1:3000	+	Camon; Wiesbaden Deutschland
$\alpha M\beta 2$	Ratte	Maus/ 5C6	1:6000	+	Camon; Wiesbaden Deutschland
B7-2	Ratte	Maus/ GL-1	1:3000	+	Pharmingen; San Diego, CA, USA
CD3	Syrischer Hamster	Maus/ 500A2	1:1600	+	Pharmingen; San Diego, CA, USA
CD3	Ratte	Maus/ 17A2	1:1000	+	Pharmingen; San Diego, CA, USA
GFAP	Kaninchen	Ratte	1:5000	+	Dako; Hamburg, Deutschland
CGRP	Kaninchen	α -CGRP	1:400	+	Peninsula Laboratories, San Carlos, CA, USA
Galanin	Kaninchen	Maus/ RGG-7141	1:400	+	Peninsula Laboratories, San Carlos, CA, USA
ICAM1	Ratte	α -ICAM1	1:3000	+	Camon; Wiesbaden, Deutschland
MHC-1	Ratte	Maus/ R-HR52	1: 100	+	BMA; 4302 Augst, Schweiz

*angegebene Konzentrationen Näherungswerte. Eine neue Charge erfordert erneute Titration für optimalen Gebrauch

4.1.1.2 Primäre polyklonale Antikörper

Antigen	Wirt	Spezifität/ Klon	Konz.*	Azeton	Hersteller/ Herkunft
CGRP	Kaninchen	Ratte	1:1000	+	Peninsula; Belmont CA, USA
Galanin	Kaninchen	Ratte	1: 400	+	Peninsula; Belmont CA, USA
GFAP	Kaninchen	Kuh	1: 6000	+	Dako; Hamburg Deutschland
IBA1	Kaninchen	Maus/ α - IBA1	1: 6000	+	Dr. Imai; Nat. Institute of Neuroscience, Tokyo, Japan
MCSFR	Kaninchen	Maus/ 06- 175	1: 6000		UBI; NY, USA
TSP	Kaninchen	α -TSP	1. 6000	+	Alexis; Grünewald, Deutschland

*angegebene Konzentrationen Näherungswerte. Eine neue Charge erfordert erneute Titration für optimalen Gebrauch

4.1.1.3 Sekundäre Antikörper

Spezifität	Wirt	Konjugat	Verd.	Hersteller/ Herkunft
Ig, Hamster	Ziege	FITC	1: 100	Dianova; Hamburg, Deutschland
Ig, Hamster	Ziege	Biotin	1:100	Dianova; Hamburg, Deutschland
Ig, Kaninchen	Ziege	Biotin	1: 100	Vector; Wiesbaden, Deutschland
Ig, Kaninchen	Esel	Biotin	1: 100	Dianova; Hamburg, Deutschland
Ig, Maus	Pferd	Peroxidase	1: 100	Vector; Wiesbaden, Deutschland
Ig, Ratte	Ziege	Biotin	1: 100	Vector; Wiesbaden, Deutschland
Ig, Ratte	Ziege	FITC	1:100	Sigma;Deisenhofen, Deutschland
Ig, Ziege	Esel	FITC	1:100	Dianova; Hamburg, Deutschland

4.1.2 Seren

Wirt	Hersteller/ Herkunft
Esel	Vector; Wiesbaden, Deutschland
Ziege	Vector; Wiesbaden, Deutschland
Maus	Sigma; Wiesbaden, Deutschland

4.1.3 Reagenzien

DePeX (Gurr)	BDH Lab.S.	Pool, England
OCT	Sakura	Zoechterwoude, Niederlande
Tyramin, biotinyliert	Dupont	Bad Homburg, Deutschland
VectaShield	Vector	Wiesbaden, Deutschland
Vectorstain ABC Kit	Vector	Wiesbaden, Deutschland
Gurr Certistain (Cresyl Violet)	BDH	Merck, Pool, England

4.1.4 Chemikalien, Materialien und Kits

Produkt	Firma	Hersteller/ Herkunft
ABC-Kit	Vector	Wiesbaden, Deutschland
Avertin (2,2,2-Tribromethanol,99%)	Aldrich	Deisenhofen, Deutschland
Azeton	Merck	Darmstadt, Deutschland
Biotinyliertes Tyramin	NEN	Boston, MA, USA
BSA (Rinderalbumin)	Sigma	Deisenhofen, Deutschland
DEPEX	BDH	Pool, England
3-3'-Diaminobenzidin	Sigma	Deisenhofen, Deutschland
Diethylether	Merck	Darmstadt, Deutschland
Endogene Peroxidase	Dupont	Bad Homburg, Deutschland
Ethanol	Merck	Darmstadt, Deutschland
Fluorogold	Fluorochrome	Denver, CO, USA
Formalin	Merck	Darmstadt, Deutschland
Gelatine	Merck	Darmstadt, Deutschland
Isopropanol	Merck	Darmstadt, Deutschland
Jung Einbettmedium	Leica	Nussloch, Deutschland
Kochsalz (NaCl)	Merck	Darmstadt, Deutschland

MiniRuby	Molecular Probes	Eugene, OR, USA
Natriumdihydrogenphosphat	Merck	Darmstadt, Deutschland
Natriumhydrogenphosphat	Merck	Darmstadt, Deutschland
Saccharose	Merck	Darmstadt, Deutschland
Xylol	Merck	Darmstadt, Deutschland

4.1.5 Lösungen, Puffer und Fixative

Phosphat –Puffer (PB):

100mM Na₂HPO₄ mit

H₃PO₄ auf einen pH von 7,4 titriert

Phosphat gepufferte Saline (PBS):

10mm Na₂HPO₄

8,4 g/l NaCl

mit H₃PO₄ auf pH 7,4 titriert

PB/ BSA:

1 g/l Rinderserum Albumin in PB

Perfusionsfixativ (FA):

40 g/l Paraformaldehyd

warm in NaOH gelöst

mit H₃PO₄ auf pH 7,4 titriert

10mm Na₂HPO₄

8,4 g/l NaCl

anschließend gefiltert

0,2 m Tris-HCl Puffer :

0,2 m Tris (12,11g auf 500 ml H₂O)

0,2 m HCl (20 ml 1 n HCl/ 100 ml H₂O)

Mischen der beiden Lösungen bis pH 7,4

Postfixierung:

1 Teil Perfusionsfixativ

3 Teile PBS (1% FA finale Konzentration)

Gefrierschutz Saccharose Lösung:

30% Saccharose

10mm Na₂HPO₄

mit H₃PO₄ auf pH 7,4 titriert

Gelatine Lösung:

0,5 % Gelatine in bidestilliertem Wasser

Kurzfixierung:

1 Teil 37% Formaldehyd/ 10% Methanollösung (Merck)

9 Teile PB (3,7% FA finale Konzentration)

Diaminobenzidin/ H₂O₂ (DAB/ H₂O₂):

0,5 g/l Diaminobenzidin

0.01% H₂O₂

4.2 Methoden

4.2.1 Versuchstiere

Die Untersuchungen an normalen Tieren wurden an zumeist 2 – 3 Monate alten C57Bl/6 Mäusen durchgeführt. Die homozygot CGRP-defizienten Tiere und ihre Wildtyp-Kontrollgruppe stammten aus dem Labor von Prof. S.J. Wimalawansa (Medical branch der Universität Houston, Galveston, Texas, USA) und aus dem Labor von Prof. J. Changeux (Pasteur Institut, Paris, Frankreich). Die homozygot Galanin-defizienten Tiere und ihre Wildtyp-Kontrollgruppe stammten aus dem Labor von Prof. J. Wynick (Bristol, England) und Prof. R. Zigmond (Case Western Reserve Universität, Cleveland, Ohio, USA). Die homozygot e-NOS- und n-NOS-defizienten Tiere und ihre Wildtyp-Kontrollgruppe stammten aus dem Labor von Prof. Chang (Mass. General Hospital, Cardiovascular Research Center, Boston, USA).

Die Interleukin 6-defizienten Tiere stammten aus dem Labor von Dr. H. Bluethmann (Hoffman-LaRoche, Basel, Schweiz). Die IL6^{-/-} Tiere mit einem genetischen C57Bl/6 Hintergrund wurden mit C57Bl/6 Wildtyp-Tieren (Charles River, Hannover) gekreuzt, um eine Wildtyp-Kolonie zu etablieren. Die Versuche wurden an den homozygoten IL6^{-/-} bzw. IL6^{+/+} F1 Nachkommen durchgeführt. Während der Aufzucht wurden die Tiere zur Genotypisierung einem PCR-Screening unterzogen.

Dazu wurde ein 1 cm langes Schwanzstück von 2 Wochen alten Mäusen über Nacht in Proteinase K Lysis Puffer (100µg/ml, Boehringer Mannheim) inkubiert. Das Lysat wurde mit Phenolchloroform behandelt und die genomische DNS wurde aus einer Lösung mit Isopropanol präzipitiert, gewaschen und wieder aufgelöst in 200µl bidestilliertem Wasser. Die Polymerase Ketten Reaktion (PCR) wurde verwandt, um die eingefügte Neomycin Kasette zu identifizieren. Dies wurde mit 0,5µl DNS, 1 x PCR Puffer (Eurobio, Raunheim, Deutschland), 2,0mM MgCl₂, 200µM dNTPs (Pharmacia, Freiburg, Deutschland), 1,0 Einheiten taq Polymerase (Eurobio) und 10 pmol des gleichläufigen IL-6 Primers 5´-GCT AGC TAG ATA TCT CGA GAG AGG-3´ und 10 pmol des Neomycin gegenläufigen Primers 5´-TCC CGC TTC AGT GAC AAC GTC-3´ durchgeführt. Eine zweite PCR war spezifisch für das intakte IL-6 Gen, wobei der gleichläufige Primer 5´-GCT AGC TAG ATA TCT CGA GAC AGG-3´ und der gegenläufige Primer 5´-GGG ACT GGT ATC CTC TGT GAA GTC-3´ zur Anwendung kamen.

Bei den anderen untersuchten Molekülen wurde die jeweilige Gen-defiziente Gruppe mit der entsprechenden Wildtyp Vergleichsgruppe mit dem spezifischen Antikörper immunhistochemisch gefärbt. Dabei wurde der Zeitpunkt gewählt, an dem das Molekül posttraumatisch am stärksten nachweisbar war. Im Gegensatz zu den Wildtypen zeigte sich bei den gendefizienten Tieren keine immunhistochemische Färbung (siehe Abb. 10 A und B; S. 30).

Alle Tiere wurden vor jedem operativen Eingriff durch intraperitoneale Injektion mit 2.5% Tribromethanol (Avertin, Sigma, Deisenhofen) anästhesiert. Alle Tiere der einzelnen untersuchten Zeitpunkte haben zur gleichen Gruppe gehört (Gruppe Tag 1, Tag 2 etc.). Sie wurden alle am gleichen Tag operiert, innerhalb eines Zeitfensters von ca. 1-3 Stunden. Die Tierexperimente und das Versorgungsprotokoll waren gebilligt worden von der Regierung von Oberbayern (AZ 211-2531-10/93 und AZ 211-2531-10/97).

4.2.2 Verletzungsmodelle des zentralen und peripheren Nervensystems

4.2.2.1 Charakteristika des Fazialismodells

Das Fazialismodell, bei dem durch periphere nervale Läsion ein indirektes zentrales Trauma gesetzt wird, ist ein seit langem etabliertes Modell, das eine Reihe von Vorteilen in sich vereint:

Der Fazialisnerv ist ein verhältnismäßig großer Nerv, der retroaurikulär einem operativen Zugriff distal des Foramen stylomastoideum gut zugänglich ist. Das Kerngebiet ist ein großes, leicht aufzufindendes Gebiet, dessen Neurone ausschließlich motorisch sind. Durch

die operative Schädigung lassen sich entzündlich-degenerative und regenerative Prozesse sowohl als retrogrades Geschehen zentral im Fazialiskern als auch peripher am Nerv selbst untersuchen. Es kommt zu einer retrograden Reaktion, die zu Veränderungen der Neuronen, der Mikroglia und Astroglia führt. Der paarige Fazialiskern bietet mit seiner kontralateralen Seite immer eine interne Kontrolle.

Durch Schädigung des Fazialisnerven wird ein indirektes Trauma im Fazialiskern gesetzt, ohne jedoch die Blut-Hirn-Schranke (BBB) zu zerstören. Die Zellarchitektur bleibt somit erhalten. Dadurch können störende Effekte ausgespart bleiben, wie der Einstrom von hämatopoetischen Zellen und Entzündungsmediatoren, die bei anderen Hirnverletzungsmodellen durch den Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke eher auftreten. Die den zellulären Veränderungen zugrundeliegenden molekularbiologischen Mechanismen können so unverfälschter verstanden werden.

Bei Axotomie des Fazialis kommt es zu einem erneuten Auswachsen der Axone von zentral und einer erfolgreichen Reinnervation der Muskelendplatten der Vibrissen. Wird das Axotomiemodell durch alleinige Quetschung des Fazialis modifiziert, lässt sich die periphere Regeneration und das lokale Entzündungsgeschehen des Traumas optimal untersuchen.

4.2.2.2 Durchtrennung des Fazialisnervs

Der rechte Fazialisnerv wurde retroaurikulär aufgesucht und unmittelbar nach seinem Austritt aus dem Foramen stylomastoideum durchtrennt. Der Operationssitus wurde anschließend mit Metallklammern verschlossen. Die nichtoperierte linke Seite diente bei allen Versuchen als Normalkontrolle.

4.2.2.3 Quetschung des Fazialisnervs

Eine leichte Abwandlung erfuhr das Modell bei der Untersuchung der Regeneration und Reinnervation der Muskulatur der Vibrissen. Anstelle einer kompletten Durchtrennung wurde über einen Zeitraum von ca. 20 sec der Nerv distal des Abgangs des Ramus auricularis posterior mehrmals mit einer feinen Pinzette gequetscht. So wurden die Axone in ihrer Kontinuität unterbrochen. Die zur Regeneration wesentliche Nervenhülle blieb als Leitbahn für auswachsende Fasern erhalten. Die Tiere wurden dann nach 96 Stunden sakrifiziert.

