

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN
Max-Planck-Institut für Neurobiologie, Martinsried
Ehemalige Abteilung Neuromorphologie

ehemaliger Leiter der Abteilung:
apl. Prof. Dr. Dr.h.c. (MU Szeged) G. W. Kreutzberg

Einfluß proinflammatorischer Zytokine auf entzündliche Prozesse im axotomierten Fazialiskern

Marion Bohatschek

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. G. A. Häcker

3. Univ.-Prof. Dr. J. Schlegel

Die Dissertation wurde am 16.12.2008 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 24.03.2010 angenommen.

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	3
1. EINLEITUNG	7
1.1 Reaktion des Zentralen Nervensystems auf Verletzung	7
1.2 Zentrale Reaktionen auf periphere Durchtrennung des Nervus facialis	7
1.2.1 <i>Neuronale Reaktion nach Fazialisaxotomie</i>	8
1.2.2 <i>Mikrogliale Reaktion nach Fazialisaxotomie</i>	10
1.2.3 <i>Rekrutierung hämatogener Immunzellen nach Fazialisaxotomie</i>	14
1.2.3.1 <i>Blut-Hirn-Schranke</i>	14
1.2.3.2 <i>Einwanderung von Lymphozyten</i>	14
1.3 Molekulare Basis der Entzündungsreaktion nach Fazialisaxotomie	16
1.3.1 <i>Proinflammatorische Zytokine</i>	16
1.3.1.1 <i>Tumor Necrosis Factor alpha</i>	17
1.3.1.2 <i>Interleukin 1</i>	18
1.3.1.3 <i>Interferon gamma</i>	19
1.3.2 <i>Mechnismus der Antigen-Präsentation: MHC1 und B7-2</i>	20
1.3.3 <i>Lipopolysaccharide</i>	21
1.4 Zielsetzung der Arbeit	23
2. MATERIAL UND METHODEN	25
2.1 Tierexperimentelle Modelle	25
2.1.1 <i>Durchtrennung des Nervus facialis</i>	25
2.1.2 <i>Systemische Applikation von Lipopolysaccharid</i>	27
2.1.3 <i>Markierung hämatogener Leukozyten durch Rhodamine</i>	27
2.1.4 <i>Beurteilung der Blut-Hirnschranke durch systemische Injektion von humanem Serumalbumin</i>	28
2.2 Gewebepräparation und Gewebefixierung	28
2.2.1 <i>Gewebeaufbereitung für Licht- und Fluoreszenzmikroskopie</i>	28
2.2.2 <i>Gewebeaufbereitung für Elektronenmikroskopie</i>	29
2.3 Lichtmikroskopische Histologie	29
2.3.1 <i>Nissl-Färbung für die Bestimmung der Neuronenzahl</i>	29
2.3.2 <i>Immunhistochemische Färbung mit dem ABC/DAB-System und Titration der Antikörper</i>	30
2.3.3 <i>Kobalt-Nickel verstärkte DAB Färbung</i>	31
2.3.4 <i>Nachweis von neutrophilen Granulozyten mittels endogener Peroxidase</i> . 31	

2.3.5	Quantifizierung der Immunreaktivität (Mean-SD Algorithmus)	31
2.3.6	Statistische Auswertung der Gesamt-Immunreaktivität	33
2.4	Fluoreszenz Immunhistochemie	33
2.4.1	Immunfluoreszenz - Doppelmarkierungen	33
2.4.2	Konfokale Laser Scanning Mikroskopie	34
2.4.2.1	Digitale Extraktion der Autofluoreszenz	35
2.4.2.2	Zelltypspezifische Quantifizierung von Immunreaktivität (DIFF-RISC – Algorithmus)	36
2.4.2.3	Statistische Auswertung	38
2.5	Elektronenmikroskopie	38
2.5.1	Immunhistochemie für Elektronenmikroskopie	38
2.5.2	Darstellung von neutrophilen Granulozyten mittels endogener Peroxidase	38
2.6	Quantifizierung von Zellzahlen und mikroglialen Knötchen	39
2.6.1	Zählung mikroglialer Knötchen	39
2.6.2	Bestimmung der Zahl MHC2-positiver perivaskulärer Makrophagen	39
2.6.3	Bestimmung der Neuronenzahl im Nucleus facialis	39
2.6.4	Bestimmung der Granulozyten- und Lymphozytenzahlen	40
2.7	Materialien	41
2.7.1	Versuchstiere	41
2.7.2	Antikörper, Tierseren, Immunreagenzien	43
2.7.3	Lösungen, Puffer	44
2.7.4	Chemikalien	45
3.	ERGEBNISSE	47
3.1	Der Einfluß proinflammatorischer Zytokine auf das neuronale Überleben nach Fazialisaxotomie	47
3.1.1	Nachweis $\alpha\chi\beta 2$ /IBA1 positiver Mikroglia – Knötchen	47
3.1.2	Motoneuronenzahl am Tag 29 in Zytokin-Rezeptor defizienten Tieren	49
3.2	Der Einfluß proinflammatorischer Zytokine auf die MHC- Klasse-1 - Expression nach Fazialisaxotomie	52
3.2.1	MHC1 Expression im normalen und axotomierten Fazialiskern	52
3.2.2	Zelluläre Lokalisation der MHC1 Immunreaktivität	52
3.2.3	Zeitverlauf der MHC 1-Immunreaktivität nach Axotomie	56
3.2.4	Quantifizierung der mikroglialen MHC1 & IBA1 Immunreaktivität nach Axotomie	56
3.2.5	Quantifizierung von mikroglialem MHC1 in Zytokin-Rezeptor defizienten Mäusen	58
3.2.6	Diffuse MHC1-Färbung und MHC1-positive Mikroglia Knötchen in transgenen Mäusen	61

3.3	Der Einfluß proinflammatorischer Zytokine auf die Expression des Ko-Stimulatorischen Faktors B7-2	64
3.3.1	<i>B7-2 Immunreaktivität nach Fazialisaxotomie in Wildtyp-Tieren</i>	64
3.3.2	<i>Zelluläre Lokalisation von B7-2</i>	66
3.3.3	<i>Quantifizierung der mikroglialen B7-2 IR im Zeitverlauf</i>	68
3.3.4	<i>Expression von B7-2 in Zytokin-defizienten Mäusestämmen</i>	68
3.3.5	<i>Effekt von LPS auf B7-2 und MHC1 Expression</i>	72
3.4	Die Rolle proinflammatorischer Zytokine bei der Lymphozyten-Einwanderung in verletztes ZNS	73
3.4.1	<i>Lymphozyten-Rekrutierung in Wildtyp und Zytokin-Rezeptor defizienten Tieren</i>	74
3.4.2	<i>Lokalisation der eingewanderten Lymphozyten</i>	79
3.5	Effekte von peripher applizierten Lipopolysacchariden im normalen und verletzten Gehirn.....	79
3.5.1	<i>LPS zerstört die Blut-Hirnschranke</i>	79
3.5.2	<i>LPS führt zu einem Einstrom Peroxidase-positiver Zellen in das Gehirn ..</i>	81
3.5.2.1	<i>Dosisabhängigkeit.....</i>	81
3.5.2.2	<i>Kinetik</i>	81
3.5.2.3	<i>Einfluß des genetischen Hintergrundes.....</i>	84
3.5.3	<i>Zelluläre Identität der einwandernden Zellen</i>	85
3.5.3.1	<i>Fluoreszenz-Doppelmarkierungen</i>	85
3.5.3.2	<i>Markierung hämatogener Zellen.....</i>	85
3.5.3.3	<i>Ultrastrukturelle Analyse</i>	85
3.5.4	<i>Expression von ICAM-1 nach LPS Stimulation</i>	88
3.5.5	<i>Einfluß von ICAM-1-Defizienz auf LPS-vermittelte Granulozyteninvasion.</i>	88
4.	DISKUSSION.....	90
4.1	Gründe für die Verwendung Zytokin-Rezeptor defizienter Mäuse.....	90
4.2	Der Einfluß proinflammatorischer Zytokine auf das neuronale Überleben nach Fazialisaxotomie	91
4.2.1	<i>Reduktion phagozytotischer Knötchen in TNFR1&2 defizienten Tieren....</i>	91
4.2.2	<i>Deletion einzelner Zytokin-Rezeptoren hat keinen Einfluß auf neuronales Überleben.....</i>	92
4.2.3	<i>Deletion von TNFR1&2 wirkt protektiv auf Motoneurone.....</i>	93
4.2.4	<i>TNFR1&2 unabhängiger, verzögerter neuronaler Zellverlust.....</i>	94
4.3	Antigen-Präsentation und Leukozyten-Rekrutierung nach Fazialisaxotomie	95
4.3.1	<i>Expression von MHC1 und B7-2 zeigt einen monophasischen Anstieg und ist auf aktivierte Mikroglia beschränkt.....</i>	95
4.3.2	<i>MHC1 und B7-2 Expression in Zytokin-Rezeptor defizienten Mäusen.....</i>	97
4.3.3	<i>MHC1 und B7-2 Expression auf phagozytierender Mikroglia</i>	97
4.3.4	<i>MHC1 und B7-2 Expression im Rahmen der Umgebungsreaktion</i>	98

4.3.5	<i>T-Zell Rekrutierung nach Fazialisaxotomie in Zytokin-Rezeptor defizienten Mäusen</i>	100
4.3.6	<i>Interaktion zwischen Lymphozyten, Mikroglia und Neuronen</i>	101
4.4	Effekte von peripher applizierten Lipopolysacchariden im normalen und verletzten Gehirn	103
4.4.1	<i>Systemische LPS Applikation führt zu Granulozyten-Einwanderung ins ZNS</i>	103
4.4.2	<i>Mögliche Mechanismen der Granulozyten-Einwanderung nach LPS Stimulation</i>	104
4.4.2.1	<i>Rolle aktivierter Mikroglia</i>	104
4.4.2.2	<i>Öffnung der Blut-Hirn-Schranke</i>	104
4.4.2.3	<i>Einfluß des verletzten und unverletzten Parenchyms</i>	105
4.4.3	<i>ICAM1-Defizienz reduziert die Granulozyten-Rekrutierung nach LPS Gabe</i> 105	
4.4.4	<i>Indirekte LPS-Wirkung</i>	106
5.	ZUSAMMENFASSUNG	108
6.	ABKÜRZUNGEN UND FREMDWÖRTER	111
7.	ZITIERTE LITERATUR	113
8.	LEBENS LAUF	122
9.	DANKSAGUNG	125

1. Einleitung

1.1 *Reaktion des Zentralen Nervensystems auf Verletzung*

Akute Schädigungen des Zentralen Nervensystems lösen ein komplexes Netzwerk morphologischer, metabolischer und funktioneller Veränderungen aus, die begleitet von entzündlichen Reaktionen, letztlich entweder in degenerativen oder regenerativen Prozessen münden. Dabei initiieren die betroffenen Nervenzellen ein Notprogramm und stimulieren die umliegenden Mikrogliazellen und Astrozyten. Diese Aktivierung wird von Veränderungen des vaskulären Endothels und einer Einwanderung peripherer Immunzellen begleitet (McQuarrie et al., 1978; Barron, 1983; Kreutzberg, Graeber, and Streit, 1989; Kreutzberg, 1995; Raivich et al., 1995; Raivich, Bluethmann, and Kreutzberg, 1996; Raivich et al., 1999b).