4.2.3 Behandlung des Gewebes

4.2.3.1 Zentrales Nervengewebe

Vor der Entnahme von Gewebe wurden die Tiere mit dem hochdosierten Inhalationsanästhetikum Diethylether betäubt und getötet. Nach Eröffnung des Thorax wurden sie dann transkardial über den linken Ventrikel mit Hilfe einer Kanüle zuerst mit 200 ml PBS, zur Reinigung der Gefäße von Blut und Erythrozyten, und anschließend mit 200 ml 4%igem PFA für je 5 min perfundiert (40 ml/min). Für den Austritt der Lösungen wurde der rechte Vorhof eröffnet. Nach Entnahme des Gehirns wurde es für 2h auf einem Rotator (8 rpm) bei 4°C in einer 1%igen PFA/PBS Lösung nachfixiert. Anschließend verblieb es auf dem Rotator für mindestens 12h in 30%iger Succrose zum Gefrierschutz. Nach Absinken des Gehirns in der Succroselösung wurde das Gehirn entnommen, in dem Eindeckmedium OCT eingebettet, auf Trockeneis eingefroren und bei -80°C gelagert (Raivich et al., 1998b). Die Region der Fazialiskerne im Hirnstamm wurde am Kryostaten von kaudal aufgesucht. Das Gewebe wurde bei einer Innenraumtemperatur von -20°C und bei einer Blocktemperatur von -10°C in einer Dicke von 20µm geschnitten. Das Gewebe wurde auf mit 0,5%iger Gelatinelösung überzogenen, warmen Objektträgern aufgenommen, auf Trockeneis eingefroren und bei -80°C zum weiteren Gebrauch gelagert.

4.2.3.2 Peripherer Nerv

Bei der Gewinnung des peripheren Nerven wurde das leicht veränderte Perfusionsschema angewandt. Als Lösungen wurden 200 ml PBS und 200 ml 4%igem PFA für je 5 min perfundiert. Daran schloß sich eine langsame Dauerperfusion mit 600 ml 1%igem PFA/PBS für 1h an. Bei einer Nachfixierung in einem 1%igen FA-Bad ex situ hätte sich der Nerv gewellt und wäre damit für das longitudinale Schnittverfahren unbrauchbar geworden. Anschließend wurde der Nerv entnommen, in einen eigens aus Aluminiumfolie geschaffenen Behälter mit planem Boden der Länge nach hineingelegt, mit Einbettmedium OCT (Jung, Leica Instruments) bedeckt und auf Trockeneis eingefroren.

Am Kryostaten (Innenraumtemperatur -20°C, Blocktemperatur -10°C) wurde dieser dann longitudinal in einer Dicke von 10µm geschnitten und auf gelatinierte (0,5% Gelatine) warme Objektträger aufgenommen, die bei -80°C für den weiteren Gebrauch gelagert wurden.

4.2.4 Histologische Färbungen

4.2.4.1 Immunhistochemie für Lichtmikroskopie

Die 20µm dicken Schnitte wurden mit bidestilliertem Wasser rehydriert, mit einem feinen Pinsel entfaltet und geglättet, für 5 min unter leichter Luftzufuhr getrocknet, mit einem Fettstift umrundet (PAP-Pen) und dann für die Immunhistochemie vorbehandelt (Möller et al. 1996).

Die folgenden Schritte erfolgten in Färbegefäßen.

Die Schnitte wurden in 4%igem FA/ PB für 5 min auf dem Objektträger durch Ausbildung kovalentener Bindungen fixiert, in PB aufbewahrt, dann, entsprechend dem Antikörper, für je 2 min in 50%igem Azeton, in 100%igem Azeton und in 50%igem Azeton entfettet, was das Aufbrechen der Lipidzellmembran bewirkte, und für je 2 min in 2 x PB und 1 x PB/ BSA überführt.

Danach wurden die Schnitte mit 5%igem Ziegenserum (Vector, Wiesbaden, Deutschland) in PB für 30 min bei RT vorinkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Diese Lösung wurde anschließend abpipettiert und die Schnitte mit dem primären Antikörper (Ak), optimal verdünnt in PB/ BSA über Nacht bei 4°C inkubiert und am folgenden Tag 1 x in PB/ BSA, 2 x in PB und 1 x in PB/ BSA gewaschen.

Der entsprechende sekundäre biotinylierte Antikörper wurde vorerst unverdünnt mit der doppelten Menge Mausserum für 30 min bei 37°C vorinkubiert, um unspezifische Bindungsstellen des Antikörpers zu blockieren. Die Schnitte wurden dann mit dieser Mischung in einer Konzentration für den sekundären Antikörper von 1:100 in PB/ BSA/ 5% Ziegenserum für 1h bei RT inkubiert. Nach einem weiteren Waschvorgang mit 2 x PB/ BSA und 2 x PB wurden die Schnitte mit dem ABC-Reagenz (Vector) inkubiert, verdünnt je 1:125 in PB (A und B in die gleiche PB Lösung). Die ABC/ PB Lösung wurde für 1h bei RT vorinkubiert. Hierbei wird an den biotinylierten sekundären Antikörper über eine Avidin-Biotin-Avidin Brücke eine biotinylierte Peroxidase gebunden, welche das zugefügte 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) unter Reduktion von H₂O₂ visualisiert. Dazu wurden die Schnitte wieder in 2 x PB und 1 x PBS gewaschen, anschließend wurde die Färbung durchgeführt. Als Visualisierungsreagenz diente Diaminobenzidin (DAB) 0,5g/l in PBS und 0,01% H₂O₂ 30%. Vor der Zugabe von H₂O₂ wurde die PBS Lösung mit dem aufgelösten DAB gefiltert. Die Schnitte reagierten für 5 min bei RT mit dieser Lösung. Das oxidierte DAB polymerisiert und bildet einen unlöslichen bräunlichen Niederschlag (Graham and Karnovsky, 1965; Sternberger et al., 1986).

Durch Zugabe von 0,25 g/l CoCl₂ und 0,2 g/l NiSO₄ wurde bei manchen Färbungen die DAB/ PB Lösung im Färbeeffect verstärkt. Bevor 0,01% H₂O₂ 30% zur Visualisierung beigegeben

wurde, wurde diese Lösung feingefiltert, um Artefakte in Form grober Präzipitate zu vermeiden.

Der Färbevorgang wurde beendet, indem die Schnitte in bidestilliertem Wasser gewaschen wurden. Sie wurden anschließend in einer aufsteigenden Alkoholreihe von 2 x 70%, 2 x 90%, 2 x 95% und 2 x 100%, dann Isopropanol und Xylol entwässert und zum Schluss in Depex eingebettet und mit einem Deckglas versehen.

Periphere Nerven wurden ohne Rehydrierung für 5 min luftgetrocknet, die weitere Immunhistochemie ist oben beschrieben.

Die Immunhistochemie für den Makrophagen Kolonie-stimulierenden Faktor (MCSFR) wurde an frei flottierenden Schnitten durchgeführt, ohne diese mit Azeton zu entfetten (Raivich et al., 1998 a, b).

4.2.4.2 Färbung nach Nissl

Die 25µm dicken Kryostatschnitte wurden bei Raumtemperatur luftgetrocknet und für 2 Tage in einer 3,7% Formalinlösung bei RT gelassen. Durch das Ausbilden kovalenter Bindungen zwischen den Proteinen der Gelatine und dem Gewebe, wurde das Gewebe auf dem Objektträger fixiert. Anschließend wurden die Schnitte wieder über Nacht bei RT in 70% Alkohol inkubiert. Daraufhin erfolgte die Färbung in 1% Kresylviolett über 10 min, wonach eine rasche Unterbrechung des Färbevorgangs durch Spülung mit bidestilliertem Wasser herbeigeführt wurde. Anschließend wurden die Schnitte durch eine aufsteigende Alkoholreihe gelassen, wobei der 96%ige Alkohol mit einigen Tropfen Eisessigsäure 95% versetzt war. Die Schnitte wurden dort bis zu dem gewünschten Ergebnis entfärbt und anschließend weiter in 96% und 100% Alkohol, dann Isopropanol und Xylol entwässert. Die Schritte der Entfärbung und der Entwässerung wurden so oft wiederholt, bis die gewünschte Färbeintensität erzielt war. Am Ende wurden die Schnitte in Depex eingebettet und mit einem Deckglas bedeckt.

1 g Kresylviolett (Merck, Darmstadt) wurde in 10 ml absolutem Alkohol in Lösung gebracht und auf 100 ml mit bidestilliertem Wasser aufgestockt, erwärmt und, nachdem es abgekühlt war, gefiltert. Die gleiche Lösung war zum vielfachen Gebrauch geeignet.

4.2.4.3 Färbung von Granulozyten durch endogene Peroxidase (EP)

Zur Färbung der Granulozyten diente die Aktivität der endogenen Peroxidase (EP) in den Granulozyten. Die fixierten Schnitte wurden mit bioinyliertem Tyramin 3% (Dupont, Bad Homburg) in PB und 0,01% H₂O₂ für 10 min inkubiert. Das Tyramin wurde durch die Peroxidase oxidiert und kovalent an das Schnittgewebe gebunden. Durch die sich daran

anschließende ABC/ DAB Visualisierung wurde das konjugierte Biotin detektiert (Adams, 1992).

4.2.4.4 NADPH-Diaphorase Färbung

Die bei -80°C gelagerten Schnitte wurden bei Raumtemperatur für eine Stunde getrocknet. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Tetrazolium-Färbereagenz für eine halbe Stunde. Die Schnitte wurden in Formalin 4% gegeben und 20 min nachfixiert. Sie wurden ausgiebig in klarem bidestilliertem Wasser gespült und in der aufsteigenden Alkoholreihe entwässert. Die Inkubationslösung setzt sich zusammen aus: 10 ml Tetrazoliumstammlösung und 20 mg DPN-H (β -Nicotinamid-adenin-aluminiumchlorid) (Boehringer 6756).

Die Tetrazoliumstammlösung wurde hergestellt, indem 10 mg Nitrotetrazoliumbenzchlorid (Sigma N6876) in 10 ml bidestilliertem Wasser gelöst wurden. Anschließend wurden 6 ml 0,2 mol Tris-HCl Puffer (pH 7,4) und 4 ml destilliertes Wasser hinzugegeben. Am Ende erfolgte eine Einstellung des pHs auf 7,4 mit 1 m NaOH.

4.2.4.5 Fluoreszenzimmunhistochemie

Die Untersuchung der zellulären Lokalisation von zellspezifischen Antigenen auf Neuronen, Astrozyten, Oligodendroglia, Mikroglia, Endothelien oder Leukozyten durch fluoreszierende Antikörper bietet gegenüber der konventionellen DAB-Immunhistochemie eine Reihe wichtiger Vorteile. Die simultane Markierung mehrerer Antigene durch verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe ermöglicht zweifelsfrei die Zuordnung von verschiedenen Zellen, selbst wenn sich ihre Morphologie entsprechend des Aktivierungszustandes lichtmikroskopisch ähnelt. Als zellspezifischer Marker dienten in dieser Arbeit GFAP zur Markierung der Astrozyten, ionisiertes Ca-bindendes Adapterprotein 1 (IBA 1) und intrinsisches Maus-Immunglobulin (IgG) als Mikroglia marker, sowie Galanin und CGRP als Marker für axotomierte Motoneurone (Raivich et al., 1995; Klein et al., 1997). Des weiteren ermöglichen Doppelmarkierungen eine besonders hohe Aufnahmeempfindlichkeit im konfokalen Lasermikroskop. Darüber hinaus lässt sich die Menge eines Antigens selektiv mit Hilfe der bestimmten Zelltypmasken semiquantitativ abschätzen.

4.2.4.5.1 Immunfluoreszenz Doppelfärbung

Für die Immunfluoreszenz Doppelfärbung wurden die $20\mu\text{m}$ Schnitte vorbehandelt, wie es im Kapitel über die Immunhistochemie für Lichtmikroskopie beschrieben wurde (S. 82). Hier wurden die Schnitte jedoch mit 5%igem Eselserum in PB vorinkubiert (ES; Sigma). Die Schnitte wurden gleichzeitig mit primärem monoklonalem Antikörper und primärem sekundärem Ak in PB/ BSA je 100 ml über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Schnitte wurden

gewaschen 1x in PB/ BSA, 2 x in PB, wieder 1 x in PB/ BSA. Dann wurden sie für eine Stunde bei RT mit den sekundären Antikörpern inkubiert: Fluorescein-5-Isothiocyanat (FITC)-konjugiertes Antiserum gegen Ratte oder Hamster-IgG aus der Ziege (1:100 in PB/BSA) und einem Biotin konjugiertem Antiserum gegen Kaninchen oder Ratten IgG aus dem Esel (1:100 PB/BSA). Der gleiche Waschschrift wurde wiederholt, wonach die Schnitte mit dem tertiären FITC-konjugierten Esel anti Ziege Antikörper (Sigma) 1:100 in PB/ BSA in Kombination mit Texas Red-Avidin (Dianova) 1:1000 oder Cy3-Avidin 1:1000 in PB/ BSA für 2h bei RT inkubiert wurden.

Die Schnitte wurden erneut gewaschen, mit VectaShield (Vector) bedeckt und im Dunkeln bei 4°C gelagert.

4.2.4.5.2 Doppelmarkierungen mit intrinsischem IgG

Im Hirnparenchym der Maus finden sich an den Mikrogliazellen bereits unter physiologischen Bedingungen über Fc-Rezeptoren gebundene Immunglobuline (Fischman und Savitt, 1989; Werner et al., 1998), die hier als spezifische Marker für ruhende und aktivierte Mikrogliazellen dienen. Hierzu wurden die Schnitte nach der oben beschriebenen Vorbehandlung und Präinkubation in 5%igem ES mit Peroxidase-konjugiertem Antikörper gegen Maus IgG aus dem Pferd (1:400 in PB/BSA) für 1 Stunde bei RT inkubiert, dann sorgfältig in PB/BSA, PB, PB und PB/BSA gewaschen und für weitere 10 Minuten mit biotinyliertem Tyramin (1:3000 in PB) und H₂O₂ (1:10000 in PB) bei RT inkubiert. Bei dieser enzymatischen Reaktion oxidiert die Peroxidase das biotinylierte Tyramin unter der Reduktion von H₂O₂ und bewirkt dessen kovalente Bindung an den Gewebeschnitten. Mit Hilfe des konjugierten Biotins kann das zuvor gebundene Tyramin nun nachgewiesen werden (Adams, 1992). Nach dem Waschen in PB/BSA und PB wurden die Schnitte erneut mit 5% Eselserum zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen für 30 Minuten bei RT präinkubiert und mit dem entsprechenden primären Antikörper über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte mit einem sekundären FITC-konjugierten Antikörper gegen Ratten-IgG (1:100 in PB/BSA) aus der Ziege (siehe Tabelle) für eine Stunde bei RT inkubiert und dann in PB/BSA, PB, PB und PB gewaschen. Schließlich wurden die Schnitte mit einem tertiären FITC-konjugierten Antiserum gegen Ziegen-IgG (1:100 in PB/BSA) aus dem Esel in Kombination mit Cy3-Avidin (1:1000 in PB/BSA) für 2 Stunden bei RT inkubiert. Nach dem Waschen in PB/BSA und 3 mal in PB wurden die Schnitte mit Vectashield eingedeckelt und bei 4°C im Dunklen bis zur mikroskopischen Auswertung aufbewahrt.