Sowohl die frühen Veränderungen, als auch die Abläufe zu späteren Zeitpunkten nach indirekten Hirnverletzungen sind auf morphologischer Ebene inzwischen im Detail bekannt. Die gliale Reaktion auf verschiedene Noxen wie Trauma, Ischämie und Infektion, sowie die Rekrutierung peripherer Leukozyten läuft dabei nach einem sehr stereotypen Muster in mehreren Stufen ab (Raivich et al., 1999b). Die den morphologischen Veränderungen und der Kommunikation zwischen einzelnen Zelltypen zugrundeliegenden molekularen Mechanismen sind jedoch nur im Ansatz verstanden. Ihre Entschlüsselung könnte neue Ansätze für gezielte pharmakologische Interventionen bei Erkrankungen des Nervensystems eröffnen.

1.2 *Zentrale Reaktionen auf periphere Durchtrennung des Nervus facialis*

Das ganze Spektrum des neuroglialen Aktivationsrepertoires kann nach Fazialis-Axotomie in der Maus beobachtet werden. Nach peripherer Durchtrennung der motorischen Nervenanteile, kommt es im betroffenen Kerngebiet zu einer De- und Regeneration der Motoneurone, die mit einer zeitlich wohl definierten, stereotypen Reaktion von Nervenzellen, Astrozyten, Mikroglia, Endothelien und Leukozyten

einhergeht. Die Blut-Hirnschranke bleibt in diesem Modell intakt (McQuarrie et al., 1978; Eddleston and Mucke, 1993; Kreutzberg, 1995).

Die Ereignisse lassen sich in eine Frühe Phase, die etwa 48 Stunden nach Transektion des Nervus facialis beginnt, und eine um zwei bis drei Wochen versetzte Späte Phase unterteilen (Abbildung 1). In den ersten Tagen nach Fazialisaxotomie beginnt die Mikroglia im verletzten Kerngebiet zu proliferieren und an die neuronalen Zellkörper zu adhären. In diesem Prozess, der als „synaptic stripping“ bezeichnet wird, verdrängt die Mikroglia terminale Neuritenendigungen von den betroffenen Neuronen (Blinzinger and Kreutzberg, 1968). Im Gegensatz zu anderen Tieren, kommt es in der Maus nach zwei bis drei Wochen zu einem späten Untergang einer Subpopulation der Motoneurone. Um den dabei entstehenden Debris, bilden sich phagozytierende Mikroglia-Knötchen (Moller et al., 1996) und sammeln sich aus dem Blut eingewanderte Leukozyten an (Raivich et al., 1998a). Später verdrängen Astrozytenlamellen die Mikroglia von der Neuronenoberfläche und isolieren diese elektrisch. Die Mehrheit der Motoneurone (70-80%) geht allerdings nicht zu Grunde und beginnt mit dem Aussprossen neuer Axone.

1.2.1 Neuronale Reaktion nach Fazialisaxotomie

Nach der Durchtrennung des Nervus facialis kommt es zu einem Untergang des distalen Axon-Anteils durch Wallersche Degeneration. Zusätzlich findet man aber auch eine rasche Reaktion im betroffenen Zellkörper mit Anschwellen des Zellkerns, Verdrängung des Nukleolus an den Rand und Zerfall der Nissl-Substanz (Nissl, 1894; Jessell, 1991). Ultrastrukturell vermehren sich insbesondere die zur Proteinsynthese befähigten Ribosomen (Barron, 1983). Der chromatolytische Zellkörper verändert neben seiner Morphologie auch den Grad an Proteinsynthese und die Nährstoffaufnahme. Dabei kommt es zu einer verringerten Synthese der für die spezifische Funktion wichtigen Moleküle wie Neurotransmitter und postsynaptische Proteine (Nakayama et al., 1995). Im Gegenzug werden vermehrt strukturerhaltende Moleküle und wachstumsassoziierte Proteine wie GAP-43, die sonst nur während der Embryonalphase aktiv sind, produziert (Skene, 1989; Benowitz and Routtenberg, 1997). Zusätzlich kommt es in den durch „synaptic stripping“ von ihrer Umgebung elektrisch isolierten axotomierten Motoneuronen zu einem Anstieg vieler verschiedener Signalmoleküle. Dazu zählen unter anderem die

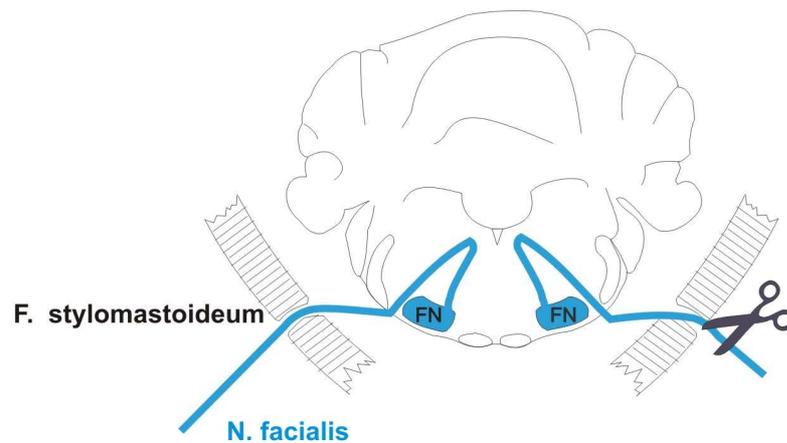
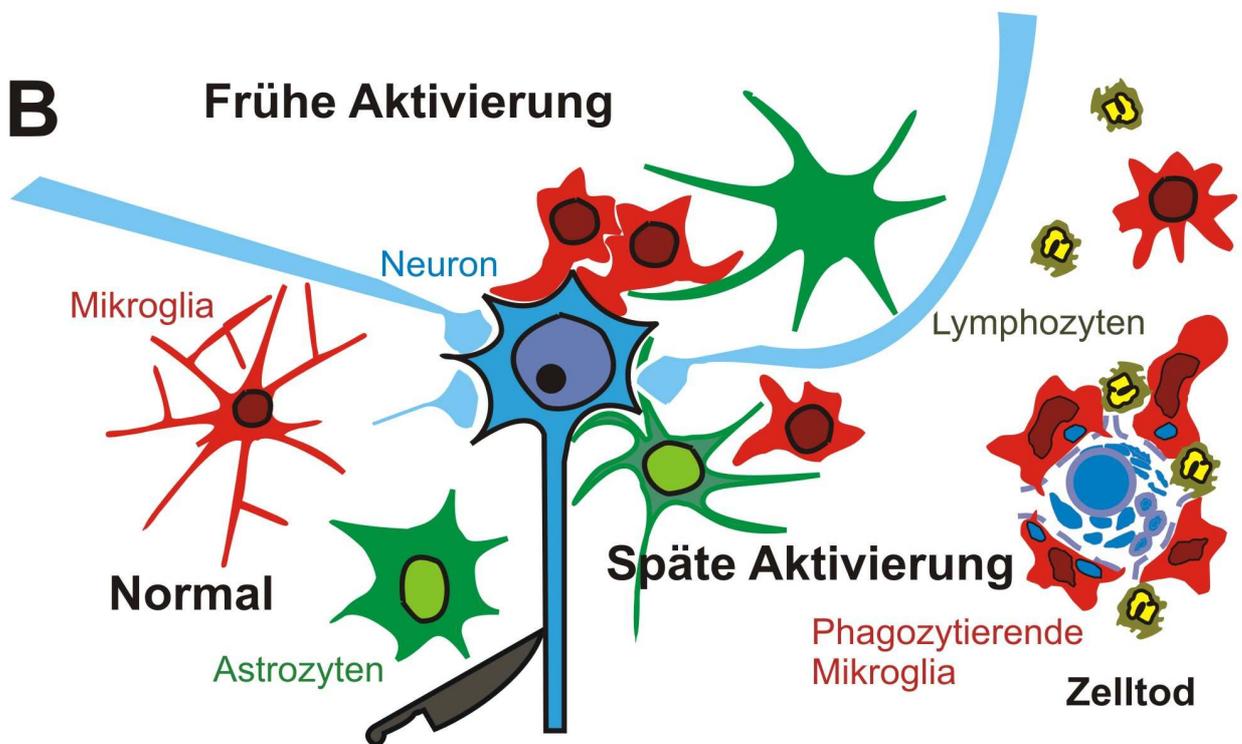
A**B**

Abbildung 1: Retrograde Veränderungen nach peripherer Transektion des Nervus facialis.

A. Schematisches Übersichtsmodell über den Verlauf des N. facialis im Hirnstamm. Die Durchtrennung erfolgt unmittelbar nach Austritt aus dem Foramen stylomastoideum.

B. Schema der zellulären Reaktion im Fazialis-Kern. **Links.** Im normalen Hirnstamm sind die Oberflächen der Neuronen mit Synapsen besetzt. Die Mikroglia zeigen eine starke Verästelung ihrer Fortsätze. Mikroglia und protoplasmatische Astrozyten sind im Parenchym verteilt. **Oben.** Axotomie führt zu einer Aktivierung der glialen Zellen. Mikroglia proliferiert, verliert ihre Fortsätze und adhärirt an das geschädigte Neuron. Dabei entfernt sie fast alle präsynaptischen Endigungen von der Nervenzelle ("synaptic stripping"). Die Astrozyten nehmen eine sternförmige, fibrilläre Gestalt an. **Rechts.** Während der späten Aktivierung und Regeneration verdrängen Astrozytenlamellen die Mikroglia von der Oberfläche des neuronalen Zellkörpers. Bei Neuronenuntergang bilden phagozytotische Mikrogliazellen ein Knötchen um den zellulären Debris und beginnen mit der Abräumung. Es kommt zudem zu einer Einwanderung von Lymphozyten, die sich an das phagozytotische Knötchen anlagern (nach G. Raivich, 1999).

Neuropeptide CGRP, Galanin und VIP sowie die Stickstoffmonoxid produzierende NADPH-Diaphorase (Kreutzberg, 1963; Dumoulin et al., 1992; Raivich et al., 1995). Über diese Botenstoffe kommunizieren die traumatisierten Neurone mit ihrer unmittelbaren zellulären Umgebung. Schließlich verändern sich auch die Zelladhäsionseigenschaften verletzter Nervenzellen indem unter anderem CD44 und Thrombospondin vermehrt exprimiert werden (Moller et al., 1996; Jones, Kreutzberg, and Raivich, 1997).

Nach Axotomie gelingt es dem größten Teil der verletzten Motoneurone zu regenerieren. Es kommt zu neuronalem „sprouting“, dem Austreiben neuer axonaler Wachstumskegel, die die Zielmuskulatur reinnervieren können (Sinatra and Ford, 1979; Soreide, 1981; Vaughan, 1990). Allerdings gehen spezie-spezifisch auch etwa 20 – 30% der axotomierten Neurone nach zwei bis drei Wochen zugrunde. In Tieren, die defizient für die früh-exprimierten entzündungsfördernden Zytokine Interleukin 6 und MCSF sind, ist der neuronale Zelltod nach Fazialisaxotomie unverändert (Raivich et al., 1998b; Galiano et al., 2001). Die maximale Expression weiterer proinflammatorischer Zytokine, wie Interleukin 1 beta (IL1 β), Interferon gamma (IFN γ) und Tumor Necrosis Factor alpha (TNF α) korreliert zeitlich besser mit dem Höhepunkt des neuronalen Untergangs und könnte für den Nervenzelltod von Bedeutung sein (Raivich et al., 2002). In neonatalen Tieren ist der Zelltod wesentlich deutlicher ausgeprägt, wobei er durch Gabe von Neurotrophen wie Neurotrophin-4, BDNF oder GDNF beträchtlich reduziert werden kann. Welche Faktoren letztlich über das Schicksal geschädigter Neurone im ausgewachsenen Nervensystem entscheiden, ist gegenwärtig allerdings nicht bekannt (Yu, 1989; Baumgartner and Shine, 1998; Fawcett et al., 1998).

1.2.2 Mikrogliale Reaktion nach Fazialisaxotomie

Mikrogliale Zellen bilden etwa 10-20% der gesamten Neuroglia und sind funktionell dem Makrophagen-Monozyten-System verwandt. Lange Zeit gab es Diskussionen um ihre Herkunft, aber heute ist die mesenchymale Abstammung weitgehend anerkannt. Während der Embryonalentwicklung wandern ihre monozytären Vorläuferzellen durch die noch offene Blut-Hirn Schranke in das Hirnparenchym ein und siedeln sich dort an (Broadwell and Sofroniew, 1993). Im intakten Gehirn haben sie einen kleinen Zellkörper mit vielen schlanken, sehr verästelten Fortsätzen. In der Grauen Substanz deckt eine Zelle mit ihren ramifizierten Ausläufern etwa ein

Volumen mit 30-40 µm Durchmesser ab (Compston et al., 1997). Analog zu den residenten Makrophagen in anderen Geweben, sind sie an der Immunüberwachung des ZNS beteiligt und exprimieren konstitutiv den Komplement-Rezeptor 3 (CR3; Integrin $\alpha M\beta 2$) und Rezeptoren für den Fc-Teil von γ -Immunglobulinen (Graeber and Kreutzberg, 1988; Fishman and Savitt, 1989; Peress et al., 1993; Reid et al., 1993; Werner et al., 1998).

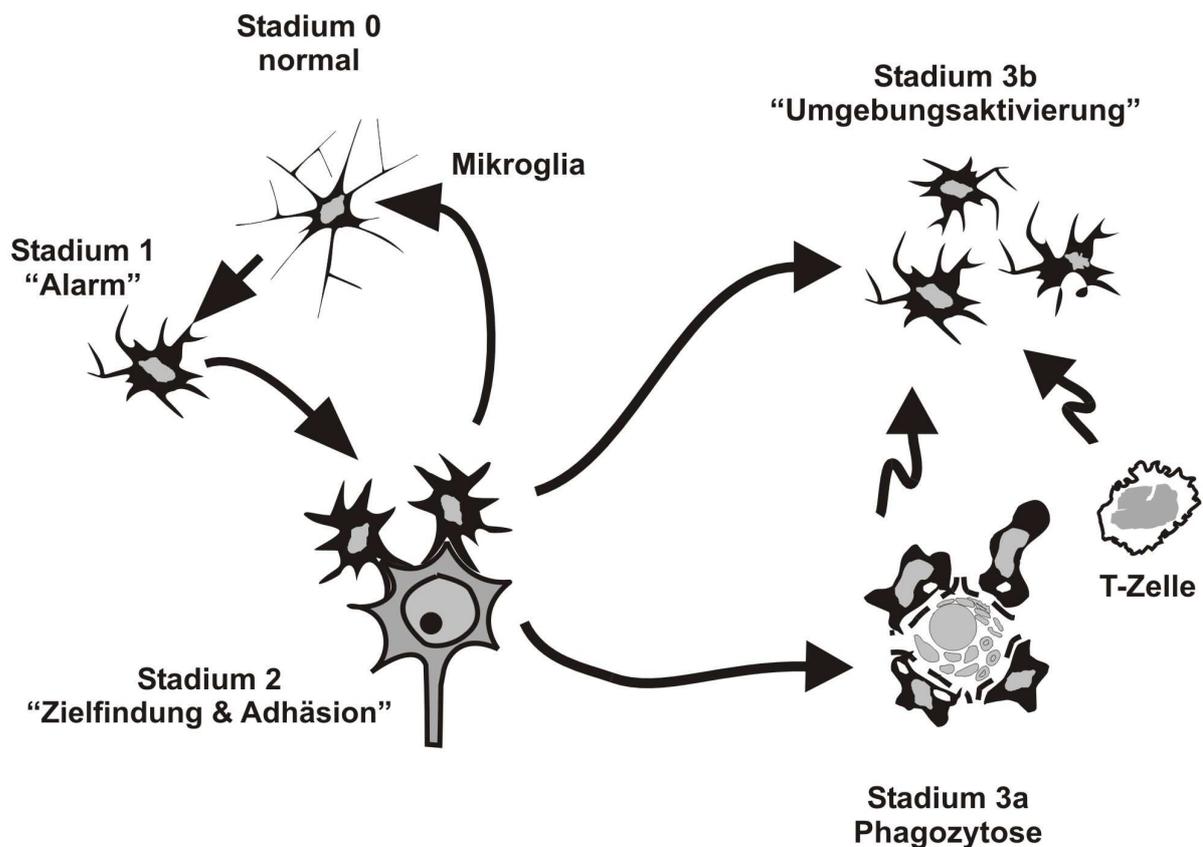


Abbildung 2: Schematische Übersicht über die Stufen der Mikroglia-Aktivierung.

Die Transformation von ruhender zu aktivierter Mikroglia läuft über eine Reihe stereotyper Zwischenschritte, die mit einer Änderung der Morphologie und des Antigen-Expressionsprofils einhergehen. Neuronale Verletzung führt zu einer Umwandlung der stark verästelten Mikroglia (Stadium 0) in plumpe Zellen mit kurzen Fortsätzen (Stadium 1: "Alert"). Diese aktivierte Mikroglia adhärirt an die beschädigten Neurone (Stadium 2: "Homing"). Im folgenden gibt es zwei Möglichkeiten. Kommt es zu keiner weiteren Schädigung, wandelt sich die Mikroglia allmählich wieder in normale, ruhende Zellen um. Stirbt das Neuron, wandelt sie sich in phagozytierende Zellen um (Stadium 3a: Phagozytose). Interessanterweise kommt es dann auch zu einer Aktivierung der um das Knötchen liegenden nicht-phagozytotischen Mikroglia (Stadium 3b: "bystander activation"). Modifiziert nach Raivich et. al. 1999

Aus dieser ruhenden Form (**Stadium 0**) kann Mikroglia nach Aktivierung sehr schnell ihre Gestalt und Antigenausstattung ändern (Abbildung 2; Übersicht bei (Raivich et al., 1999b)). Morphologisch zeigt sich rasch ein Anschwellen des Zellkörpers und eine Verplumpung der proximalen Fortsätze. Die fein verzweigte distale Ramifizierung verschwindet und die Zellen nehmen im Extremfall amöboide Form an. Gleichzeitig kommt es innerhalb von 24 Stunden (**Stadium 1 – Alarm**) zu einem rapiden Anstieg der Immunreaktivität für α M β 2, Immunglobulin G, und Zelladhäsionsmolekülen wie ICAM1 und Thrombospondin. Etwa 1 bis 3 Tage nach dem Trauma beginnt die Mikroglia unter Einfluß von Makrophagen-Koloniestimulierendem Faktor (MCSF) und Granulozyten-Makrophagen-Koloniestimulierendem Faktor (GMCSF) zu proliferieren (Raivich et al., 1994a; Raivich et al., 1994b; Raivich et al., 1998b). Es kommt zudem zu einer Umstrukturierung des Zytoskeletts, mit einer Vermehrung des Vimentins (Graeber and Kreutzberg, 1988) und einer Zunahme der Motilität der Zellen (Angelov et al., 1995). Die mikroglialen Zellen induzieren verschiedene Adhäsionsmoleküle und beginnen sich an die verletzten Neurone anzulagern (**Stadium 2 – Zielfindung & Adhäsion**). Dabei werden synaptische Endigungen von den Nervenzellkörpern entfernt und die Neurone somit isoliert (Blinzinger and Kreutzberg, 1968).

Der weitere Ablauf der mikroglialen Reaktion ist abhängig vom neuronalen Überleben. Kommt es zum Fortbestand der Nervenzellen, wandelt sich die Mikroglia wieder in ihre ramifizierte Ruheform um. Tritt jedoch neuronaler Zelltod auf, verlieren die mikroglialen Zellen ihre Ramifizierung komplett und transformieren zu rundlichen Phagozyten (**Stadium 3a – Phagozytose**). Zwischen drei und 20 dieser phagozytotischen Mikrogliazellen lagern sich schließlich um die Reste der Neuronen zu Knötchen zusammen und räumen das Debris ab (Streit, Graeber, and Kreutzberg, 1989b; Moller et al., 1996). Welche molekularen Mechanismen die Umwandlung ramifizierter Mikroglia in ihre amöboide, phagozytierende Form anstoßen, ist nicht eindeutig geklärt. In Versuchen mit Mikroglia-Astrozyten Kulturen *in vitro* führte weder Stimulation mit mikroglialen Mitogenen wie MCSF, noch Zugabe inflammations-assoziiertes Zytokine (einschließlich IL1, IL2, IL4, IL4, IL6, IL10, TNF α , IFN γ) oder proinflammatorischer Moleküle wie LPS zu einer Transformation in Phagozyten. Allein die Präsenz von Zelldebris induziert *in vitro* die Umwandlung phagozytierender Mikroglia in eine deramifizierte, amöboide Form. Interessanterweise ist diese Verwandlung ausschließlich in den Debris-

aufnehmenden Zellen, aber nicht in eng benachbarter Mikroglia zu sehen (Kloss, Kreutzberg, and Raivich, 1997; Bohatschek et al., 2001; Kloss et al., 2001).