4.2.4.5.3 Autofluoreszenzextraktion im konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop

Die Anregung der Fluoreszenz im konfokalen Laser-Mikroskop führt im fixierten Gewebe und hier besonders in phagozytischen Mikrogliazellen und Lipofuszin-körpern der Neurone (Raivich et al., 1998a) auch zu Emission von spezifischer Fluoreszenz, sogenannter Autofluoreszenz. Diese hat ein sehr breitbandiges Spektrum, so dass sie sich zu der spezifischen FITC- und Cy3-Fluoreszenz hinzuaddiert. Die Korrektur der Autofluoreszenz erfolgte nach dem Prinzip der linearen Extraktion (Raivich et al., 1998a). Hierbei wurde zur Detektion der autofluoreszenten Strukturen das Präparat mit einer Wellenlänge von 647 nm (Cy5) angeregt, einem Bereich, in welchem die hier verwendeten Farbstoffe FITC und Cy3 nicht mehr emittieren und in dem die autofluoreszierenden Strukturen gut angeregt werden. Diese Strukturen wurden mit den korrespondierenden Stellen im FITC- und Cy3-Bild in Bezug gesetzt, woraus lineare Extraktionskoeffizienten berechnet wurden. Zur Korrektur der Autofluoreszenz wurden unter Berücksichtigung der jeweiligen Extraktionskoeffizienten die optischen Lichtwerte (OLV) der jeweils korrespondierenden Pixel im FITC- und Cy3-Bild abgezogen. Die einzelnen Rechenschritte sollen im Folgenden dargestellt werden.

Zunächst wurden die im TIFF Format gespeicherten Bilder mit FITC-, Cy3 und der Autofluoreszenz (AF) in OPTIMAS (Bildanalyseprogramm) importiert und der Mittelwert ($MEAN_{AF}$) und die Standardabweichung (SD_{AF}) aller Pixel eines AF-Bildes (OM_{AF}) bestimmt. Nun wurden hochautofluoreszente Strukturen (HAFS) im OPTIMAS Programm durch einen OLV-Schwellenwert aus $MEAN_{AF} + (SD_{AF} \times 2)$ markiert. Der Mittelwert der OLV innerhalb dieser markierten Strukturen wurde als Maske in das FITC- und Cy3-Bild (OF_{FITC} , OM_{Cy3}) übertragen, wobei ihre Position dort den hochautofluoreszenten Strukturen im AF-Bild entsprach. Innerhalb dieser Profile wurde nun der OLV-Mittelwert getrennt für das FITC-Bild, ($MEAN_{FITC-HAFS}$) und das Cy3-Bild ($MEAN_{Cy3-HAFS}$) berechnet. Anschließend wurde der Mittelwert aller OVL für FITC ($MEAN_{FITC}$) und Cy3 ($MEAN_{Cy3}$) berechnet. Die linearen Extraktionskoeffizienten für FITC (LEK_{FITC}) und Cy3 (LEK_{Cy3}) berechneten sich dann wie folgt:

$$LEK_{FITC} = (MEAN_{FITC-HAFS} - MEAN_{FITC}) / (MEAN_{AF-HAFS} - MEAN_{AF})$$

$$LEK_{Cy3} = (MEAN_{Cy3-HAFS} - MEAN_{Cy3}) / (MEAN_{AF-HAFS} - MEAN_{AF})$$

Die korrigierten FITC und Cy3-Bilder (KOR_{FITC} und KOR_{Cy3}) wurden dann berechnet, indem auf alle Pixel der originalen FITC- und Cy3-Dateien folgende Formel angewandt wurde:

$$KOR_{FITC} = OM_{FITC} - LEK_{FITC} \times OM_{AF}$$

$$KOR_{Cy3} = OM_{Cy3} - LEK_{Cy3} \times OM_{AF}$$

Die korrigierten Bilder KOR_{FITC} und KOR_{Cy3} wurden als TIFF-Dateien zur weiteren Analyse gespeichert. Die Autofluoreszenzextraktion im konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop wurde durch Programmierung in OPTIMAS und EXCEL (Tabellenkalkulationsprogramm) halbautomatisch durchgeführt (Kloss et al., 1999).

4.2.5 Retrograde Tracing-Techniken

4.2.5.1 Identifikation von zentralen Wachstumskegeln

Zur retrograden Markierung der Wachstumskegel im Fazialiskern wurde der Tracer MiniRuby verwendet, der im roten Wellenlängenbereich fluoresziert. Unmittelbar nach Durchtrennung des Fazialiskerns wurde unter Anästhesie mit Avertin ein mit 5 μ l MiniRuby (10% in H₂O) getränkter Gelatine-Schwamm auf der Schnittfläche des proximalen Nervenstumpfs platziert und nach 15 Minuten wieder entfernt. Vierzehn Tage später wurden die Tiere wie in Kapitel 4.2.3.2. perfundiert und die entsprechend vorbehandelten Schnitte der Fazialisnerven mit FITC-konjugierten sekundären und tertiären Antikörpern gegen Galanin gefärbt. Die FITC- und die endogene MiniRuby-Fluoreszenz wurden entsprechend der FITC/TexasRed-Doppelfluoreszenz im konfokalen Mikroskop mit einem 63x-Objektiv aufgenommen und bearbeitet.

4.2.5.2 Reinnervation der Vibrissenmuskulatur

Der Nachweis von regenerierenden Fazialisneuronen, deren Axone die Vibrissenmuskulatur erreicht haben, erfolgte durch retrogrades Tracing mit Fluorogold. Zu definierten Zeitpunkten nach Quetschung des Fazialisnerven wurde ein flacher Schnitt unter die Haut der rechten und der linken Vibrissenmuskulatur gesetzt. Die entstandene Gewebetasche wurde mit einem 1mm dicken Gelatine-Schwamm ausgefüllt, der mit 15 μ l Fluorogold (4% H₂O) getränkt war. Nach 20 Minuten wurde der Schwamm entfernt. Die Wunde wurde mit PBS gespült und anschließend genäht. 48 Stunden später wurden die Tiere wie in Kapitel 4.2.3.1. perfundiert, die gewonnenen Schnitte des Hirnstamms in H₂O ausgebreitet und anschließend für 10 Minuten getrocknet. Die retrograd markierten Neurone im linken und im rechten Fazialiskern wurden sofort unter einem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axiophot) mit UV-Beleuchtung gezählt. Von sechs Schnitten in jedem Tier wurde der Mittelwert bestimmt und das Verhältnis zwischen operierter und unoperierter Seite in Prozent angegeben. Bei der statistischen Analyse wurde der Wilcoxon-Test angewandt.

Zur Illustration wurden die Schnitte in Vectashield eingebettet und mit dem konfokalen Laser-Mikroskop (488 nm Anregungswellenlänge, 590 nm Langpassfilter) aufgenommen.

4.2.6 Quantifizierung der immunhistochemischen Ergebnisse

4.2.6.1 Quantifizierung der lichtmikroskopischen Immunhistochemie

Zur Darstellung wurden die gefärbten Schnitte an einem Zeiss Axiophot Mikroskop mit einem Scanner (Leica S1 Alpha) digital aufgenommen. Mit dem Bildanalyseprogramm OPTIMAS wurden die Schnitte eines Versuchs standardmäßig verarbeitet und für die Illustration aufbereitet.

Zur Quantifizierung der Intensität der DAB Immunhistochemie (teilweise verstärkt mit Kobalt und Nickel) wurden die Schnitte bei konstanter Beleuchtungsspannung in einem Zeiss Axiophot Mikroskop (5x-Objektiv) mit einem Praktika Scanner (75 Bildpunkte/inch) digitalisiert. Jeder Bildpunkt (Pixel) erhielt einen optischen Lichtpunkt von 0 – 255. Das digitalisierte Bild wurde in OPTIMAS für jeden Schnitt mit einer eigenen Maske markiert, in der für 100.000 Pixel der Mittelwert (MEAN) und die Standardabweichung (SD) der OLV ermittelt wurde. Als Maß für die Farbintensität (F) wurde der MEAN-SD-Algorithmus verwendet.

Da mit zunehmendem Helligkeitswert die Absorption abnimmt, wurde dem MEAN ein Minusvorzeichen gegeben, also (-MEAN + SD). Der (-MEAN + SD) von gewebefreiem Glas wurde als Referenz verwendet (-MEAN_{GL} + SD_{GL}) und der FI wie folgt berechnet:

$$\begin{aligned} \text{FI} &= (-\text{MEAN} + \text{SD}) - (-\text{MEAN}_{\text{GL}} + \text{SD}_{\text{GL}}) \quad \text{oder} \\ \text{FI} &= (\text{MEAN}_{\text{GL}} - \text{SD}_{\text{GL}}) - (\text{MEAN} - \text{SD}) \end{aligned}$$

Der MEAN-SD-Algorithmus hat sich als besonders stabiles Maß von Färbintensitäten immunhistochemischer DAB Färbungen erwiesen (Möller et al., 1996; Raivich et al., 1998b; Kloss et al., 1999).

4.2.6.2 Zelltypspezifische Quantifizierung der Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen

Zur Beurteilung der Immunreaktivität der Aktivierungsmarker im Fazialiskern nach Fazialisaxotomie in IL-6 defizienten Mäusen wurden Fluoreszenz-Doppelmarkierungen mit nachfolgender digitaler Bildanalyse unter der Verwendung des RISC-Algorithmus (Raivich et al., 1998b) durchgeführt. Bei diesem Algorithmus wurden zuerst die gesuchten zellulären Profile in der Mikrographie mit der zellulären Maske (IgG, IBA1 im Cy3-Bild) definiert, um dann diese auf die Mikrographie der Zellart mit den zu quantifizierenden Fluoreszenzmustern zu übertragen (FITC-Bild). Dann wurde das Verhältnis des Mittelwertes der Pixel innerhalb der Maske zum Mittelwert aller Pixel im Bild bestimmt. Der Logarithmus dieses Verhältnisses liefert den relativen Färbekoeffizienten. Die Auswertung der Präparate nach dem RISC-

Algorithmus erfolgte in OPTIMAS und EXCEL. Im folgenden werden die Rechenschritte im Einzelnen beschrieben.

Für die Quantifizierung der jeweils spezifischen Immunreaktivität (FITC-Bild) auf den Immunglobulin-positiven Mikrogliazellen (Cy3-Bild) wurden die um die Autofluoreszenz korrigierten FITC- und Cy3-Bilder als TIFF in OPTIMAS importiert. Sie wurden mit der „Local Smoothing and Averaging“ Funktion mit einer 100x100 Pixel großen Boxgröße erfasst und anschließend wurde jeweils die Fläche des Fazialiskerns individuell markiert. Nun wurde im korrigierten Cy3-Bild der Mittelwert (MEAN) und die Standardabweichung (SD) der optischen Lichtwerte (OLV) der Pixel, die den Fazialiskern repräsentieren, berechnet. Die zu markierenden zellulären Cy3-Profile wurden anhand eines Schwellenwertes von MEAN + SD bestimmt. Diese Profil-Maske wurde auf das korrigierte und ebenfalls durch die „Local Smoothing and Averaging“ Funktion erfassten FITC-Bild übertragen. Dann wurde der Mittelwert der OLV aller Pixel im Fazialiskern (MEAN-Fazialiskern) und der Mittelwert aller Pixel innerhalb der Maske (MEAN-zelluläre Maske) berechnet. Daraus ergab sich der relative Färbekoeffizient (RISC), der sich wie folgt berechnet:

$$\text{RISC} = \log (\text{MEAN-zelluläre Maske} : \text{MEAN-Fazialiskern})$$

Anschließend wurde die Differenz der relativen Färbekoeffizienten zwischen der jeweils operierten Seite (RISC-operiert) und der kontralateralen, gesunden Seite als Kontrolle (RISC-Kontrolle) bestimmt. Diese ist ein Maß für die Veränderung der Immunreaktivität des jeweilig getesteten spezifischen Aktivierungsmarkers nach Fazialisaxotomie.

$$\text{DIFF-RISC} = (\text{RISC-Operiert}) - (\text{RISC-Kontrolle})$$

Die statistische Auswertung der zellulären Immunreaktivität der spezifischen Aktivierungsmarker erfolgte an vier definierten Zeitpunkten nach Fazialisaxotomie (Tage 1, 4, 7, 14). Die relativen Färbekoeffizienten (RISC) der operierten und der kontralateralen Seiten des Fazialiskerns wurden bei 5 Schnitten von jeweils 3-8 Tieren pro Gruppe nach dem RISC Algorithmus bestimmt, wobei die jeweiligen Berechnungsschritte der Koeffizienten teilautomatisiert durch Programmierung in OPTIMAS und EXCEL erfolgten. Dann wurden die Mittelwerte der Färbeintensitäten getrennt für die operierten und die kontralateralen Seiten errechnet, graphisch aufgetragen und mit einem gepaarten t-Test bei einem Signifikanzniveau von 5% auf statistisch signifikante Unterschiede getestet.

Zur Erstellung der digitalen Bildaufnahmen von FITC- und Cy3-Fluoreszenz, wurde ein Leica TCS 4D konfokales Mikroskop verwendet. Es wurde eine Vergrößerung von x 10 Objektiv für die Quantifizierung und eine Vergrößerung von x 100 Objektiv für die Illustrationen in einer 8

Bit Grauskala, 1024 x 1024 Pixel Format verwandt (beschrieben in Raivich et al., 1998a, b; Kloss et al., 1999). Je Schnitt wurden zehn gleich weite aufeinanderfolgende Ebenen mit einem Abstand von 30µm aufgenommen mit einem x 10 Objektiv oder entsprechend 15 Ebenen mit einem Abstand von 16µm zueinander mit dem x 100 Objektiv. Nach der Aufnahme wurden diese zu einer einzigen Bitmap kondensiert mittels der Hilfe des MaxIntens Algorithmus kondensiert. Die Autofluoreszenz wurde extrahiert, indem die Cyanin 5 (Cy5) Bitmap ebenfalls aufgenommen und dann von der Voraufnahme abgezogen wurde (Raivich et al., 1998a,b).

Die Aktivierungsmarker für Mikroglia bei den IL6+/+ und den IL6-/- Mäusen wurden quantifiziert, indem der Algorithmus des Färbekoeffizienten der relativen Intensität (relative intensity of staining coefficient = RISC) angewandt wurde (beschrieben in Werner et al., 1998). Die Mikroglia im Fazialiskern wurden zuerst mit der 5C6 Immunofluoreszenz (FITC-Bild) kenntlich gemacht oder mit der Immunofluoreszenz des Kaninchenantikörpers gegen IBA-1 (Cy3-Bild). Dazu wurden der Mittelwert und die Standardabweichung (mean+SD) verwandt. Diese Profile wurden auf die Bitmap der gegensätzlichen Immunofluoreszenz für die hier zur Anwendung gekommenen Antikörper übertragen. Die relative Intensität des Färbekoeffizienten für Mikroglia (RISCmicr) wurde gemäß folgender Formel festgelegt:

$$\text{RISCmicr} = \log[1 + (\text{OLVmicr} - \text{OLVfac})/\text{Ovout}]$$

Dabei galt für OLVmicr der Wert der mittleren optischen Leuchtkraft (mean optical luminosity value) für die mikroglialen Profile des Fazialiskerns, für OLVfac die OLV des gesamten Fazialiskerns und für OLVout das Gewebe außerhalb des Fazialiskerns. Dieser mittlere RISC wurde berechnet für die axotomierte und für die kontralaterale, nichtaxotomierte Seite des Fazialiskerns für jede Gruppe von Tieren (n = 3-7). Die statistische Signifikanz wurde anhand des unpaarigen Student- t-Test mit einer 5% Grenze (P < 0,05) berechnet.

4.2.6.3 Quantifizierung der zentralen Wachstumskegel

Die Wachstumskegel von aussprossenden Axonen nach Axotomie im und um den Fazialiskern am Tag 14 (Kloss et al., 1999; Werner et al., 1999) wurden nachgewiesen, indem Immunofluoreszenzhistochemie mit Antikörpern gegen Galanin oder CGRP angewandt wurde. Wie schon beschrieben, sind diese stark in den Motoneuronen und deren Wachstumskegeln immunhistochemisch nachzuweisen. In einem zweiten Schritt wurden die Schnitte mit einem Cy-5-konjugierten sekundären Esel gegen Kaninchen Ig Antikörper (Dianova) behandelt.

Da die Wachstumskegel an den Rändern des Fazialiskerngebiets verstärkt vorkommen, wurden von jedem Tier 4 Schnitte verwandt, um eine ausgeglichene Quantifizierung zu

ermöglichen, wobei jeder Schnitt 200µm Abstand zum nächsten hatte. Die Schnitte wurden mit einem TCS 4D konfokalen Lasermikroskop (Leica, Nussloch, Deutschland) aufgenommen, wobei eine Vergrößerung von x10 mit Extraktionswerten für Cy5 (Wellenlänge, 647 nm; LP665) zur Anwendung kam.

Vierzehn aufeinanderfolgende Schnittebenen wurden unter Cy-5 Einstellung im konfokalen Mikroskop digitalisiert und kondensiert. Die Autofluoreszenz wurde simultan unter FITC-Einstellungen aufgenommen und von den Cy-5 Bildern extrahiert.

Die kleinen stark fluoreszierenden Wachstumskegel wurden von den großen Zellkörpern der Neurone mit dem Sobel Filter und einem dreistufigen Algorithmus in Optimas 6.2 unterschieden.

Im ersten Schritt wurde der Mittelwert der gesamten Leuchtkraft (MEANcor) und die Standardabweichung (Sdcor) der korrigierten Aufnahme (normale Aufnahme) aufgenommen. Diese Prozedur wurde wiederholt mit dem Sobel Filter (MEANSog, Sdsob, Sobel image).

Die Schwelle für die Galanin-immunofluoreszenten Wachstumskegel wurde in der Sobel Aufnahme mit folgender Formel gesetzt:

$$\text{Schwelle} = \text{MEANSob} + 11 \times \text{SD cor.}$$

Bereiche (area) an und über der so definierten Schwelle wurden mit der Funktion "Object Classes" gefiltert, wobei zwei zusätzliche Kriterien für das normale Bild herangezogen wurden.

- 1.) Area size > 10 pixel
- 2.) MEANarea – Sdarea > 1.4 x MEANcor

Mit MEANarea wurde die mittlere Intensität bestimmt und mit Sdarea die Standardabweichung jedes individuellen Bereichsprofils. Die verbleibenden Bereiche stimmten überein mit den Profilen der Galanin-immunofluoreszenten neuronalen Wachstumskegel und dienten als Maß für ihren Gesamtbereich im Gewebeschnitt.

Die Helligkeit der Wachstumskegel (growth cone brightness – BRTgc) für die Immunfluoreszenz des Neuropeptides wurde durch den modifizierten RISC Algorithmus mit folgender Formel festgelegt:

$$\text{BRTgc} = \log (\text{OLVgc}/\text{OLVtotal})$$

OLV_{gc} ist der Mittelwert der optischen Leuchtkraft der Wachstumskegel und OVL_{total} der Mittelwert der Leuchtkraft für die gesamte 1mm² messende Bitmap des Fazialiskerns und des umgebenden Gewebes.

Das mittlere Volumen der Wachstumskegel (VOL_{gc}) wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\text{VOL}_{gc} = 4\pi/3 \times [\text{GC-AREAtotal}/(\pi \times \#gc)]^{3/2}$$

Dabei meint GC-AREAtotal den gesamten Fläche (area) der Wachstumkegel pro Schnitt und #gc die Anzahl der Profile der Wachstumskegel, unter der Annahme einer nahezu sphärischen Struktur der Wachstumskegel.

4.2.6.4 Quantifizierung der Neurone

Zur Quantifizierung der Zahl der überlebenden Motoneurone wurden 60 Tage nach Fazialisaxotomie die Tiere sakrifiziert und jeweils 45 Gewebsschnitte mit einer Dicke von 20µm in caudo-rostraler Schnittführung angefertigt. Hierbei wurde das Kerngebiet auf einer gesamten antero-posterioren Länge von 640-700µm erfasst, sowie zusätzlich 100µm an den anschließenden kaudalen und rostralen Schnittenden. Zur histologischen Färbung wurden die Präparate über Nacht an der Luft getrocknet, anschließend über Nacht mit 4% Paraformaldehyd auf den gelatinierten Objektträgern mittels kovalenter Bindung fixiert und dann 24 Stunden in 70% Alkohol entfettet. Die Schnitte wurden anschließend für 10 min in Toluidinblau (Nisslfärbung) gefärbt, durch die Alkoholreihe und Xylol entfettet und nach Bedarf mehrmals beim entsprechenden Alkoholschritt in 95% Alkohol/0,1% Eisessig bis zur optimalen Darstellung entfärbt. Die fertig entfärbten Schnitte wurden in Eukitt gebettet. Die Zahl der neuronalen Profile (n) wurde in jedem angefertigten Schnitt mit einer angenommenen Schnittdicke von 25µm (D) bestimmt und mit einer Korrektur nach Abercrombie (Abercrombie, 1946) nach folgender Formel korrigiert:

$$N = n \times D / (D + d)$$

Der mittlere neuronale Zelldurchmesser wurde zuvor aus jeweils drei Schnittpräparaten des Fazialiskerns mit einem Abstand von jeweils 100µm und einer Gesamtzahl von 140 – 220 Neuronen auf der operierten Seite und 280 – 340 Neuronen auf der nicht-operierten Seite bestimmt. Hierzu wurden die mit einer Sony 3 CCD Videokamera (AVT-Horn, Aachen, Deutschland) im 24-bit RGB Format digitalisierten Bilder in das Bildverarbeitungsprogramm OPTIMAS 6.2 importiert und die neuronalen Zellprofile unter der Verwendung des MEAN – 1.5 x SD-Schwellenwertes detektiert. Der mittlere Zelldurchmesser wurde dann unter Einbeziehung der mittleren Fläche (area) mit folgender Formel berechnet:

$$d = \sqrt{4 \times \text{Area} / \pi}$$

4.2.6.5 Quantifizierung von Lymphozyten

Nach Fazialisaxotomie erfolgt eine starke Einwanderung von CD 3 positiven Lymphozyten in den Fazialiskern. Die immunhistochemische Markierung erfolgte mit Antikörpern gegen CD 3 in DAB/ABC Technik, verstärkt mit Kobalt und Nickel. Am Tag 1, 3 bzw. 4 wurde der Mittelwert aus der Anzahl von je 7 20µm dicken Schnitten pro Tier verwendet. Die Schnitte hatten innerhalb des Fazialiskerns den gleichen Abstand zueinander. Durch die hohe Anzahl der Schnitte pro Tier konnte die geringe Anzahl eingewanderter Lymphozyten zum frühen Zeitpunkt mit ihrer hohen Schwankungsbreite ausgeglichen werden. Am Tag 14 wurde der Mittelwert aus der Anzahl zweier 15 Schnitte voneinander entfernter 20µm dicker Schnitte (Abstand 300µm) gebildet. Bei der hohen Zahl der einwandernden Lymphozyten waren zwei Schnitte ausreichend.

Im Fall der CD 3-positiven Lymphozyten wurde die statistische Analyse mit einer halblogarithmischen Funktion durchgeführt, wobei \hat{f} wie folgt definiert wurde:

$$\hat{f} = \log(x + 1)$$

Dabei ist für x die durchschnittliche Anzahl der Lymphozyten des Fazialiskerns für jedes individuelle Tier benannt. Die Anzahl der Lymphozyten (in Klammern) wurde um 1 erhöht, um negative unendliche Zahlen zu vermeiden, was bei den nicht axotomierten Fazialiskernen auftreten konnte, die keine Lymphozyten enthalten haben. Diese Funktion hat zu einer deutlicheren Verminderung der normalerweise starken Variabilität der Anzahl der Lymphozyten im axotomierten Fazialiskern geführt (um den Faktor 2-3). Diese Variabilität war vor allem am Tag 14 zu beobachten.

4.2.6.6 Quantifizierung von Granulozyten

Im peripheren Nerv wurde die Einwanderung der Granulozyten an und um die Läsionsstelle gemessen. Dazu wurde die Aktivität der endogenen Peroxidase zu Hilfe genommen. Die gefärbten Granulozyten wurden in einem Fenster von 0,39mm² direkt an der traumatisierten Region, 2mm und 4mm distal davon gezählt. Für jedes Tier wurden 5 Schnitte mit einem Abstand von 50µm verwendet und der Mittelwert der pro Lokalisation gezählten Zellen gebildet.

4.2.6.7 Quantifizierung von Makrophagen

Makrophagen wurden im regenerierenden peripheren Fazialisnerv mit Antikörper gegen die α M-Integrin-Untereinheit in DAB/ABC Technik gefärbt. Die Quantifizierung erfolgte im Lichtmikroskop. Eine Mikroskop-Rasterlinie (0,5mm lang) wurde vertikal zur Verlaufsachse des longitudinalen Nervs projiziert, auf der alle α M-positiven kreuzenden Membranen gezählt wurden. Für jedes Tier wurde der Mittelwert aus 5 Schnitten mit je 5 Schnitten Intervall zueinander (Abstand 50 μ m) gebildet.

4.2.6.8 Quantifizierung von Mikroglia Knötchen

Neuronaler Zelltod führt zu einer Aggregation von phagozytotischer Mikroglia, die MHC-1 und B7-2 positiv ist. Die Anzahl MHC-1 und B7-2 positiver Knötchen kann daher als indirektes Maß für die Anzahl degenerierender bzw. zu Grunde gegangener Neurone herangezogen werden. Ihr Nachweis erfolgte am Tag 14, wo diese morphologisch gut zu erkennen sind.

4.2.6.9 Messung der Regenerationsrate peripherer Nerven

Zur Messung der peripheren Regenerationsstrecke wurden die Fazialisnerven gequetscht und die Tiere am Tag 4 sakrifiziert. Jeder fünfte Schnitt, mit einem Abstand von je 50 μ m zueinander, wurde entweder gegen das Neuropeptid CGRP oder Galanin immunhistochemisch in ABC/DAB Technik gefärbt. Damit kamen die Wachstumskegel auswachsender Axone, in denen diese beiden Neuropeptide deutlich immunhistochemisch nachweisbar sind, gut zur Darstellung.

Als definierter Beginn für die Messung der Regenerationsstrecke galt die Quetschungsstelle des peripheren Nerven. Diese konnte meist schon makroskopisch, zur sicheren Kontrolle jedoch im Dunkelfeld, durch Unterbrechung der Autofluoreszenz des jeweiligen Nerven lokalisiert werden.

Von dort wurde am Lichtmikroskop mit der Mikrometerschraube die Distanz bis zu dem weitest distal erkennbaren Wachstumskegel bestimmt (Zeiss Axiophot). Für jedes Tier wurde der Mittelwert aus den verwandten 4-5 Schnitten berechnet.

4.2.7 Statistische Analyse

Die statistische Analyse für die Strecke der axonalen Regeneration, für die Anzahl der Neurone, die Einwanderung der Makrophagen/ Granulozyten in den verletzten Nerv und die Auswertung der lichtmikroskopischen wie immunfluoreszenten quantitativen Histologie wurde mit Hilfe des unpaarigen Student t-test durchgeführt.