Phagozytose löst in den Mikrogliazellen einen massiven Anstieg der bereits in Stadium 1 & 2 exprimierten Aktivierungsmarker, sowie die Freisetzung von Proteasen und entzündungsfördernder Zytokine wie IL1, IFN γ und TNF α aus (Banati et al., 1993; Raivich et al., 1998a). Zudem kommt es zu einer veränderten Expression immunmodulatorischer und für die Antigen-Präsentation wichtiger Moleküle wie Fc γ -Rezeptor, B7.2, MHC1 und MHC2. Dabei gibt es jedoch, je nach untersuchter Spezies bzw. zugrunde liegender Pathologie, große Unterschiede. Nach Fazialistransektion in der Maus kommt es auf der Mikroglia der grauen Substanz zu einem Anstieg von Fc γ -Rezeptor, MHC und ko-stimulatorischer Moleküle wie ICAM1 und α X β 2 Integrin (Streit, Graeber, and Kreutzberg, 1989b; Werner et al., 1998; Kloss et al., 1999). In peripheren Gewebe ist α X β 2 Integrin ein Marker für dendritische Zellen und spielt möglicherweise bei der Interaktion zwischen Lymphozyten und Antigen-präsentierenden Zellen eine verstärkende Rolle (Hynes, 1992; Brocker, Riedinger, and Karjalainen, 1997) Die phagozytierende Mikroglia besitzt somit die molekulare Grundausstattung um Antigen an die einwandernden Lymphozyten zu präsentieren und eine Immunüberwachung des geschädigten Gehirns zu ermöglichen.

Um die aktiv phagozytierenden Knötchen erstreckt sich eine etwa 60 - 100 μ m breite Zone in der die Mikroglia nicht phagozytiert, aber ebenfalls zu einem gewissen Grad aktiviert ist (**Stadium 3b – Umgebungsreaktion**). Diese konzentrisch um Mikroglia-Konglomerate gelegene „bystander“-Aktivierung wird wahrscheinlich durch die, von phagozytierenden Zellen in hohen Konzentrationen hergestellten proinflammatorischen Zytokinen wie IL1 und TNF α , verursacht (Raivich et al., 1999a). Während die unmittelbar um das Zentrum gelegenen Zellen mäßig starke Immunreaktivität für verschiedene mikrogliale Aktivitätsmarker zeigen, nimmt die Färbeintensität zur Peripherie hin deutlich ab. Es ist anzumerken, daß α X β 2 Integrin auf den Mikrogliazellen der Umgebungsreaktion nicht nachzuweisen ist. Die nach Axotomie rekrutierten Lymphozyten befinden sich ausschließlich an den Knötchen und in der „bystander“-Zone. Dies könnte auf einen regulierenden Einfluß der Umgebungsreaktion auf die T-Zell Aktivierung hindeuten (Raivich et al., 1999b)

Die Auswirkung der mikroglialen Reaktion auf die benachbarten Neurone ist nach wie vor Gegenstand anhaltender Debatten, da sich in verschiedenen *in vitro* und *in*

vivo Studien sowohl zytotoxische, als auch neuroprotektive Wirkungen nachweisen ließen.

1.2.3 Rekrutierung hämatogener Immunzellen nach Fazialisaxotomie

1.2.3.1 Blut-Hirn-Schranke

Die Blut-Hirn-Schranke (BHS) bildet eine Barriere zwischen Blutzirkulation und Zentralnervensystem und verhindert so den unkontrollierten Austausch von Zellen und Molekülen zwischen den beiden Kompartimenten. Auf der luminalen Seite, wird die Blut-Hirn-Schranke durch die dicht gelagerten und über tight junctions (zonulae occludentes) verbundenen Endothelzellen der Blutgefäße gebildet. Umhüllt werden die Endothelzellen von einer Basalmembran, in die Perizyten eingelagert sind, und die auf der parenchymalen Seite von Astrozytenausläufern umgeben ist. Die Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke wird von der Plasmamembran der Endothelzellen sowie den tight junctions bestimmt. Die Astrozyten sind aber über Sekretion von Signalstoffen indirekt an der Regulation der Blut-Hirn-Schranke beteiligt. Sie können durch Induktion von endothelialen Zelladhäsionsmolekülen, sowie der Abgabe von Chemokinen auch die Rekrutierung peripherer Leukozyten beeinflussen (Janzer and Raff, 1987; Wolburg et al., 1994) (Gourmala et al., 1997; Shafer and Murphy, 1997).

Nach direktem Trauma, sowie bei Infektionen und autoimmunologischen Entzündungen, kommt es zu einer Störung der Blut-Hirn-Schranke die einen Einstrom zirkulierender Moleküle und peripherer Blutzellen ermöglicht. Doch selbst milde indirekten ZNS Verletzungen wie periphere Fazialisaxotomie, führen lokal zu Veränderungen in der Blut-Hirn-Schranke. Die Barrierefunktion für kleine Moleküle wie humanes Albumin bleibt zwar auch weiterhin erhalten, aber es kommt zu einem verstärkten aktiven Transport von Nährstoffen wie Glucose, Aminosäuren und Eisen, die die Regeneration verletzter Neurone unterstützen (Kreutzberg and Emmert, 1980; Singer and Mehler, 1986; Graeber, Raivich, and Kreutzberg, 1989). Zusätzlich kommt es zu einer verstärkten Einwanderung peripherer Lymphozyten.

1.2.3.2 Einwanderung von Lymphozyten

Traditionell wurde das Zentrale Nervensystem als immunprivilegiertes Gewebe angesehen, das von der Überwachung durch das Immunsystem weitgehend abgeschirmt ist. Durch die Blut-Hirnschranke kommt es im adulten ZNS praktisch zu

keinem Einstrom von Immunglobulinen & Komplement. Mikroglia, die residenten Antigen-präsentierenden Zellen, exprimieren zudem nur sehr geringe Mengen MHC. Hämatogene Immunzellen sind im unverletzten Gehirnparenchym nur sehr vereinzelt zu finden und beschränken sich auf von Monozyten abstammende perivaskuläre Makrophagen und wenige aktivierte T-Lymphozyten (Hickey and Kimura, 1988). Im normalen ZNS ist die Einwanderung von Lymphozyten zwar nicht von einem spezifischen Antigen, aber vom Aktivierungsstatus der T-Zellen abhängig und nur für die aktivierte Subpopulation möglich (Hickey, Hsu, and Kimura, 1991).

Trotzdem kommt es nach Verletzung des Nervengewebes, abhängig vom Schweregrad, zu einer Aktivierung des Immunsystems und verstärktem Einstrom zirkulierender Blutzellen in das geschädigte Areal. Insbesondere schweres Trauma, Infektion oder Autoimmunerkrankungen führen zu einer ausgeprägten und raschen Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten, Makrophagen, B- und T-Lymphozyten sowie Natural Killer Cells (Hooper et al., 1998; Neumann and Wekerle, 1998; Raivich et al., 1999b).

Doch auch nach geringen indirekten Läsionen wie der Fazialisaxotomie kommt es zu einer Einwanderung aktivierter T-Lymphozyten ins Parenchym (Raivich et al., 1998a). Für die Rekrutierung der Immunzellen ist keine generalisierte Öffnung der Blut-Hirn Schranke notwendig. Der Einstrom ist zudem auf T-Zellen und einzelne Natural Killer Zellen beschränkt. Granulozyten, Makrophagen oder B-Zellen sind nicht nachzuweisen. Die Einwanderung von T-Lymphozyten nach Fazialisaxotomie verläuft in zwei Stufen. Bereits nach 24 Stunden findet sich ein zehnfacher Anstieg der T-Zellen. Dieser erste Peak erfolgt zeitgleich mit der frühen neuro-glialen Aktivierungsphase und ist von der Präsenz der proinflammatorischen Zytokine Interleukin 6 und MCSF abhängig (Raivich et al., 1998b; Galiano et al., 2001). Ein zweiter Gipfel mit einem 100-fachen Anstieg CD3-positiver Zellen folgt an Tag 14. Zu diesem Zeitpunkt erreicht der neuronale Zelltod, sowie die Konzentration der entzündungsfördernden Zytokine Interleukin 1 beta, Interferon gamma und Tumor Necrosis Faktor alpha ihr Maximum (Raivich et al., 1998a).

Welche Faktoren genau bei der Anheftung, Extravasion und Anlockung hämatogener Zellen nach neuronalem Untergang eine Schlüsselrolle spielen, ist noch nicht hinreichend geklärt. Neben proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen spielen dabei sicherlich endothelial exprimierte Zelladhäsionsmoleküle

wie $\alpha 5\beta 1$ Integrin und $\alpha 6\beta 1$ Integrin, deren Expression auf neurovaskulärem Endothel nach Fazialisaxotomie induziert wird, eine entscheidende Rolle (Kloss et al., 1999).

Da sich die T-Zellen im verletzten Fazialiskern um phagozytotische Mikroglia-Knötchen sammeln, ist von einer zielgerichteten Interaktion mit immunologischer Relevanz auszugehen. Dies und das Auftreten intraparenchymaler Lymphozyten bei verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer oder Amyotrophe Lateralsklerose (Troost et al., 1989; Engelhardt, Tajti, and Appel, 1993; McGeer et al., 1993), unterstreicht die Bedeutung der Immunüberwachung beim Untergang von Nervenzellen.

1.3 Molekulare Basis der Entzündungsreaktion nach Fazialisaxotomie

Während die zellulären Reaktionen im Zentralnervensystem in ihrer Abfolge inzwischen gut charakterisiert sind, liegen viele der molekularen Abläufe noch im Dunkeln. Die Aufklärung des Interaktionsnetzwerkes, mit seiner Vielzahl sich wechselseitig in ihrer Wirkung beeinflussender Signaltransduktionsmoleküle und Rezeptorsysteme, ist Gegenstand intensiver Forschung.

1.3.1 Proinflammatorische Zytokine

Eine Schlüsselrolle bei der inter-zellulären Kommunikation spielen Zytokine. Bereits im unverletzten Gehirn werden bestimmte Zytokine wie z.B. MCSF, TGF β 1 in niedrigen Mengen exprimiert (Raivich et al., 1998b; Streit et al., 1998). Je nach Art und Grad der ZNS-Verletzung kommt es in Folge zu einem Anstieg verschiedener proinflammatorischer Moleküle (Raivich et al., 1999b). Die Zytokinexpression ändert sich zudem auch im zeitlichen Verlauf. Während zum Beispiel nach einem indirekten Trauma im Fazialiskern Interleukin 6 (IL6), Macrophage Colony Stimulating Factor (MCSF) und Transforming Growth Factor β (TGF β) sehr rasch innerhalb von 24 bis 48 Stunden hochreguliert werden, lassen sich nach 14 Tagen insbesondere Tumor Necrosis Factor α (TNF α), Interleukin 1 β (IL1 β) und Interferon γ (IFN γ) in hohen Konzentrationen nachweisen (Raivich et al., 1999b). Für die vorliegende Arbeit wurde das Augenmerk insbesondere auf diese Gruppe spät

exprimierter Zytokine und deren mögliche Rolle bei der verzögerten Entzündungsreaktion gerichtet.