Literaturverzeichnis

- Adams JC (1992) Biotin amplification of biotin and horseradish peroxidase signals in histochemical stains. *J Histochem Cytochem.* 40(10):1457-63.
- Agius E, Conchard P (1998) Comparison of neurite outgrowth induced by intact and injured sciatic nerves: a confocal and functional analysis. *J Neurosci.* 18: 328 – 338.
- Aguayo AJ and Bray GM (1984) Cell interactions studied in the peripheral nerves of experimental animals. In *Peripheral neuropathy* (eds Dyck PJ, Thomas PK, Lamert EH, Bunge R), pp. 360-377 WB Saunders, Philadelphia
- Ali C, Nicole O, Docagne F, Lesne S, MacKenzie ET, Nouvelot A, Buisson A, Vivine D (2000) Ischemia-induced Interleukin-6 as a potential endogenous neuroprotective cytokine against NMDA receptor-mediated excitotoxicity in the brain. *J Cerebral Blood Flow and Metabolism* 20: 956-966.
- Altay T, Gonzales ER, Park TS, Gidday JM. Cerebrovascular inflammation after brief episodic hypoxia: modulation by neuronal and endothelial nitric oxide synthase. *J Appl Physiol.* 2004 Mar;96(3):1223-30; discussion 1196.
- Aoki C, Bredt DS, Fenstermaker S, Lubin M (1998) The subcellular distribution of nitric oxide synthase relative to the NR1 subunit of NMDA receptors in the cerebral cortex. *ProgBrainRes* 118:83-97.
- Arntz C, Kanje M, Lundborg G (1989) Regeneration of the rat sciatic nerve after different conditioning lesions: effects of the conditioning interval. *Microsurgery.* 10(2):118-21.
- Bedecs K, Berthold M, Bartfai T (1995) Galanin-10 Years with a neuroendocrine peptide. *Int. J Biochem. Cell Biol.* 27:337-349
- Berezovskaya O, Maysinger D, Fedoroff S (1995) The hematopoietic cytokine, colony-stimulating factor 1, is also a growth factor in the CNS: congenital absence of CSF-1 in mice results in abnormal microglial response and increased neuron vulnerability to injury. *Int J Dev Neurosci.* Jun-Jul;13(3-4):285-99.
- Bernier B, Castejon S, Culver DG, Glass JD (1999) Axonal neurofilaments are resistant to calpain-mediated degradation in the WLDs mouse. *NeuroReport* 10:143-1426.
- Bignami A, Eng LF, Dahl D, Uyeda CT (1972) Localization of the glial fibrillary acidic protein in astrocytes by immunofluorescence. *Brain Res* 43: 447-435.
- Bird EV, Boissonade FM, Robinson PP (2003) Neuropeptide expression following ligation of the ferret lingual nerve. *Arch Oral Biol* 48:541-6.
- Bisby MA and Keen P (1985) The effect of conditioning lesion on the regeneration rate of peripheral nerve axons containing substance P. *Brain Res* 336:201-206.
- Bisby MA (1995) Regeneration of peripheral nervous systems axons. In Waxman SG, Kocsis JD, Stys PK (eds): *The Axon.* New York: Oxford University Press, pp. 553-578.
- Blinzinger K, Kreutzberg GW (1968) Displacement of synaptic terminals from regenerating motoneurons by microglial cells. *Z Zellforsch* 85:145-157.
- Böhme, GA, Bon C, Lemaire M, Reibaud M, Piot O, Stutsman JM, Doble A and Blanchard JC (1993) Altered synaptic plasticity and memory formation in nitric oxide synthase inhibitor-treated rats. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA* 90, 9191-9194.
- Bohatschek M, Gschwendtner A, von Maltzahn X, Kloss CUA, Pfeffer K, Labow M, Bluethmann H, Kreutzberg GW, Raivich G (1999) Cytokine mediated regulation of antigen presenting molecules MHC1, MHC2 and B7-2 in the axotomized mouse facial motor nucleus. *Soc.Neurosci.Abstr.* 25:1535.
- Bohatschek M, Kloss CU, Kalla R, Raivich G (2001) IN vitro model of microglial deramification: ramified microglia transform into amoeboid phagocytes following addition of brain cell membranes to microglia-astrocyte cocultures. *J Neurosci.* 64(5): 508-522.

- Bohatschek M, Kloss CU, Pfeffer K, Bluethmann H, Raivich G (2004a) B7.2 on activated and phagocytic microglia in the facial axotomy model: regulation by interleukin-1 receptor type 1, tumor necrosis factor 1 and 2 and endotoxin. *J Neuroimmunol* 156: 132-145.
- Bohatschek M, Kloss CU, Hristova M, Pfeffer K, Raivich G (2004b) Microglial major histocompatibility complex glycoprotein-1 in the axotomized facial motor nucleus: regulation and role of tumor necrosis factor receptors 1 and 2. *J Comp Neurol* 470: 382-399.
- Bolin LM, Verity NA, Silver JE, Shooter EM, Abrams JS (1995) Interleukin-6 production by Schwann cells and induction in sciatic nerve injury. *J Neurochem.* 64: 850-858.
- Borke RC, Curtis M and Ginsberg C (1993) Cholineacetyltransferase and calcitonin gene-related peptide immunoreactivity in motoneurons after different types of nerve injury. *J. Neurocytol.*, 22: 141-153.
- Branchek TA, Smith KE, Gerald C, Walzer MW (2000) Galanin receptor subtypes. *Trends in pharmacological science.* 21:109-116.
- Bredt DS. Endogenous nitric oxide synthesis: biological functions and pathophysiology. 1999) *Free Radic Res.*;31(6):577-96. Review.
- Brown HC, Perry VH, Lunn ER, Gordon S, Heumann R (1991) Macrophage dependence of peripheral sensory nerve regeneration: possible involvement of nerve growth factor. *Neuron* 6:359-370.
- Brown HC, Castano A, Fearn S, Townsend M, Edwards G, Streuli C, Perry VH (1997) Adhesion molecules involved in macrophage responses to Wallerian degeneration in the murine peripheral nervous system. *Eur J Neurosci* 9:2057-2063.
- Burazin TC, Gundlach AL (1998) Inducible galanin and GalR2 receptor system in motor neuron injury and regeneration. *J Neurochem.* 71:879-82.
- Cammer W and Tansey FA (1988) The astrocyte as a locus of carbonic anhydrase in the brains of normal and dysmyelinating mutant mice. *Journal of Comp. Neurology* 275(1): 65-75.
- Campbell, IL, Abraham CR, Masliah E, Kemper P, Inglis JD, Oldstone MBA, Mucke L, (1993) Neurologic disease induced in transgenic mice by cerebral overexpression of interleukin 6. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90. 10061-10065.
- Carenini S, Maurer M, Werner A, Blazycza H, Toyka KV, Schmid CD, Raivich G, Martini R (2001). The role of macrophages in demyelinating peripheral nervous system of mice heterozygously deficient in p0. *J Cell Biol.* 22:301-308.
- Chang CP, Pearse RV, O'Connell S and Rosenfeld MG (1993) Identification of seven transmembrane helix receptor for corticotropin-releasing factor and sauvagine in mammalian brain. *Neuron* 11: 1187 – 1195.
- Changeux JP, Duclert A and Sekine S (1992) Calcitonin gene-related peptides and neuromuscular interactions. *Ann. NY Acad. Sci.*, 78:361-378.
- Chao CC, Hu S, Sheng WS, Bu D, Burkinsky MI, Peterson PK (1996) Cytokine-stimulated astrocytes damage human neurons via nitric oxide mechanism. *Glia* 16, 1029-1035.
- Chen A, Kumar SM, Sahley CL, Muller KJ. (2000) Nitric oxide influences injury-induced microglial migration and accumulation in the leech CNS. *J Neurosci.*;20(3):1036-43.
- Chen S and Bisby MA (1993) Long-term consequences of impaired regeneration on facial motoneurons in the C57BL/Ola mouse. *J Comp Neurol* 335:576-585.
- Chen J, Zacharek A, Zhang C, Jiang H, Li Y, Roberts C, Lu M, Kapke A, Chopp M. (2005) Endothelial nitric oxide synthase regulates brain-derived neurotrophic factor expression and neurogenesis after stroke in mice. *J Neurosci.* 2;25(9):2366-75.

- Cheng L, Khan M, Mudge AW (1995) Calcitonin gene-related peptide promotes Schwann cell proliferation. *J Cell Biol* 129: 789-796.
- Chrisopoulos G, Perry KJ, Morfis M, Tilakaratne N, Gao Y, Fraser NJ, Main MJ, Foord SM and Sexton PM (1999) Multiple amylin receptors arise from receptor activity-modifying protein interaction with the calcitonin receptor gene product. *Mol Pharmacol* 56: 235-242.
- Clark WM, Rinker LG, Lessov NS, Hazel K, Hill JK, Stenzel-Poore M, Eckstein F (2000) Lack of interleukin-6 expression is not protective against focal central nervous system ischemia. *Stroke* 31: 1715-1720.
- Clemence A, Mirsky R, Jessen KR (1989) Non-myelin-forming Schwann cells proliferate rapidly during Wallerian degeneration in the rat sciatic nerve. *J Neurocytol* 18:185-192.
- Condic ML, Letourneau PC (1997) Ligand-induced changes in integrin expression regulate neuronal adhesion and neurite outgrowth. *Nature* 389: 852-856.
- Cooper G.J.S. (1994) Amylin compared with calcitonin gene-related peptide: structure, biology, and relevance to metabolic disease. *Endocrine Rev.*, 15, 163-201.
- Cork RJ, Perrone ML, Bridges D, Wandell J, Scheiner CA, Mize RR (1998) A web-accessible digital atlas of the distribution of nitric oxide synthase in the mouse brain. *ProgBrainRes* 118:37-50.
- Corness JD, Shi T-J, Xu Z-Q, Brulet P, Hökfelt T (1998) NGF and LIF both regulate galanin gene expression in primary DRG cultures. *NeuroReport* 9:1533-1536.
- Crawley JN (1999) The role of galanin in feeding behavior. *Neuropeptides* 33:369-375.
- Csillik B, Tajti L, Kovacs T, Kukla E, Rakic P, Knyiharcsillik E (1993) Distribution of calcitonin gene-related peptide in vertebrate neuromuscular junctions: relationship to the acetylcholine receptor. *J Histochem Cytochem* 41:1547-1555.
- Dailey AT, Avellino AM, Bentham L, Silver J, Kilot M (1998) Complement depletion reduces macrophage infiltration and activation during Wallerian degeneration and axonal regeneration. *J Neurosci* 18:6713-6722.
- Doherty P, Cohen J, Walsh FS (1990) Neurite outgrowth in response to transfected N-CAM changes during development and is modulated by polysialic acid. *Neuron* 5: 209-219.
- Dumoulin FL, Raivich G, Streit WJ and Kreutzberg GW (1991) Differential regulation of calcitonin gene-related peptide (CGRP) in regenerating rat facial nucleus and dorsal root ganglion. *Eur. J. Neurosci.* 3: 338-342.
- Eddleston M, Mucke L (1993) Molecular profile of reactive astrocytes--implications for their role in neurologic disease. *Neuroscience.* 54(1):15-36.
- Eliasson MJL, Blackshaw S, Schell MJ, Snyder SH (1997) Neuronal nitric oxide synthase alternatively spliced forms: prominent functional localizations in the brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 3396-3401.
- Eliasson C, Sahlgren C, Berthold CH, Stakeberg J, Celis JE, Betsholtz C, Eriksson JE, Pekny M (1999) Intermediate filament protein partnership in astrocytes. *J Biol Chem* 274:23996-4006.
- Esquerda JE, Ciutat D, Comella JX (1989) Absence of histochemical immunoreactivity to calcitonin gene-related peptide (CGRP) in spinal cord motoneurons from (+)-tubocurarine-treated chick embryos. *Neurosci Lett.* 105:1-6.
- Fattori E, Lazzaro D, Musiani P, Modesti A, Aloni T, Ciliberto G (1995) IL-6 expression in neurons of transgenic mice causes reactive astrogliosis and increase in ramified microglial cells but no neuronal damage. *Eur J Neurosci* 7:2441-2449.
- Fernandez-Valle C, Bunge RP, Bunge MB (1995) Schwann cells degrade myelin and proliferate in the absence of macrophages: evidence from in vitro studies of Wallerian degeneration. *J Neurocytol* 24:667-679.

- Fishman SJ and Savitt JM (1998) Selective localization by neuroglia of immunoglobulin G in normal mice. *J Neuropathol Exp Neurol.* 48:212-20.
- Fluegel A, Bradl M (2001) New tools to trace populations of inflammatory cells in the CNS. *Glia* 36(2):125-36.
- Flühmann B, Luber M, Lichtensteiger W, Fischer JA and Born W (1997) Tissue-specific mRNA expression of calcitonin receptor-like receptor during fetal and postnatal development. *Brain Res* 774:184-192.
- Floren A, Land T, Langel U (2000) Galanin receptor subtypes and ligand binding. *Neuropeptides* 34: 331-337.
- Forman DS, Berenberg RA (1978) Regeneration of motor axons in the rat sciatic nerve studied by labelling with axonally transported radioactive proteins. *Brain Res* 156:213-225.
- Gabbott PL, Bacon SJ (1996) Localisation of NADPH diaphorase activity and NOS immunoreactivity in astroglia in normal adult rat brain. *Brain Res.* Apr 1, 714 (1-2):135-144.
- Galiano M, Liu ZQ, Kalla R, Bohatschek M, Koppius A, Gschwendtner A, Xu SL, Werner A, Kloss CUA, Jones LL, Bluethmann H, Raivich G (2001) Interleukin-6 (IL6) and cellular response to facial nerve injury: effects on lymphocyte recruitment, early microglial activation and axonal outgrowth in IL6-deficient mice. *Eur J Neurosci* 14: 327-341.
- Gilad GM, Gilad VH (1983) Polyamine biosynthesis is required for survival of sympathetic neurons after axonal injury. *Brain Res* 273: 191-194.
- Gonzalez-Hernandez T, Rustioni A (1999) Expression of three forms of nitric oxide synthase in peripheral nerve regeneration. *J Neurosci Res.* 55(2):198-207.
- Graeber MB, Kreutzberg GW (1986) Astrocytes increase in glial fibrillary acidic protein during retrograde changes of facial motor neurons. *J Neurocytol* 15:363-374.
- Graeber MB, Kreutzberg GW (1988a) Delayed astrocyte reaction following facial nerve axotomy. *J Neurocytol* 17:209-220.
- Graeber MB, Tetzlaff W, Streit WJ, Kreutzberg GW (1988b) Microglia cells but not astrocytes undergo mitosis following rat facial nerve axotomy. *Neurosci Lett* 85: 317-321.
- Graham RC Jr, Karnovsky MJ (1965) The histochemical demonstration of monoamine oxidase activity by coupled peroxidatic oxidation. *J Histochem Cytochem.* 1965 Sep-Oct;13(7):604-5.
- Gray C, Hukkanen M, Konttinen YT, Terenghi G, Arnett TR, Jones SJ, Burnstock G, Polak JM (1992) Rapid neural growth: calcitonin gene-related peptide and substance P-containing nerves attain exceptional growth rates in regenerating deer antler. *Neuroscience* 50:953-963.
- Gschwendtner A, Liu Z, Hucho T, Bohatschek M, Kalla R, Dechant G, Raivich G (2003) Regulation, cellular localization and function of the p75 neurotrophin receptor (p75NTR) during the regeneration of facial motoneurons *Mol Cell Neurosci.* 24: 307-322.
- Guntinas-Lichius O, Neiss WF, Sculte E, Stennert E (1996) Quantitative image analysis of the chromatolysis in rat facial and hypoglossal motoneurons following axotomy with and without reinnervation. *Cell and Tissue Res* 286:537-541.
- Haas CA, Streit WJ and Kreutzberg GW (1991a) Rat facial motoneurons express increased levels of calcitonin gene-related peptide messenger RNA in response to axotomy. *J. Neurosci. Res.*, 27: 270-275.
- Haas CA, Reddington M and Kreutzberg GW (1991b) Calcitonin gene-related peptide stimulates the induction of c-fos gene expression in rat astrocyte cultures. *Eur. J. Neurosci.*, 3: 708-712.
- Haas C, Reddington M, Kreutzberg G (1991c) Calcitonin gene-related peptide elicits differential expression of early response genes in cultured astrocytes. *Eur. J. Neurosci. Suppl.* 4: 1040.