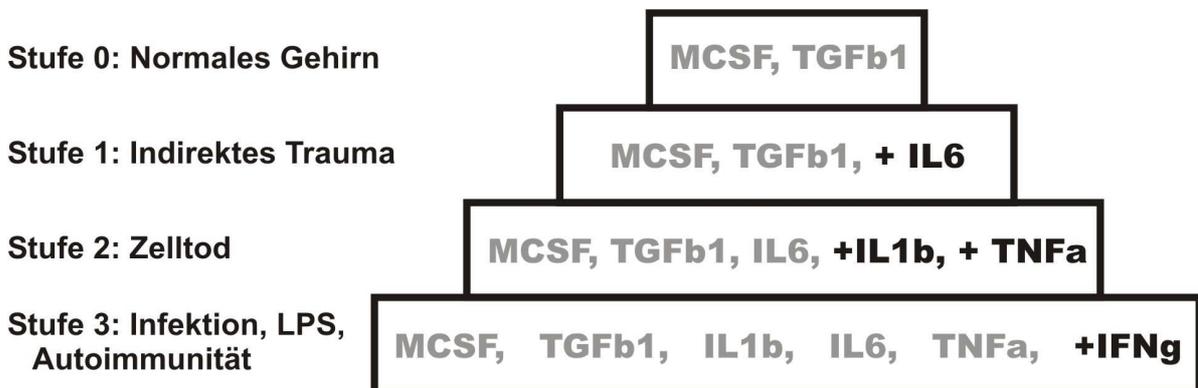


Abbildung 3: Zytokin-Expression im Gehirn.

Die Synthese verschiedener Zytokine im verletzten Gehirn baut sich pyramidenförmig auf: mit zunehmenden Grad der Schädigung werden mehr und mehr Zytokine gebildet. Bereits im normalen Gehirn besteht eine basale Expression des Macrophage Colony Stimulating Factor (MCSF) und Transforming Growth Factor 1 beta (TGFb1). Mildes Trauma führt zu einer schnellen Hochregulierung von Interleukin 6 (IL6) und verstärkter Synthese von TGFb1. Direktes Hirntrauma, Ischämie, Morbus Alzheimer oder andere Ursachen für neuronalen Zelltod führen zur Produktion von Interleukin 1 beta (IL1b) und Tumor Necrosis Factor alpha (TNFa), immunvermittelte Inflammation oder Infektionen zusätzlich zur Synthese von Interferon gamma (IFNg) (nach Raivich et. al. 1999).

1.3.1.1 Tumor Necrosis Factor alpha

Tumor Necrosis Factor alpha (TNFa) ist ein proinflammatorisches Molekül welches insbesondere nach Ischämie, Trauma, Exotoxizität und Infektion induziert wird (Bruce et al., 1996; Seilhean et al., 1997; Uno et al., 1997; Yang et al., 1998a). Es wird als 26kDa Transmembranprotein exprimiert, welches ein nicht konvalent gebundenes Homotrimer bildet und dann durch das TNFa-Converting-Enzyme (TACE) in eine lösliche 17kDa Form gespalten werden kann (Idriss and Naismith, 2000). Zur TNF-Liganden-Superfamilie gehören etwa 20 verschiedene Moleküle, unter anderem TNFβ (Lymphotoxin α), Lymphotoxin β und TRAIL. TNFa ist ein pleiotropes Molekül mit direktem Effekt auf Neurone, Oligodendroglia, Mikroglia und Astrozyten.

In der wachsenden Gruppe der TNF-Rezeptor-Familie gibt es zwei, über die TNFa seine biologischen Wirkungen entfaltet: TNF-Rezeptor 1 (TNFR-p55, TNFR1) und TNF-Rezeptor 2 (TNFR-p75, TNFR2). Sowohl TNFR1 als auch TNFR2 werden auf Neuronen und glialen Zellen exprimiert. Während TNFR1 eine „death domain“-Motiv

besitzt, welche bei der Induktion von Zelltod eine Schlüsselrolle hat, fehlt diese Sequenz bei TNFR2. Trotzdem kann TNFR2 Adaptormoleküle wie TRAF2 binden und Apoptose induzieren. Ob dies direkt geschieht oder über einen als „Liganden – Übertragung“ bezeichneten Mechanismus, bei dem durch Bindung von TNF α an TNFR2 eine lokale Anreicherung mit subsequentieller Aktivierung von benachbarten TNFR1 erfolgt, wird kontrovers diskutiert (Heller et al., 1992; Declercq et al., 1998). Bisherige Untersuchungen an TNFR1 defizienten Tieren zeigten unter anderem eine verstärkte Anfälligkeit für Infektionen mit *Listeria monocytogenes*. TNFR1 defiziente Mäuse waren jedoch gegenüber Interleukin-1 vermittelter Toxizität, sowie Lipopolysaccharid-induziertem septischen Schock resistent (Pfeffer et al., 1993; Rothe et al., 1993). TNFR2 hingegen, hat zum Beispiel über Regulation der endothelialen ICAM1-Expression eine bedeutende Rolle bei zerebraler Malaria (Lucas et al., 1997) und Multiorgan-Entzündungen (Douni and Kollias, 1998). Kombinierte Ausschaltung von TNFR 1&2 führte in einem Modell fokaler zerebraler Ischämie zu gesteigertem neuronalen Zelluntergang, bei gleichzeitig reduzierter mikroglialer Aktivierung (Bruce et al., 1996). Aus diesem Verletzungsmodell könnte man Rückschlüsse auf eine neuroprotektive Wirkung von TNF α ziehen. Hierzu widersprüchliche Daten lieferten jedoch Untersuchungen an ischämischer Retina. Dort führte die Deletion von TNFR1 zu einem verminderten Untergang retinaler Neurone (Fontaine et al., 2002), was auf pro-degenerative Effekte von TNF α in diesem Modell schließen lässt.

1.3.1.2 Interleukin 1

Interleukin 1 (IL1) ist ein wichtiger Mediator von Entzündungs- und Immunreaktionen im verletzten Gehirn (Wang et al., 1997). Das Interleukin-1 System besteht aus zwei agonistischen Liganden, IL1 α und IL1 β , sowie einem antagonistischen Liganden, IL1-receptor antagonist (IL1ra). Bis jetzt sind zwei Rezeptoren bekannt, wobei nur Interleukin1 Rezeptor 1 (IL1-R1) über Bindung an IL1-receptor accessory protein und anschließender Initiierung der Transduktionskaskade über IL1-receptor associated kinase (IRAK), zu Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie NF κ B führt. Interleukin 1 Rezeptor 2 (IL1-R2) bindet zwar IL1, führt aber zu keiner Aktivierung der Signaltransduktion und wirkt somit als Antagonist der IL1 Aktivität.

Durch Studien an IL1-R1 defizienten Tieren zeigte sich, daß IL1 bei der akuten Entzündung nach Terpentin-Injektion ins Gewebe eine tragende Rolle spielt, aber nicht bei Endotoxin-vermittelter Toxizität (Leon et al., 1996; Labow et al., 1997). Nach ZNS-Verletzungen sind insbesondere aktivierte Mikroglia und Makrophagen die bedeutendste Quelle für IL1 (Schluter et al., 1997; Eriksson, Winblad, and Schultzberg, 1998; Zhang et al., 1998). Antagonisiert man die Wirkung von IL1 mittels injiziertem oder adenoviral exprimiertem IL1ra führt dies zu einer deutlichen Reduktion von neuronalem Zelltod, Leukozyteneinwanderung sowie glialer Aktivierung in Tiermodellen mit Trauma, fokaler Ischämie und Exotoxizität (Relton and Rothwell, 1992; Toulmond and Rothwell, 1995; Yang et al., 1998b).

Viele der zentralnervösen Effekte von IL1 scheinen durch IL1 β vermittelt zu werden (Alheim and Bartfai, 1998). Für die Bildung von aktivem IL1 β wird zur Spaltung der Vorläuferform IL1-converting enzyme (ICE) benötigt. In Tieren, denen dieses Enzym fehlt, ist der neuronale Schaden nach Ischämie deutlich geringer als in Kontrolltieren (Schielke et al., 1998). Neutralisiert man hingegen den antagonistisch wirkenden IL1ra, führt dies zu einer Zunahme des ischämischen Gewebeuntergangs (Loddick et al., 1997). Dies unterstreicht die Rolle von IL1 bei Entzündungsreaktionen im verletzten zentralen Nervensystem.

1.3.1.3 Interferon gamma

Interferon gamma (IFN γ) ist ein 45kD großes, glycosyliertes Protein, welches im Gewebe nur im Verlauf pathologischer Ereignisse, wie Infektionen, Trauma, Tumoren oder autoimmunen Geschehens nachweisbar ist. Produziert wird IFN γ insbesondere von Natural Killer Cells (NK) und T-Lymphozyten. Vermittelt wird die Wirkung von IFN γ über einen auf fast allen Zellen exprimierten IFN γ -Rezeptor. Eine Schlüsselrolle spielt IFN γ in der akuten Phase der Infektionsabwehr, unter anderem über vermehrte Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen (Billiau et al., 1997). IFN γ induziert zudem die Produktion freier Radikale, Phagozytose und Expression von Zytokinen und Molekülen zur Antigen-Präsentation (Suzumura et al., 1987).

In Tieren bei denen der IFN γ -Rezeptor ausgeschaltet wurde, kommt es aufgrund mangelnder Hochregulierung von iNOS, TNF α oder MHC zu einer Schwäche der Bekämpfung zentralnervöser Infektionen (Deckert-Schluter et al., 1996). In anderen Krankheitsentitäten wie z. B. der tödlichen zerebralen Malaria führt IFN γ unter

anderem über schwere mikrovaskuläre Veränderungen jedoch zu stark toxischen Effekten. In IFN γ Knockout-Mäusen fehlen diese schädigenden Effekte (Rudin et al., 1997). IFN γ hat somit nicht nur antiinfektiöses, sondern während sekundärer Immunabwehr, auch neurotoxisches Potential.

Neben seiner prädominanten Rolle als Immunstimulator; besitzt IFN γ jedoch auch immunsuppressive Eigenschaften. So spielt IFN γ bei der Graft-versus-host Reaktion nach Knochenmarkstransplantationen durch Suppression der zellulären Immunabwehr eine wichtige Rolle (Wall et al., 1988). Das dies auch im ZNS der Fall sein kann, belegen Versuche mit experimenteller Autoimmunenzephalitis (EAE) in Mäusen mit deletiertem IFN γ Signalweg. Diese zeigten einen unveränderten Beginn der übertragenen EAE, jedoch keine Erholung. Dies läßt an einen eindämmenden Effekt von IFN γ in aggressiven Autoimmunerkrankungen denken (Krakowski and Owens, 1996; Willenborg et al., 1996).

1.3.2 Mechanismus der Antigen-Präsentation: MHC1 und B7-2

Die Präsentation von prozessiertem Antigen spielt bei der Aktivierung der zellulären Immunabwehr eine Schlüsselrolle. Dafür sind spezielle Oberflächenmoleküle notwendig, die den zirkulierenden T-Zellen in standardisierter Form, die nach Phagozytose entstandenen kleinen Peptid-Stückchen zugänglich machen. Die zwei best-untersuchten Vertreter hierfür sind Major Histocompatibility Complex Class I und Class II (MHC1 und MHC2).

MHC1 ist ein aus verschiedenen Untereinheiten zusammengesetztes Glykoprotein. Es besteht aus einer α -Kette mit Transmembrandomäne, sowie einer nicht-kovalent gebundenen β 2-Mikroglobulinkette. Die Struktur der α -Kette ist derart gestaltet, daß eine Einkerbung zur Bindung von Peptiden entsteht. Das an MHC gebundene Proteinstück kann so von dem auf T-Zellen präsenten T-Zell-Rezeptor (TCR) und seinen MHC-Korezeptoren CD4, beziehungsweise CD8 erkannt werden. Das an MHC2 bindende CD 4 findet sich auf T-Helfer Zellen, während das mit MHC1 korrespondierende CD8 auf zytotoxische T-Lymphozyten exprimiert wird. Traditionell wurde angenommen, daß die beiden MHC Klassen jeweils nur selektiv entweder endogenes, zytoplasmatisches Antigen (MHC1) oder exogenes, phagozytiertes Antigen (MHC2) präsentieren können. Neuere Studien lassen jedoch vermuten, daß auch exogenes Antigen von MHC1 präsentiert werden kann (Reimann, Bohm, and Schirmbeck, 1994; Larsson et al., 2001).

Für die Erkennung von Antigenen durch die entsprechende T-Zell Population und die Entscheidung ob es zu einer Aktivierung der T-Zelle oder Anergie kommt, sind zusätzlich weitere kostimulatorische Moleküle entscheidend. Dazu gehören unter anderem B7-1, B7-2 und ICAM-1. Die B7 Moleküle gehören zur erweiterten Familie der Immunglobuline. Sie besitzen eine homodimerische Struktur. B7-1 (CD80) und B7-2 (CD86) können auf zur Antigen-Präsentation befähigten Zellen exprimiert werden. Nur wenn neben der MHC1-CD8 Interaktion gleichzeitig auch eine Bindung von B7 und dem auf T-Lymphozyten exprimiertem CD28 stattfindet, kommt es zu einer vollständigen Aktivierung der T-Zellen. Fehlt diese Ko-stimulation oder wird B7-2 von CTLA-4 gebunden, führt dies zu Anergie und damit „Ruhigstellung“ des T-Lymphozyten (Robey and Allison, 1995).

Im unverletzten Zentralnervensystem ist die Menge an konstitutiv exprimierten MHC1 und B7 sehr gering (Wong et al., 1984; Vass et al., 1986). Nach ZNS Trauma kommt es jedoch zu einem Anstieg der Antigen-präsentierenden Moleküle, insbesondere von MHC1, und ko-stimulierender Faktoren auf aktivierter Mikroglia (Akiyama and Mcgeer, 1989; Streit, Graeber, and Kreutzberg, 1989a, b). Welche molekularen Signale *in vivo* die Expression von MHC1 und B7 nach Fazialisaxotomie in der Maus anregen ist nicht hinreichend erforscht. Mehr Daten gibt es aus *in vitro* Versuchen mit mikroglialen Zellkulturen. Während Interleukin 10 und Prostaglandin E2 B7-2 Expression verringern, wird sie durch Interferon γ und Endotoxin angeregt (Menendez Iglesias et al., 1997).

1.3.3 Lipopolysaccharide

Endotoxine sind biologisch aktive Moleküle die beim Zerfall der Zellwand gram-negativer Bakterien entstehen. Ihnen kommt bei der Pathogenese von Fieber, septischen Schock und Entzündungsreaktionen eine Schlüsselrolle zu (Mayer, 1998; Jindal, Hollenberg, and Dellinger, 2000). Die am besten charakterisierten Vertreter dieser Gruppe sind Lipopolysaccharide (LPS).

Kontakt mit LPS ist für viele Zellarten, unter anderem Monozyten, Granulozyten, gliale Zellen und Endothelzellen, ein starker Stimulus und löst Signalwege aus, die zu Entzündungsreaktionen oder Apoptose führen (Chow, Grinstein, and Rotstein, 1995; Rieckmann et al., 1995; Bannerman and Goldblum, 1999; Wagner and Roth, 1999). Seine Wirkung entfaltet LPS über verschiedene Rezeptorsysteme zu denen insbesondere CD14 sowie Toll-like Rezeptor 2 und 4 gehören. In Makrophagen

führt LPS zu einer raschen Freisetzung von IL1 und TNF α , welche indirekt weitere Zytokinfreisetzung nach sich ziehen (Buttini and Boddeke, 1995; Buttini et al., 1997). Zudem kommt es zur gesteigerten Synthese von NO, Prostaglandinen und der Expression von Adhäsionsmolekülen wie ICAM1, P-Selectin und E-Selectin, auf der Zelloberfläche (Prudhomme et al., 1996; Garcion et al., 1998; Kloss et al., 2001). Dies und die Freisetzung von Chemokinen wie MIP-1 α , MIP-1 β , MCP-1 oder KC (Mayer, 1998; Rovai, Herschman, and Smith, 1998; Suffredini et al., 1999) spielen bei der Chemotaxis und Rekrutierung von Leukozyten ins Gewebe eine bedeutende Rolle.

In vivo induziert die Freisetzung von LPS eine ausgeprägte inflammatorische Reaktion die das Gefäßsystem, periphere Gewebe und das ZNS einschließt und, dosisabhängig, im lethalen septischen Schock kumulieren kann. Die Vielfalt der zellulären und molekularen Reaktionen, die sich in ihrem zeitlichen Ablauf und Dosis-Abhängigkeit unterscheiden, legt die Präsenz verschiedener Signal-Transduktionskaskaden (Ingalls et al., 1998; Netea et al., 1998; Landmann, Muller, and Zimmerli, 2000; Means, Golenbock, and Fenton, 2000) beziehungsweise sekundärer Effekte nahe (Alheim and Bartfai, 1998; Wang et al., 1999) und läßt sich grob in drei Phasen unterteilen.

In Tierversuchen erfolgt die Freisetzung von Interleukin 1 und die dadurch vermittelte Fieberreaktion sehr schnell und bereits bei niedrigen Dosen (Alheim and Bartfai, 1998; Ma et al., 2000). Ein ebenfalls rascher Anstieg ist beim Transkriptionsfaktor NF κ B (Essani et al., 1996) und den Zytokinen IL6 und TNF α (Eskay, Grino, and Chen, 1990) zu sehen. Zu einer zweiten Gruppe von Molekülen, deren Produktion durch mittlere Dosen LPS in einem Zeitraum von drei bis zwölf Stunden gesteigert wird, gehören E- und P-Selektine (Essani et al., 1996), NO (James, Liu, and Swartz, 1998) und Interleukin 10 (Barsig et al., 1995). Eine dritte, noch nicht näher charakterisierte Gruppe von Mediatoren, kommt erst bei sehr hohen LPS Dosen mit einigem zeitlich Abstand zum Tragen und scheint für den septischen Schock pathognomonisch zu sein (Wang et al., 1999). Für die Existenz dieser distinkten dritten Gruppe spricht, daß sich der Übergang zur vollen Schock-Symptomatik durch frühe Inhibition von TNF α oder IL1 inhibieren läßt, im Verlauf dann allerdings nicht mehr (Tracey et al., 1987; Wakabayashi et al., 1991).

Aufgrund ihrer guten Reproduzierbarkeit, sind lokal oder systemisch applizierte Endotoxine ein einfaches Modell um Entzündungsreaktionen im Tier hervorzurufen

und deren Wechselbeziehung mit zeitgleich bestehenden traumatischen ZNS-Läsionen zu untersuchen.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Verletzungen des Zentralen Nervensystems gehen mit einer in ihrer Sequenz inzwischen gut charakterisierten Abfolge morphologischer und funktioneller Veränderungen der betroffenen Neurone und Gliazellen einher. Dabei kommt es zudem zu inflammatorischen Reaktionen, an der auch Zellen des peripheren Immunsystems beteiligt sind. Selbst nach leichten indirekten Traumen mit intakt bleibender Blut-Hirn-Schranke, wie in dem Modell der peripheren Durchtrennung des Nervus facialis kommt es um Tag 14 zu einer späten Entzündungsreaktion.

Ziel dieser Arbeit ist es, die Ereignisse der späten Entzündungsphase insbesondere im Hinblick auf ihre Abhängigkeit von proinflammatorischen Zytokinen zu untersuchen. Hierzu wurden die zellulären Reaktionsmuster in Mäusen, die defizient für verschiedene Zytokin-Rezeptoren sind verglichen. Das Augenmerk wurde besonders auf die spät-exprimierten Mediatoren, TNF α , IL1 und IFN γ , gerichtet. In diesen transgenen Tieren wurden jeweils mehrere Parameter analysiert.

Initial richtete sich das Interesse auf das neuronale Überleben. Aus Voruntersuchungen war bekannt, daß um Tag 14 nach Fazialisaxotomie der späte neuronale Zelltod sein Maximum erreicht. Von Interesse waren hier eventuelle neuroprotektive oder prodegenerative Eigenschaften der untersuchten Zytokine, die die Weichenstellung zwischen Regeneration und Degeneration beeinflussen könnten.

Anschließend wurden mikrogliale Zellen auf ihre Fähigkeit hin, anfallendes neuronales Zelldebris zu phagozytieren, prozessiertes Antigen mittels MHC1-Molekülen zu präsentieren und ko-stimulatorische Moleküle zu exprimieren untersucht. Ferner wurde der Einfluß einzelner Zytokin-Systeme auf die Rekrutierung peripherer Lymphozyten in das verletzte Hirnareal ausgewertet.

Zuletzt wurde die Auswirkung eines zusätzlich zum Trauma hinzukommenden exogenen proinflammatorischen Stimulus auf die Rekrutierung peripherer Leukozyten betrachtet. Dazu wurde den Tieren nach Fazialisaxotomie subkutan LPS appliziert. Zur weiteren Charakterisierung der für die Extravasion der

Leukozyten relevanten Adhäsionsmoleküle, wurden diese Versuche auch in ICAM-1-defizienten Tieren durchgeführt.

2. Material und Methoden

2.1 Tierexperimentelle Modelle

Eine Aufstellung der für diese Arbeit verwendeten Mäusstämme findet sich im Abschnitt 2.7.1 in Tabelle 1.