- Herdegen T, Fiallos-Estrada CE, Schmid W, Bravo R, Zimmermann (1992). The transcription factors c-JUN, JUN D and CREB, but not FOS and KROX-24 are differentially regulated in axotomized neurons following transection of rat sciatic nerve. *BrainResMolRes* 14:155-165.
- Herdegen T, Brecht S, Mayer B, Leah J, Kumer W, Bravo R, Zimermann M (1993) Long-lasting expression of JUN and KROX transcription factors and nitric oxide synthase in intrinsic neurons of the rat brain following axotomy. *J Neurosci.* 13: 4130-4135.
- Hess DT, Patterson SI, Smith DS and Skene JHP (1993) Neuronal growth cone collapse and inhibition of protein fatty acid acylation by nitric oxide. *Nature* 366, 562-565.
- Hickey WF, Hsu BL, Kumura K (1991) T-lymphocyte entry into the central nervous system. *J Neurosci Res* 28:254-260.
- Hirano T, Yasukawa K, Harada H, Taga T, Watanabe Y, Matsuda T, Kashiwamura S, Nakajima K, Koyama K, Iwamatsu A, Tsunawa S, Sakiyama F, Matsue H, Takahara Y, Taniguchi T and Kishimoto T (1986) Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. *Nature* 324:73-76.
- Hirota H, Kiyama H, Kishimoto T, Taga T (1996) Accelerated nerve regeneration in mice by upregulated expression of Interleukin (IL) 6 and IL-6 receptor after trauma. *J Exp Med* 183:2627-2634.
- Hokfelt T, Wiesenfeld-Hallin Z, Villar M, Melander T (1987) Increase of galanin-like immunoreactivity in rat dorsal root ganglion cells after peripheral axotomy. *Neurosci Lett* 83:217-220.
- Holmes FE, Mahoney S, King VR, Bacon A, Kerr NCH, Pachnis V, Curtis R, Priestley JV, Wynick D (2000) Targeted disruption of the galanin gene reduces the number of sensory neurons and their regenerative capacity. *Neurobiology* 97:11563-11568.
- Huang PL, Dawson TM, Brecht DS, Snyder SH and Fishman MC (1993) Targeted disruption of the neuronal nitric oxide synthase gene. *Cell* 75, 1273-1286.
- Huang PL, Lo EH (1998) Genetic analysis of NOS isoforms using nNOS and eNOS knockout animals. *Prog Brain Res* 118:13-25.
- Huang PL (1999) Neuronal and endothelial nitric oxide synthase gene knockout mice. *Braz J Med Biol Res* 32:1353-1359.
- Ide C (1996) Peripheral nerve regeneration. *Neuroscience Research* 25: 101-121.
- Iismaa TP and Shine J (1999) Galanin and galanin receptors. *Results Probl Cell Differ* 26:257-291.
- Ikeda K, Iwasaki Y, Shiojima T, Kinoshita M (1996) Neuroprotective effect of various cytokines on developing spinal motoneurons following axotomy. *J Neurol Sci* 135:109-113.
- Inagaki S, Kito S, Kubota Y, Girgis S, Hillyard CJ, MacIntyre I (1986) Autoradiographic localization of calcitonin gene related peptide binding sites in human and rat brains. *Brain Res.*, 374: 287-298.
- Irani DN, Griffith (1996) Regulation of lymphocyte homing into the brain during viral encephalitis at various stages of infection. *J Immunol* 156: 3850-3857.
- Ishida-Yamamoto A, Tohyama M (1989) Calcitonin gene-related peptide in the nervous tissue. *Prog. Neurobiol.* 33:335-386.
- Iwase K, Iyama KI, Akagi K, Yano S, Fukunaga K, Miyamoto E, Mori M, Takiguchi M (1998) Precise distribution of neuronal nitric oxide synthase mRNA in the rat brain revealed by non-radioisotopic in situ hybridisation. *Mol. Brain Res.* 21, 1161-1165.
- Jansen GB, Torkvist L, Lofgren O, Raud J, Ludeberg T (1999) Effects of calcitonin gene-related peptide on tissue survival, blood flow and neutrophil recruitment in experimental skin flaps. *Br J Plast Surg.* 52:299-303.

- Janzer RC, Raff MC (1987) Astrocytes induce blood-brain barrier properties in endothelial cells. *Nature* 325:253-257.
- Jones LL, Kreutzberg GW, Raivich G (1997) Regulation of CD44 in the regenerating mouse facial motor nucleus. *Eur J Neurosci* 9: 1854-1863.
- Jones LL, Kreutzberg GW, Raivich G (1998) Transforming growth factor beta's 1, 2, 3 inhibit proliferation of ramified microglia on an astrocyte monolayer. *Brain Res.* 795:301-306.
- Jones LL, Liu ZQ, Shen J, Werner A, Kreutzberg GW and Raivich G (2000) Regulation of the cell adhesion molecule CD44 after nerve transection and direct trauma to the mouse brain. *J Comp Neurol* 426:468-492.
- Kalla R, Liu Z, Xu S, Koppius A, Imai Y, Kloss CU, Kohsaka S, Gschwendtner A, Moller JC, Werner A, Raivich G (2001) Microglia and the early phase of immune surveillance in the axotomized facial motor nucleus: impaired microglial activation and lymphocyte recruitment but no effect on neuronal survival or axonal regeneration in macrophage-colony stimulating factor-deficient mice. *J Comp Neurol.* 436:182-201.
- Kaminski A, Pohl CB, Sponholz C, Ma N, Stamm C, Vollmar B, Steinhoff G (2004). Up-regulation of endothelial nitric oxide synthase inhibits pulmonary leukocyte migration following lung ischemia-reperfusion in mice. *Am J Pathol.* Jun;164(6):2241-9.
- Kano T, Shimizu-Samasata M, Huang PL, Moskowitz MA and Lo EH (1998) Effects of nitric oxide synthase gene knock out on neurotransmitter release in vitro. *Neuroscience* 86: 695-699.
- Kiefer R, Lindholm D, Kreutzberg GW (1993) Interleukin-6 and Transforming Growth Factor- β 1 mRNAs are induced in rat facial nucleus following motoneuron axotomy. *Eur J Neurosci* 5:775-781.
- Kitamura K, Kangawa K, Kawamoto M, Ichiki Y, Nakamura S, Matsuo H, Eto T. Adrenomedullin: a novel hypotensive peptide isolated from human pheochromocytoma. (1993) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 192, 553-560.
- Kishimoto T, Akira S, Taga T (1992) Interleukin-6 and its receptors: a paradigm for cytokines. *Science* 258:593-596.
- Klein MA, Möller JC, Jones L, Bluethmann H, Kreutzberg GW, Raivich G (1997a) Impaired neuroglial activation in Interleukin-6 deficient mice. *Glia* 19:227-233.
- Klein MA, Frigg R, Flechsig E, Raeber AJ, Kalinke U, Bluethmann H, Bootz, Suter M, Zinkernagel RM, Aguzzi A (1997b) A crucial role for B cells in neuroinvasive scrapie. *Nature* 390:687-690.
- Kloss CUA, Kreutzberg GW, Raivich G (1997) Proliferation of ramified microglia on an astrocyte monolayer: characterization of stimulatory and inhibitory cytokines. *J Neurosci Res* 49: 248-254.
- Kloss CUA, Werer A, Klein MA, Shen J, Menuz K, Probst JC, Kreutzberg GW, Raivich G (1999) The integrin family of cell adhesion molecules in the injured brain: regulation and cellular localization in the normal and regenerating mouse facial motor nucleus. *J Comp Neurol* 411:162-178.
- Kresse A, Jacobowitz D and Skofitsch G (1992) Distribution of calcitonin gene-related peptide in the central nervous system of the rat by immunocytochemistry and in situ hybridisation histochemistry. *Ann NY Acad Sci* 657: 455-457.
- Kreutzberg GW (1995) Reaction of the neuronal cell body to axonal damage. In Waxman G, Kocsis JD. Stys PK (eds): *The Axon*. New York: Oxford University Press, pp. 355-374.
- Kreutzberg GW (1996a) Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci.* 45 (3): 239-247.
- Kreutzberg GW (1996b) Principles of neuronal regeneration. *Acta Neurochir. Suppl.* 66: 103-106.
- Kreutzberg GW, Raivich G (2000) Neurobiology of Regeneration and Degeneration. In May M and Schaitkin BM (eds): *The facial nerve*. Thieme, pp.65-77.

- Kruger L, Mantyh PW, Sternini C, Brecha NC, Mantyh CR (1988) Calcitonin gene-related peptide (CGRP) in the rat nervous system: patterns of immunoreactivity and receptor binding sites. *Brain Res* 463:223-244.
- Kumar SM, Porterfield DM, Muller KJ, Smith PJ, Sahley CL. (2001) Nerve injury induces a rapid efflux of nitric oxide (NO) detected with a novel NO microsensor. *J Neurosci.* ;21(1):215-20.
- Kyrkouli SE, Stanley BG, Leibowitz SF (1986) Galanin: stimulation of feeding induced by medial hypothalamic injection of this novel peptide. *Eur. J Pharmac.* 122 :159-160.
- Lazar P, Reddington M, Streit W, Raivich G and Kreutzber GW (1991) The action of calcitonin-gene related peptide on astrocyte morphology and cyclic AMP accumulation in astrocyte cultures from neonatal rat brain. *Neurosci. Lett.*, 130: 99-102.
- LeBeau JM, Liuzzi FJ, Depto AS, Vinik AL (1994) Differential laminin gene expression in dorsal root ganglion neurons and nonneuronal cells. *Experimental Neurology* 127: 1-8.
- Lefcort F, Venstrom K, McDonal JA, Reichardt LF (1992) Regulation and expression of fibronectin, and its receptor, alpha 5 beta 1, during development and regeneration of peripheral nerve. *Development* 116:767-782.
- Lefler DJ, Jones SP, Girod WG, Baines A, Grisham MB, Cockrell AS, Huang PL, Scalia R.(1999) Leukocyte-endothelial cell interactions in nitric oxide synthase-deficient mice. *Am J Physiol.* 276(6 Pt 2):H1943-50.
- Legos JJ, Whitmore RG, Erhardt JA, Parson AA, Tuma RF, Barone FC (2000) Quantitative changes in interleukin proteins following focal stroke in the rat. *Neurosci Lett* 282:189-192.
- Lepekin EA, Eliasson C, Berthold CH, Berezin V, Bock E, Pekny M (2001) Intermediate filaments regulate astrocyte motility. *J Neurochem* 79(3):617-25.
- Lindholm D, Heumann R, Meyer M, Thoenen H (1987) Interleukin-1 regulates synthesis of nerve growth factor in non-neuronal cells of rat sciatic nerve. *Nature* 330 (6149): 658-659.
- Ling EA, Wong WC (1993) The origin and nature of ramified and amoeboid microglia: a historical review and current concepts. *Glia* 7:9-18.
- Liu J, Chen M, Wang X (2000) Calcitonin gene-related peptide inhibits lipopolysaccharide-induced interleukin-12 release from mouse peritoneal macrophages, mediated by the cAMP pathway. *Immunology* 101:61-67.
- Liu ZQ, Bohatschek M, Pfeffer K, Bluethmann H, Raivich G (2005) Major histocompatibility complex (MHC2+) perivascular macrophages in the axotomized facial motor nucleus are regulated by receptors for interferon-gamma (IFN γ) and tumor necrosis factor (TNF). *Neuroscience.* 131(2):283-92.
- Loddick SA, Turnbull AV, Rothwell NJ (1998) Cerebral Interleukin-6 is neuroprotective during permanent focal cerebral ischemia in the rat. *J Cerebral Blood Flow and Metabolism* 18: 176-179.
- Lotz M, Jirik F, Kabouridis P, Tsoukas C, Hirano T, Kishimoto T, Carson DA (1988) B cell stimulation factor/interleukin 6 is a costimulant for human thymocytes and T lymphocytes. *J Exp Med* 167.1253-1258.
- Lunn ER, Perry VH, Brown MC, Rosen H, Gordon S (1989) Absence of Wallerian degeneration does not hinder regeneration in peripheral nerve. *Eur J Neuroscience* 1:27-33.
- Luo Y, Raper JA (1994) Inhibitory factors controlling growth cone motility and guidance. *Curr Opin Neurobiol* 4: 648-654
- Lux HD, Schubert P (1975) Some aspects of the electroanatomy of dendrites. *Adv. Neurol.* 12:29-44.
- Mahoney SA, Hosking R, Farrant S, Holmes FE, Jacoby AS, Shine J, Iismaa TP, Scott MK, Schmidt R, Wynick D (2003) The second galanin receptor GalR2 plays a key role in neurite outgrowth from adult sensory neurons. *J Neurosci.* 15:416-21.
- Mallee JJ, Salvatore CA, LeBourdelle B, Oliver KR, Longmore J, Koblan KS and Kane SA (2002) RAMP1 determines the species selectivity of non-peptide CGRP receptor antagonists. *J Biol Chem* 277:14294-14298.