Vor allen Operationen wurden die Tiere durch eine intraperitoneale Injektion von 150µl 2,5% Avertin pro 10 g Körpergewicht narkotisiert. Die Tierversuche waren von der Tierschutzbehörde der Regierung von Oberbayern genehmigt. (AZ 211-2531-10/93 und AZ 211-2531-37/97).

2.1.1 Durchtrennung des Nervus facialis

Für diese Studie zur Aufklärung der Entzündungsreaktion nach neuronaler Läsion wurden Gehirnschnitte von Wildtyp- und Transgenen Mäusen immunhistochemisch untersucht. Hierfür ist das gewählte Modell des axotomierten Nervus facialis besonders gut geeignet. Bei den meisten etablierten tierexperimentellen Modellen für Hirnverletzungen, wie zum Beispiel direktes Trauma, Infektionen, Ischämie oder allergische Enzephalomyelitis, wird auch die Blut-Hirn-Schranke zerstört. Dadurch kommt es zu einem Einstrom von Serumproteinen und einer Einwanderung hämatopoetischer Zellen. Speziell letzteres bereitet bei der Untersuchung der lokalen Entzündungsreaktion Schwierigkeiten. Zum einen gleichen die einwandernden Blutmakrophagen morphologisch und in ihrer Antigen-Ausstattung weitgehend aktivierten mikroglialen Zellen, so daß eine Unterscheidung schwierig ist. Zum anderen bilden die immigrierten Zellen eine Vielzahl potenter Zytokine und Chemokine, die ihrerseits eine Wirkung auf die hirneigenen Zellen entfalten. Da der Läsionsort bei der Fazialisaxotomie außerhalb des Zentralen Nervensystems liegt und die Blut-Hirnschranke somit intakt bleibt, können in dem hier verwendeten Modell die sekundären Effekte durch einwandernde Makrophagen und Granulozyten reduziert und spezifisch die Aktivierung der residenten Hirnzellen untersucht werden. Daneben bietet das Modell der peripheren Durchtrennung des motorischen Anteils des Nervus facialis noch weitere Vorteile. Die Transsektion ist, dank der oberflächlichen Lage des Nervus facialis, ein kurzer und für die Mäuse nicht sehr belastender Eingriff. Da der Nucleus facialis mit ca 0,7 mm³ der größte

motorische Hirnnervenkern ist, liefert er ausreichend Gewebe für histochemische Studien. Bei einer einseitigen Durchtrennung besteht zudem der große Vorteil, auf jedem Gehirnschnitt den unverletzten Nucleus facialis der Gegenseite als intraindividuelle Negativkontrolle zu haben. Ein weiteres Plus ist, daß die Läsion des Nervus facialis eine in ihrem Ablauf sehr stereotype, zeitlich und morphologisch wohl definierte Reaktion im Nucleus facialis auslöst. Die Axotomie der motorischen Fasern führt in der Maus einerseits zu einem späten Untergang von etwa 20 - 30% der Motoneurone und anschließender spezifischer Einwanderung von Lymphozyten und Anlagerung an die phagozytotischen mikroglialen Knötchen. Andererseits kommt es zu einer erfolgreichen Regeneration mit Reinnervation der Gesichtsmuskulatur und Vibrissen. Nicht zuletzt, hat dieses tierexperimentelle Modell wegen der häufigen Inzidenz von Fazialis-Paresen bei neurologischen Patienten auch klinische Relevanz.

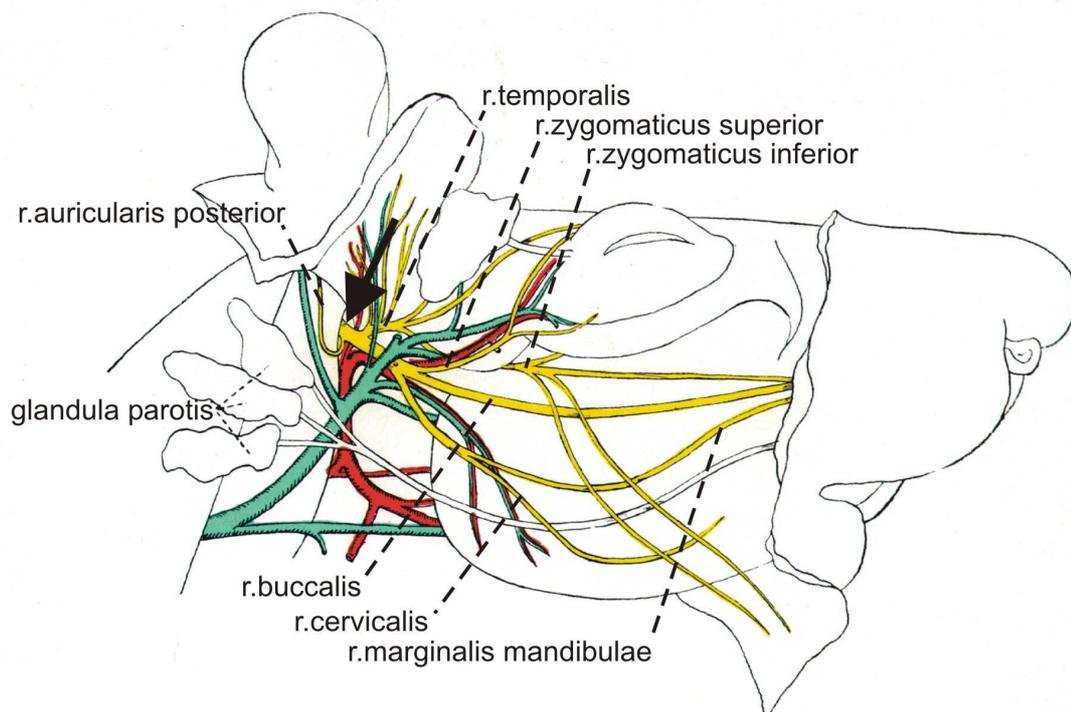


Abbildung 4: Anatomie des Nervus facialis.

Der Nerv wird unmittelbar nach seinem Austritt aus der Schädelbasis durch das Foramen stylomastiodeum mit einer Schere durchtrennt (Pfeilspitze). Dabei wird besonders auf die Miterfassung des Ramus auricularis posterior geachtet. Modifiziert nach Green, 1963.

Für die Operation wurde bei den narkotisierten Mäusen die Haut kaudal des rechten Ohres mit Alkohol desinfiziert und ausrasiert. Nach einem Hautschnitt wurde das Bindegewebe stumpf gespalten und der Nervus facialis mitsamt dem sehr proximal abgehenden Ramus auricularis posterior dargestellt. Die Transsektion erfolgte unmittelbar nach dem Austritt aus dem Foramen stylomastoideum. Anschließend wurde die Haut durch einen Metallklip verschlossen und die Mäuse bis zum Ende der Narkose auf einem Wärmekissen positioniert.

2.1.2 Systemische Applikation von Lipopolysaccharid

Als ergänzendes Modell zur glialen Aktivierung wurde in einigen Experimenten den Tieren zusätzlich zur Fazialis-Axotomie auch subkutan Lipopolysaccharide (LPS) injiziert. Dabei handelt es sich um Bestandteile der Zellwand Gram-negativer Bakterien, die hochpotente Aktivatoren des Monozyten-Makrophagensystems sind und denen insbesondere bei der Pathogenese des septischen Schocks und von Entzündungen eine bedeutende Rolle zukommt (Luheshi, 1998; Saper, 1998). Durch die systemische Applikation von LPS blieb auch in diesem Ansatz die Blut-Hirnschranke primär unverletzt. Für LPS scheint die BHS aber auch im intakten Gehirn nicht nur in primär durchlässigen Bereichen wie der Area postrema, permeabel zu sein (Grau et al., 1997). Ein Vorteil des Modelles ist die Parallellität zu den pathophysiologischen Vorgängen die im Menschen beim Zerfall Gram-negativer Bakterien ablaufen.

Vor der Injektion wurden die Mäuse am Tag 12 nach Fazialis-Axotomie kurz mit Äther narkotisiert. Anschließend bekamen sie einmalig LPS in einer Dosis von 1µg, 10µg, 100µg, 1mg oder 3mg bzw. physiologische Kochsalzlösung als Kontrolle, subkutan am Rücken appliziert. Für eine zweite Versuchsserie erhielten die Tiere vier Injektionen á 0,5mg in 12-stündigen Abständen.

2.1.3 Markierung hämatogener Leukozyten durch Rhodamine

Zur Detektion von hämatogenen Blutzellen im Gehirn wurden diese vor Versuchsbeginn im lebenden Tier mit Rhodamin markiert. Rhodamin ist ein fluoreszierendes Molekül, welches über Schwefelreste kovalent gebunden wird (Ling and Wong, 1993; Jones et al., 2000). Nach subkutaner Injektion von 50mg Rhodamine-B-Isothiocyanate in PBS 96h vor Versuchsbeginn, lassen sich speziell Monozyten und Granulozyten anfärben (Raivich et al., 1998a), die sich, bei

anschließender fluoreszenzmikroskopischer Untersuchung von Gehirnschnitten, rot fluoreszierend darstellen.

2.1.4 Beurteilung der Blut-Hirnschranke durch systemische Injektion von humanem Serumalbumin

Die Intaktheit der Blut-Hirnschranke wurde durch systemische Gabe von humanem Serumalbumin (hSA) und dessen nachfolgende immunhistochemische Detektion überprüft. In gesunden, unbehandelten Tieren läßt sich das hSA 48h nach Applikation nur in den Hirnstammarealen mit fehlender Blut-Hirnschranke, wie der Area postrema und dem Nucleus tractus solitarii nachweisen. Bei Zusammenbruch der Blut-Hirnschranke findet sich hSA Immunreaktivität überall im Hirnparenchym. Für die Experimente hier, wurden den Mäusen 50mg PBS-gelöstes hSA intraperitoneal gespritzt.

2.2 Gewebepräparation und Gewebefixierung

Die Gewinnung des Hirngewebes für die mikroskopischen Untersuchungen erfolgte zu definierten Zeitpunkten nach der Fazialisaxotomie, bzw. LPS Injektion.

Für die immunhistochemischen Untersuchungen wurden zum Einen eine Zeitreihe mit Sakrifikation von jeweils 5-6 Tieren an Tag 0, 1, 2, 4, 7, 14, 21 und 42 nach Operation erstellt. Für die Versuche mit den transgenen Mäusen war die Überlebenszeit, wenn nicht anders beschrieben, 14 und 21 Tage. Bei Erreichen der Überlebenszeit wurden die Tiere in Diäthyl-Äther getötet und unmittelbar nach dem Todeseintritt intrakardial mit 200 ml PBS perfundiert um die Blutbestandteile aus dem Gefäßsystem zu spülen. Im folgenden wurde das Gewebe, je nachdem ob eine licht- beziehungsweise fluoreszenzmikroskopische Untersuchung oder elektronenmikroskopische Analyse geplant war, unterschiedlich weiterbehandelt.