- Marletta MA (1994) Nitric oxide synthase aspects concerning structure and catalysis. *Cell* 78:927-930.
- Martini R (1994) Expression and functional roles of cell surface molecules and extracellular matrix components during development and regeneration of peripheral nerves. *J Neurocytol* 23:1-28.
- McGovern FH and Estevez J (1980), The use of cromolyn sodium in the prevention of nerve degeneration in Bell's palsy. *Laryngoscope* 90:1640-1645.
- McGillis JP, Humphreys S, Rangnekar V, Ciallella J (1993) Modulation of B lymphocyte differentiation by calcitonin gene-related peptide (CGRP). Characterization of high-affinity CGRP receptors on murin 70Z/3 cells. *Cell. Immunol.* 150: 391-404.
- Mason IJ and Mudge AW (1992) Onset of CGRP expression and its restriction to a subset of spinal motor neuron pools in the chick embryo is not affected by treatment with curare. *Neurosci Lett* 138:128-132.
- Menet V, Ribotta MGY, Sandillon F, Privat A (2000) GFAP null astrocytes are a favourable substrate for neuronal survival and neurite growth. *Glia* 17: 267-272.
- Minghetti L, Levi G (1998) Microglia as effector cells in brain damage and repair: focus on prostanoids and nitric oxide. *Prog. Neurobiol.* 54, 99-125.
- Möller JC, Klein MA, Haas S, Jones LL, Kreutzberg GW, Raivich G (1996) Regulation of thrombospondin in the regenerating mouse facial motor nucleus. *Glia* 17:121-132
- Moon LDF, Brecknell JE, Franklin RJM, Dunnett SB, Fawcett JW (2000) Robust regeneration of CNS axons through a track depleted of CNS glia. *Exp Neurol* 161: 49-66.
- Moore R. (1989) Cranial motor neurons contain either galanin- or calcitonin gene-related peptide like immunoreactivity. *J. Comp. Neurol.*, 282 : 512-522.
- Moreno MJ, Teron JA, Stanimirovic DB, Doods H and Hamel E (2002) Characterization of calcitonin gene-related peptide (CGRP) receptors and their receptor-activity-modifying proteins (RAMPs) in human brain microvascular and astroglial cells in culture. *Neuropharmacology* 42: 270-280.
- Morris H, Panico M, Etienne T, Tippins J, Girgis S, MacIntyre J (1984) Isolation and characterization of human calcitonin gene-related peptide. *Nature* 308:746-748.
- Muff R, Born W and Fischer JA (2001) Adrenomedullin and related peptides: receptors and accessory proteins. *Peptides* 22: 1765-1772.
- Murphy PG, Grondin J, Altares M, Richardson PM (1995) Induction of interleukin-6 in axotomized sensory neurons. *J Neurosci* 15:5130-5138.
- Murphy PG, Borthwick LS, Johnston RS, Kuchel G, Richardson PM (1999) Nature of retrograde signal from injured nerves that induces interleukin-6 mRNA in neurons. *J. Neurosci.* 19:3791-3800.
- Murphy S (2000) Production of nitric oxide by glial cells: regulation and potential roles in the CNS. *Glia* 29, 1-4.
- Nathan C and Xie Q-W (1994) Nitric oxide synthases: roles, tolls and controls. *Cell* 78:915-918.
- Noguchi K, Seneba E, Morita Y, Sato M, Tohyama M (1990) α -CGRP and β -CGRP mRNAs are differentially regulated in the rat spinal cord and dorsal root ganglion. *Mol Brain Res* 7:299-304
- O'Donnell D, Ahmad S, Wahlestedt C, Walzer P (1999) Expression of the novel galanin receptor subtype GalR2 in the adult CNS: distinct distribution from GalR1. *J Comp. Neurol* 409:469-81.
- Oermann E, Bidmon HJ, Mayer B, Zilles K (1999) Differential maturational patterns of nitric oxide synthase-I and NADPH diaphorase in functionally distinct cortical areas of the mouse cerebral cortex. *Anat Embryol* 200: 27-41.
- Ohara S, Takahashi H, Ikuta F (1986) Ultrastructural alterations of perineurial cells in the early stage of Wallerian degeneration. *Lab Invest.* 54(2):213-21.

- O'Meara G, Coumis U, Ma SY, Kehr J, Mahoney S, Bacon A, Allen SJ, Holmes F, Kahrl U, Wang FH, Kerans IR, Ove-Ogren S, Dawbarn D, Mufson EJ, Davies C, Dawson G, Wynick D (2000) Galanin regulates the postnatal survival of a subset of basal forebrain cholinergic neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:11569-11574.
- Ottlecz A, Samson WK, McCann SM (1986) Galanin: evidence for a hypothalamic site of action to release growth hormone. *Peptides* 7:51-53.
- Paakkari I, Lindsberg P (1995) Nitric oxide in the central nervous system. *Ann Med* 27:369-377.
- Paschen W (1992) Polyamine metabolism in different pathological states of the brain. *Mol Chem Neuropathol*. 16: 241-271.
- Penkowa M, Moos T, Carrasco J, Hadberg H, Molinero A, Bluethmann H, Hidalgo J (1999) Strongly compromised inflammatory response to brain injury in interleukin-6-deficient mice. *Glia* 25:343-357.
- Pekny M, Stanness KA, Eliasson C, Besholtz C, Janigro D (1998), Impaired induction of blood-brain barrier properties in aortic endothelial cells astrocytes from GFAP-deficient mice. *Glia* 22:390-400.
- Pekny M, Johansson CB, Eliasson C, Stakeberg J, Wallen A, Perlmann T, Lendahl U, Betsholtz C, Berthold CH, Frisen J. (1999) Abnormal reaction to central nervous system injury in mice lacking glial fibrillary acidic protein and vimentin. *J Cell Biol* 145:503-514.
- Pekny M, Nilsson M (2005) Astrocyte activation and reactive gliosis. *Glia*. Jun;50(4):427-34.
- Perez SE, Wynick D, Steiner RA, Mufson EJ (2001) Distribution of galaninergic immunoreactivity in the brain of the mouse. *J Comp Neurol* 434 :158-185.
- Popper P and Micevych PE (1989) The effect of casraion on cacitonin gene-related peptide in spinal motor neurons. *Neuroendocrinology* 50:338-343.
- Prado MA, Evans-Bain B, Dickerson IM (2002) Receptor component protein (RCP): a member of a multi-protein complex required for G-protein-coupled signal transduction. (2002) *Biochem Soc Trans* 30:460-464.
- Pryce G, Male D, Campell I, Greenwood J (1997) Factors controlling T-cell migration across rat cerebral endothelium in vitro. *J Neuroimm.* 75: 84-94.
- Priller J, Haas CA, Reddington M, Kreutzberg GW (1998) Cultured astrocytes express functional receptors for galanin. *Glia* 24:323-328.
- Raivich G, Domoulin FL, Streit WJ, Kreutzberg GW (1992) Calcitonin gene-related peptide in the regenerating rat sciatic nerve. *Restorative Neurology and Neuroscience* 4:107-115.
- Raivich G, Kreutzberg GW (1993) Peripheral nerve regeneration: role of growth factors and their receptors. *Int. J Devl Neuroscience*, Vol.11, No.3, pp. 311-324.
- Raivich G, Kreutzberg GW (1994a) Pathophysiology of glial growth factor receptors. *Glia* 11:129-146.
- Raivich G, Moreno-Flores MT, Möller JC, Kreutzberg GW (1994b). Inhibition of posttraumatic microglial proliferation in a genetic model of macrophage colony-stimulating factor deficiency in the mouse. *Eur J Neurosci* 6:1615-1618.
- Raivich G, Reddington M, Haas CA, Kreutzberg GW (1995) Peptides in motoneurons. In: *Neuropeptides in the spinal cord*. Nyberg F, Sharma HS, Wiesenfeld-Hallin Z (eds.) *Progress in Brain Research* Vol. 104.
- Raivich G, Bluethmann H, Kreutzberg GW (1996) Signaling molecules and neuroglial activation in the injured central nervous system. *Keio J Med.* 1996 Sep;45(3):239-47.
- Raivich G, Haas S, Werner A, Klein MA, Kloss CUA, Kreutzberg GW (1998a) Regulation of MCSF receptors on microglia in the normal and injured central nervous system: a quantitative immunofluorescence study using confocal laser microscopy. *J Comp Neurol* 395:342-358.

Raivich G, Jones LL, Kloss CUA, Werner A, Neumann H, Kreutzberg GW (1998b) Immune surveillance in the injured nervous system: T-lymphocytes invade the axotomized mouse facial motor nucleus and aggregate around sites of neuronal degeneration. *J Neurosci* 18:5804-5816.

Raivich G, Bohatschek M, Kloss CUA, Werner A, Jones LL, Kreutzberg GW (1999a) Neuroglial activation repertoire in the injured brain: graded response, molecular mechanisms and cues to physiological function. *Brain Res Rev* 30:77-105.

Raivich G, Galiano M, Gschwendtner A, Jones LL, Kloss CUA, Werner A, Pfeffer K, Bluethmann H, Kreutzberg GW (1999b) Lymphocyte infiltration in the injured brain: role of proinflammatory cytokines IL1, IL6 and TNF α . *Soc Neurosci Abstr* 25: 1536.

Raivich G, Kreutzberg GW (2000) Inflammatory Response Following Nerve Injury; in: Axonal regeneration in the central nervous system. Ingoglia NA, Murray M (eds) Marcel Dekker, New York.

Raivich G (2002a), Cell recruitment in the axotomized facial nucleus: role of cytokines, chemokines and cell adhesion molecules. In: Universes in delicate balance: Chemokines and the nervous system. Ransohoff RM, Suzuki AEI, Proudfoot WF, Hickey WF, Harrison JK (eds). Elsevier Science 203-215.

Raivich G, Liu ZQ, Kloss CU, Labow M, Bluethmann H, Bohatschek M (2002b). Cytotoxic potential of proinflammatory cytokines deletion of TNF receptors and TNFR1 and TNFR2 prevents motoneuron cell death after facial axotomy in adult mouse. *Exp Neurol* 178:186-93.

Raivich G, Bohatschek M, Werner A, Jones LL, Galiano M, Kloss CU, Zhu XZ, Pfeffer K, Liu ZQ (2003) Lymphocyte infiltration in the injured brain: role of proinflammatory cytokines. *J Neurosci Res.* 72(6):726-33.

Reichert F, Saada A, Rotshenker S (1994) Peripheral nerve injury induces Schwann cells to express two macrophage phenotypes: phagocytosis and the galactose-specific lectin MAC2. *J Neurosci* 14:3231-3245.

Reichert F, Levitzky R, Rotshenker S (1996) Interleukin 6 in intact and injured mouse peripheral nerves. *Eur J Neurosci* 8:530-535.

Rethelyi M, Metz CB, Lund PK. (1989) Distribution of neurons expressing calcitonin gene-related peptide mRNAs in the brain stem, spinal cord and dorsal root ganglia of rat and guinea-pig. *Neurosci* 29: 225-239.

Richter J, Andersson R, Edvinsson L, Gullberg U (1992) Calcitonin gene-related peptide (CGRP) activates human neutrophil-Inhibition by chemotactic peptide antagonist BOC-MLP. *Immunology* 77: 416-421.

Ridet JL, Malhotra SK, Privat A, Gage FH (1997) Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function. *Trends Neurosci.* 20: 570-577.

Saada A, Reichert F, Rotshenker S (1996) Granulocyte macrophage stimulating factor produced in lesioned peripheral nerves induces the up-regulation of cell surface expression of MAC-2 by macrophages and Schwann cells. *J Cell Biol* 133:159-167.

Saika T, Seneba E, Noguchi K, Sato M, Kubo T, Matsunaga T and Tohyama M (1991) Changes in expression of peptides in rat facial motoneurons after facial nerve crushing and resection. *Brain Res Mol Brain Res* 11 :187-196.

Saika T, Kiyama H, Tohyama M, Matsunaga T (1993) GAP-43 mRNA expression in facial motoneurons during regeneration: in situ hybridization histochemistry study using an alkaline phosphatase labelled probe. *Acta Otolaryngol Suppl* 501: 80-84.

Sanz MJ, Hickey MJ, Johnston B, McCafferty DM, Raharjo E, Huang PL, Kubes P.(2001) Neuronal nitric oxide synthase (NOS) regulates leukocyte-endothelial cell interactions in endothelial NOS deficient mice. *Br J Pharmacol.* ;134(2):305-12.

Schafer M, Fruttiger M, Montag D, Schachner M, Martini R (1996) Disruption of the gene for the myelin-associated glycoprotein improves axonal regrowth along myelin in C57BL/Wlds mice. *Neuron.* Jun;16(6):1107-13.

- Schafer KH, Mestres P, Marz P, Rose-John S. (1999) The IL-6/sIL-6R fusion protein hyper-IL-6 promotes neurite outgrowth and neuron survival in cultured enteric neurons. *J Interferon Cytokine Res.* May;19(5):527-32.
- Schmidt HHHW and Walter U (1994) NO at work. *Cell* 78:919-925.
- Schreiber RC, Hyatt-Sachs H, Bennett TA, Zigmond RE (1994) Galanin expression increases in adult rat sympathetic neurons after axotomy. *Neuroscience* 60:17-27.
- Schuman EM and Madison DV (1991) Nitric oxide and synaptic function. *Annu.Rev.Neurosci.* 17,153-183.
- Schwab ME (1990) Myelin-associated inhibitors of neurite growth and regeneration in the CNS. *Trends Neurosci.* 13:452-456
- Schwaiger FW, Schmitt GH, Horvat A, Hager G, Streif R, Spitzer C, Gamal S, Breuer S, Brook GA, Nacimient W and Kreutzberg GW (2000) Peripheral but not central axotomy induces changes in Janus Kinases (JAK) and signal transducers and activators and transcription (STAT). *Eur J Neurosci* 12:1165-1176.
- Schmitt AB, Breuer S, Liman J, Buss A, Schlangen C, Pech K, Hol EM, Brook GA, Noth J, Schwaiger FW (2003) Identification of regeneration-associated genes after central and peripheral nerve injury in the adult rat. *BMC neurosci* 19;4(1):8.
- Seiler N (2000) Oxidation of polyamines and brain injury. *NeurochemRes* 25: 471-490.
- Seilheimer B, Schachner M (1988) Studies of adhesion molecules mediating interactions between cells of peripheral nervous system indicate a major role for L1 mediating sensory neuron growth on Schwann cells in cultures. *J Cell Biol* 107: 341-351.
- Sendtner M, Gotz R, Holtmann B, Thoenen H (1997) Endogenous ciliary neurotrophic factor is a lesion factor for axotomized motoneurons in adult mice. *J Neurosci* 17:6999-7006.
- Sexton PM, Albiston A, Morfis M and Tilakaratne N (2001) Receptor activity modifying proteins. *Cell Signal* 13: 73-83.
- Shadiack AM, Zigmond RE (1998) Galanin induced in sympathetic neurons after axotomy is anterogradely transported toward regenerating nerve endings. *Neuropeptides* 32: 257-264.
- Siebert H, Sachse A, Kuziel WA, Bruck W (1999) Reduced macrophage recruitment after Wallerian degeneration in mice lacking the chemokine receptor CCR2. *Proceedings of the 27th Göttingen Neurobiology Conference* (Elsner N, Eysel U, eds), Thieme, Stuttgart/ NY, Vol II, p.773.
- Skene JH (1989) Axonal growth-associated proteins. *Annu Rev Neurosci.* 12: 127-156.
- Skofitsch G and Jacobowitz D (1985) Calcitonin gene-related peptide: detailed immunohistochemical distribution in the central nervous system. *Peptides* 6:721-745.
- Stamler JS (1994) Redox signalling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. *Cell* 78:932-936.
- Steenbergh P, Höppener J, Zandberg J, Lips C, Jansz H (1985) A second human calcitonin/ CGRP gene. *FEBS Lett* 183:403-407.
- Sternberger LA, Sternberger NH (1986) The unlabeled antibody method: comparison of peroxidase-antiperoxidase with avidin-biotin complex by a new method of quantification. *J Histochem Cytochem*;34(5)
- Stoll G, Trapp BD, Griffin JW (1985) Macrophage function during Wallerian degeneration of rat optic nerve: clearance of degenerating myelin and Ia expression. *J Neurosci* 9:2327-2335.
- Stoll G, Griffin JW, Li CY, Trapp BD (1989) Wallerian degeneration in the peripheral nervous system: participation of both Schwann cells and macrophages in myelin degradation. *J Neurocytol.* Oct;18(5):671-83.

Streit WJ, Semple-Rowland L, Hurley SD, Miller RC, Popovich PG, Stokes BT (1998) Cytokine mRNA profiles in contused spinal cord and axotomized facial nucleus suggest a beneficial role for inflammation and gliosis. *Exp Neuro* 152:74-87.

Streit WJ, Hurley SD, McGaw TS and Semple-Rowland SL (2000) Comparative evaluation of cytokine profiles and reactive gliosis supports a critical role for interleukin-6 in neuron-glia signalling during regeneration. *J Neurosci Res* 61:10-20.

Sugiura S, Lahav R, Han J, Kou SY, Banner LR, de Pablo F, Patterson PH (2000) Leukaemia inhibitory factor is required for normal inflammatory responses to injury in the peripheral and central nervous systems in vivo and is chemotactic for macrophages in vitro. *Eur J Neurosci* 12: 457-456.

Sun Y and Zigmond RE (1996) Leukaemia Inhibitory Factor induced in the sciatic nerve after axotomy is involved in the induction of Galanin in sensory neurons. *Eur J Neurosci* 8:2214-2220.

Tadamitsu K, Shizuo A, Tetsuya T (1992) Interleukin-6 and its receptor: a paradigm for cytokines. *Science*, 258, 593-597.

Taga T and Kishimoto T (1997) gp 130 and the interleukin-6 family of cytokines. *Annu.Rev.Immunol.* 15, 797-819.

Tanaka E, Sabry (1995) Making the connection: cytoskeletal rearrangements during growth cone guidance. *Cell* 83:171-176.

Tetzlaff W, Kreutzberg GW (1984) Enzyme changes in the rat facial nucleus following a conditioning lesion. *85: 547-564.*

Tetzlaff W, Kreutzberg GW (1985) Ornithine decarboxylase in motoneurons during regeneration. *Exp Neurol* 89: 679-688.

Tetzlaff W, Bisby MA, Kreutzberg GW (1988). Changes in cytoskeletal proteins in the rat facial nucleus following axotomy. *J Neurosci.* 8:3181-3189.

Thier M, Marz P, Otten U, Weis J, Rose-John S. (1999) Interleukin-6 (IL-6) and its soluble receptor support survival of sensory neurons. *J Neurosci Res.* Feb 15;55(4):411-22.

Tsacopoulos M, Magistretti PJ (1996) Metabolic coupling between glia and neurons. *J Neurosci* 16:877-885.

Van Rossum D, Hanisch U-K, Quiron R (1997) Neuroanatomical localization, pharmacological characterization and functions of CGRP, related peptides and their receptors. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews.* 21:649-678.

Van Wagoner NJ, Benveniste EN (1999) Interleukin-6 expression and regulation in astrocytes. *J Neuroimmunology* 100:124-139.

Vougioukas VI, Roeske S, Michel U, Bruck W (1998) Wallerian degeneration in ICAM-1-deficient mice. *Am J Pathol* 152:241-249.

Wang F, Millet I, Bottomly K, Vingery A (1992) Calcitonin gene-related peptide inhibits interleukin 2 production by murine T lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 267: 21052-21057.

Wang S, Hashemi T, Fried S, Clemmons AL, Hawes BE (1998) Differential G-Protein-coupling profiles of the GalR1 and GalR2 Galanin Receptors. In: *Galanin: basic research discoveries and therapeutic implications* (Hökfelt T, Bartfai T, Crawley JS - eds.). *Ann NY Aca Sci.* 863:457-459.

Waters SM, Krause JE (2000) Distribution of galanin-1, -2 and -3 receptor messenger RNAs in central and peripheral rat tissues. *Neuroscience* 95:265-271.

Wei X-Q, Charles IG, Smith A, Ure J, Feng G-J, Huang F-P, Damo X, Muller W, Moncada S, Liew FY (1995) Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Nature* 375:408-411.

Werner A, Kloss CUA, Walter J, Kreutzberg GW (1998) Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in the mouse facial motor nucleus after axonal injury and during regeneration. *J Neurocytol* 27:219-232.

Werner A, Galiano M, Mayer U, Kreutzberg GW, Raivich G (1999) Molecular constituents of regenerating . growth cones of mouse facial motoneurons. *Ann. Anat* 181:323

Werner A, Willem M, Jones LL, Kreutzberg GW, Mayer U, Raivich G (2000) Impaired axonal regeneration in alpha 7 integrin-deficient mice. *J Neurosci* 22: 59-70.

Wiencken, AE, Casagrande V (1999) Endothelial nitric oxide synthetase (eNOS) in astrocytes: another source of nitric oxide in neocortex. *Glia* 26, 280-290.

Wiesenfeld-Hallin Z, Xu X-J (2001) Neuropeptides in neuropathic and inflammatory pain with special emphasis on cholecystokinin and galanin. *Eur. J Pharmacology* 429:49-59.

Williams PL and Hall SM (1970) In vivo observations on mature myelinated nerve fibres of the mouse. *J Anat.* Jul;107.

Williams, CV, Nordquist D and Mc Loon, SC (1994) Correlation of nitric oxide synthase expression with changing patterns of axonal projections in the developing visual system. *J. Neurosci.* 14, 1746-1755.

Wrenn CC and Crawley JN (2001) Pharmacological evidence supporting a role for galanin in cognition and affect. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. And Biol. Psychiat.* 25:283-299.

Yamin M, Gorn AH, Flannery MR, Jenkins NA, Gilbert DJ, Copeland NG, Tapp DR, Krane SM and Goldring SR (1994) Cloning and characterization of mouse brain calcitonin receptor complementary deoxyribonucleic acid and mapping of the calcitonin receptor gene. *Endocrinology* 135:2635-2643.

Yao GL, Kato H, Khalil M, Kiryu S, Kiyama H (1997) Selective upregulation of cytokine receptor subchain and their intracellular signalling molecules after peripheral nerve injury. *Eur J Neurosci.* May;9(5):1047-54.

Zhong J, Dietzel ID, Wahle P, Kopf M, Heumann R (1999) Sensory impairments and delayed regeneration of sensory axons in interleukin-6-deficient mice. *J Neurosci.* 19(11):4305-4313

Lebenlauf

1970 Geboren in München

Schulische Ausbildung

1976-1980 Grundschule an der Camerloherstrasse, München
1980-1989 Ludwigsgymnasium, München (humanistischer Zweig)

Universitäre Ausbildung

Studium der Philosophie und Theologie

1991-1997 Hochschule für Philosophie S.J. München (Philosophie und Theologie)
1991-1993 Grundstudium der Philosophie und der Theologie
1993 Bakkalaureat in Philosophie mit Erweiterung der Theologie
1993-1995 Gasthörerstatus an der Hochschule für Philosophie S.J.
1995-1997 Hauptstudium in Philosophie
1997 Magister in Philosophie (Schwerpunkt Ontologie, Anthropologie)

Studium der Humanmedizin

1992 Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
1992-1995 Vorklinik
1995 Physikum
1995-1996 Erster klinischer Abschnitt
1996 1. Staatsexamen
1996-2000 Zweiter klinischer Abschnitt
1998 Beginn der Doktorarbeit am Max-Planck Institut für Neurobiologie, Abteilung Neuromorphologie (Prof. Kreuzberg), in Martinsried bei München
2000 2. Staatsexamen Humanmedizin
2000 Stipendiat des Harvard Medical School - Ludwig-Maximilians-Universität Austausch Programms für das Praktische Jahr
2001 3. Staatsexamen Humanmedizin

Klinisch ärztliche Tätigkeit

2002-2006 Assistenzarzt im Fach Pädiatrie der Universitätskinderklinik Erlangen
2006-2007 Intensivmedizinische Rotation in der Kinderklinik Augsburg
2007 Assistenzarzt im Fach Pädiatrie der Universitätskinderklinik Erlangen

Berufsassoziierte Tätigkeiten

- 1989-1991 Zivildienst in der Friedrich-Husemann-Klinik für Psychiatrie und Neurologie, Buchenbach bei Freiburg i. Brsg./ Deutschland
- 1996-2000 Famulaturen:
Inneren Medizin, Hafenkrankehaus, Hamburg
Inneren Medizin, Anästhesie und Notfallmedizin, Conradiekrankenhaus, Kapstadt/ Südafrika
Inneren Medizin, Worchestershire/ Groß Britannien
Pathologie der Ludwig-Maximilians-Universität, München
Psychiatrie, Sanatorium Kilchberg/ Schweiz
Pädiatrie, Dr. von Haunersches Kinderspital, München
Neurologie, Hospedale Maggiore, Bologna/ Italien
- 2000-2001 Praktisches Jahr:
Harvard Medical School (Innere Medizin, Pädiatrie)
Dr. von Haunersches Kinderspital, München (Pädiatrie)
Ostschweizer Kinderspital, St. Gallen/ Schweiz (Kinderchirurgie)

Auslandsaufenthalte im Rahmen wissenschaftlicher Tätigkeit

- 1999 Case Western University, Department of Neuroscience, Cleveland/ Ohio/ USA
Houston Medical School, Department of Neuroscience, Medical Branch Galvaston/ Texas/ USA
Massachusetts General Hospital Cardiovascular Research Centre, Boston/ USA
Institut Pasteur, Department of Neuroscience, Paris/ Frankreich
- 2001-2002 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am University College London, Department of Obstetrics and Gynaecology, Perinatal Brain Repair Group, Leiter Prof. Dr. G. Raivich

Weitere ausbildungsassoziierte Auslandsaufenthalte

- 1989 Università per stranieri, Perugia/ Italien
1991 University of Central London
1992/ 1993 Humanitäres Hilfsprojekt, Waldaj, Russland

Danksagung

Mein Dank gilt allen voran Herrn Professor Kreutzberg, dem Leiter der ehemaligen Abteilung für Neuromorphologie des Max-Planck Instituts für Neurobiologie, für die großzügige Unterstützung und Förderung und für das entgegengebrachte Vertrauen.

Mein persönlicher Dank gilt Herrn Professor Raivich, meinem Arbeitsgruppenleiter, der mir in den Jahren unserer wissenschaftlichen Zusammenarbeit mit seinem herausragenden fachlichen Wissen und seinen wertvollen Hinweisen den Weg zur Vollendung der Arbeit geebnet hat. Ein immerwährender Garant für Produktivität und kontroverse Diskussionen.

Ich danke Herrn Professor Zigmond (Case Western Reserve University, Cleveland, Ohio, USA), Herrn Professor Wimalawansa (University of Texas, Medical Branch, Galveston, USA), Herrn Professor Changeux (Institut Pasteur, Paris, Frankreich) und Herrn Professor Huang (Massachusetts General Hospital Cardiovascular Research Center, Boston/ USA) durch deren großzügige Kollaboration diese Arbeit mit ermöglicht wurde.

Darüber hinaus danke ich im besonderen meinen ehemaligen Mitdoktoranden für ihre stete Unterstützung, allen voran Marion Bohatschek und Alexander Werner, der technischen Assistentin unseres Labors Andrea Koppius für die fantastische Organisation und natürlich auch den andern ehemaligen Mitarbeitern der Abteilung für Neuromorphologie, die durch Ihre überaus freundliche und kollegiale Art das wissenschaftliche Arbeiten auch immer in einer heiteren und entspannten Atmosphäre ermöglicht haben.

Widmung

Die Arbeit sei gewidmet meinen Eltern und meiner Familie zum Dank für Ihre immerwährende Unterstützung.