2.2.1 Gewebeaufbereitung für Licht- und Fluoreszenzmikroskopie

Für die konventionelle Licht- bzw. Fluoreszenzmikroskopie wurde das Tier nach dem Durchspülen mit PBS, mit 200ml 4% Paraformaldehyd in PBS perfundiert (40ml/min). Das fixierte Gehirn und die Milz wurden herauspräpariert und erst zur Post-Fixierung für 2 Stunden in 1% PFA, dann zur Kryoprotektion für 12 Stunden in 30% Saccharoselösung bei 4°C auf einem Rotator inkubiert. Das Gewebe wurde

schließlich auf Trockeneis eingefroren und bis zur weiteren Bearbeitung bei -80°C gelagert. Die $20\mu\text{m}$ dicken Gehirnschnitte wurden mit einem Kryostaten (Reichert-Jung, Med. 2700, Frigocut) bei einer Kammertemperatur von -20°C und einer Objekttemperatur von -10°C angefertigt und auf warmen, mit 0,5% Gelatine beschichteten Objektträgern aufgenommen. Diese wurden sofort wieder auf Trockeneis abgekühlt und bis zur Färbung bei -80°C gelagert.

Für unfixierte Gehirnschnitte, wurde das Gewebe sofort nach dem Töten entnommen und auf Trockeneis eingefroren. Die Herstellung der Schnitte, erfolgte ebenso wie bei fixierten Gehirnen.

2.2.2 Gewebeaufbereitung für Elektronenmikroskopie

Für ultrastrukturelle Analysen wurden die Tiere nach dem Auswaschen des Blutes mit 200ml EM-PBS mit 100ml 4% Paraformaldehyd, gefolgt von 100ml 4% Paraformaldehyd & 0,5% Glutaraldehyd in EM-PBS perfundiert (40ml/min). Nach einer Nachfixierung in 1% PFA für 2 Stunden, wurde das Gewebe sofort in Agarose eingebettet und mit einem Vibratom in $60 - 80\mu\text{m}$ Schnitte geschnitten.

2.3 Lichtmikroskopische Histologie

2.3.1 Nissl-Färbung für die Bestimmung der Neuronenzahl

Zur Bestimmung der Neuronenzahl im Nucleus facialis wurden die Gehirne über die gesamte Ausdehnung des Kerngebiets $25\mu\text{m}$ dick geschnitten. Die Schnitte wurden sofort nach dem Schneiden faltenfrei auf den Objektträger platziert, getrocknet, für 48 Stunden 4% FA fixiert. Anschließend wurden die Schnitte bei 4°C für mindestens 24h in 70% Ethanol gelagert. Die Färbung erfolgte in 1% Kresylviolett-Lösung für 10 Minuten. Nach einem Waschschrift in Aqua bidest., wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe wieder entfärbt, wobei dem letzten 96%-Alkoholbad einige Tropfen Eis-Essig beigefügt wurden. Die Prozedur wurde so lange wiederholt, bis die gewünschte Färbintensität erreicht war. Dann erfolgte die endgültige Dehydrierung und Einbettung in Xylol-haltigem DePeX.

2.3.2 Immunhistochemische Färbung mit dem ABC/DAB-System und Titration der Antikörper

Für die immunhistochemische Färbung wurden die eingefrorenen 20µm dicken Gewebeschnitte mit bidestilliertem Wasser rehydriert, unter einem Stereomikroskop blasen- und debrisfrei auf dem Objektträger ausgebreitet und für 15 Minuten luftgetrocknet. Anschließend wurden sie für 5 Minuten in 4% FA in PB inkubiert, wodurch das Gewebe kovalent an den gelatinieren Objektträger gebunden wird. Nach einem Waschschrift in PB, wurden die Schnitte für die meisten Antikörper in einer Azetonreihe bestehend aus 50%, 100% und nochmal 50% Azeton für jeweils 2 Minuten entfettet und gut in PB und PB/BSA gewaschen. Zum Abbinden unspezifischer Bindungen wurde im folgenden 5% Ziegenserum in PB/BSA für 30 Minuten auf die Schnitte gegeben. Nach Abnahme des Ziegenserums begann die Übernacht-Inkubation mit dem optimal verdünnten Primärantikörper bzw. PB/BSA als Negativkontrolle bei 4°C. Der primäre Antikörper wurde am nächsten Tag mit einem biotinylierten speziesspezifischen Sekundärantikörper aus der Ziege detektiert. Um eine Kreuzreaktivität mit Maus-Immunglobulinen abzusättigen, und so die unspezifische Hintergrundfärbung auf dem Schnitt zu reduzieren, wurde der sekundäre Antikörper vor der Endverdünnung für 30 Minuten mit dem doppelten Volumen Mausserum bei 37°C inkubiert. Der präinkubierte Antikörper wird schließlich in 5% Ziegenserum enthaltendem PB/BSA 1:100 verdünnt und auf die Objektträger pipettiert. Nach 1 Stunde wurde der Sekundärantikörper abgewaschen und mit dem Avidin-Biotin-Peroxidase System visualisiert. Dabei wird während der 1-stündigen Inkubation biotinylierte Peroxidase über eine Biotin-Avidin-Biotin Brücke an den sekundären Antikörper gebunden. Die Schnitte wurden anschließend gewaschen und für 5 Minuten in DAB/H₂O₂ gesetzt. Die an den Ort der primären Antikörperbindung gebundene Peroxidase ist in der Lage, Diaminobenzidin (DAB) unter Reduktion von H₂O₂ zu oxidieren. Dies führt lokal zu einer Polymerisierung und Bildung eines unlöslichen, rot-braunen Niederschlags (Graham and Karnovsky, 1965; Sternberger, 1986). Die enzymatische Reaktion wurde durch mehrfaches Waschen in Leitungswasser abgestoppt und die Schnitte nachfolgend in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert, in Xylol entfettet und in DePeX eingebettet. Der Hintergrund an DAB-Reaktivität, der von endogenen Peroxidasen verursacht wird, konnte jeweils an Negativkontrollen ohne Antikörper beurteilt werden. Als Positivkontrollen wurden Milzschnitte verwendet. Die Expression einer Vielzahl der

untersuchten Antigene, insbesondere von MHC1, MHC2 und B7-2 ist auf hämatopoetischen Zellen beschrieben. Deshalb ist die Milz, die zum großen Teil aus Blutzellen besteht als Positivkontrolle für den immunhistochemischen Expressionsnachweis mit Antikörpern und zur Bestimmung der optimalen Antikörperkonzentration gut geeignet. Für jeden Antikörper wurde in Milz- und Gehirngewebe eine Titrationsreihe mit und ohne Azetonvorbehandlung erstellt. Die eingesetzten Verdünnungen waren jeweils 1:25, 1:100, 1:400, 1:1.600, 1:6.400, 1:25.600 sowie eine Negativkontrolle. Die Konzentration mit dem besten Hintergrund – Signal Verhältnis stellte die optimale Konzentration dar, die für die weiteren Versuche eingesetzt wurde. Tabelle 2 und 3 geben eine Liste der benutzten primären, Tabelle 4 der sekundären Antikörper wieder.

2.3.3 Kobalt-Nickel verstärkte DAB Färbung

Zur Intensivierung des Signals wurde, insbesondere zur Zählung der mikroglialen Knötchen, Granulozyten und CD3 gefärbten Zellen, eine modifizierte DAB-Färbung angewendet. Dabei wurde dem DAB/H₂O₂ Gemisch aus 0,25 g/l CoCl₂ und 0,2 g/l NiSO₄ zugesetzt. Die Kobalt- und Nickel-Ionen chelatieren das polymerisierte DAB und verleihen dem sich in dieser Reaktion bildenden Niederschlag einen intensiven blau-schwarzen Farbton (Hsu and Soban, 1982).

2.3.4 Nachweis von neutrophilen Granulozyten mittels endogener Peroxidase

Die Färbung der neutrophilen Granulozyten erfolgte neben einer Immunfärbung mit 7/4 zur Kontrolle auch mittels Verstärkung der endogenen Peroxidase. Dafür wurden die fixierten Schnitte für 10 Minuten in 3% biotinyliertem Tyramin und 0,01% in PB inkubiert. Das Tyramin wird dabei durch die Peroxidase oxidiert und bindet an der Stelle der enzymatischen Aktivität kovalent an das Gewebe. Über das an das Tyramin gekoppelte Biotin kann das gebundene BT mit dem ABC/DAB-Verfahren wie oben beschrieben verstärkt und visualisiert werden (Adams, 1992).

2.3.5 Quantifizierung der Immunreaktivität (Mean-SD Algorithmus)

Zur Darstellung wurden die DAB gefärbten Schnitte an einem Zeiss Axiophot Mikroskop mittels eines Leica S1 Alpha Scanners digitalisiert und in dem

Bildverarbeitungsprogramm OPTIMAS 6.2 für die Illustration aufgearbeitet. Dabei wurden alle Schnitte einer Versuchsreihe gleich behandelt.

Zur Quantifizierung der Gesamtimmunreaktivität im Zeitverlauf und in den verschiedenen Knock-out Tieren wurden die Schnitte mit einem 5-fach Objektiv und einer Sony 89B CCD Kamera (Model XC-77CC) aufgenommen. Die Auflösung der Kamera ist 640 x 400 Bildpunkte und liefert pro Bildpunkt einen optischen Lichtwert (OLW) zwischen 0 und 255. 255 entspricht dabei der maximalen Lichtintensität, also keiner Färbung und 0 minimaler Lichtintensität, also sehr dunkler Färbung. In dem digitalisierten Bild wurde nun in OPTIMAS der Nucleus facialis als Auswertebereich (ROI) markiert und Mittelwert (MEAN) und Standardabweichung (SD) der Pixel-OLW ermittelt. Ein gleichmäßiger Anstieg der Färbung wird als gleichmäßiger Abfall der OLW in vielen Bildpunkten, und damit auch des OLW-Mittelwerts, sichtbar. Subjektiv entspricht aber auch ein sehr starker Anstieg von nur wenigen Pixeln einer stärkeren Färbung. Bei diesem Reaktionsmuster würde sich der OLW-Mittelwert aber nur wenig ändern, wobei es jedoch zu einem deutlichen Anstieg der OLW - Standardabweichung kommen würde. Da sich MEAN und SD bei unterschiedlichen Färbemustern gegenläufig verhalten, dient der (MEAN-SD) - Algorithmus als besonders stabiles Maß bei der Auswertung von DAB-Färbungen (Moller et al., 1996). Als Maß für die Stärke der Färbung wurde in den Versuchen die Färbeintensität (FI) mit diesem Algorithmus berechnet. Die Formel lautet:

$$\text{Färbeintensität} = 255 - (\text{MEAN} - \text{SD})$$

wobei sich Mittelwert und Standardabweichung auf die Pixel-OLWs im Auswertebereich beziehen und wegen der Subtraktion von 255, die Werte für die Färbeintensität mit zunehmender Absorption ansteigen.

Um Schwankungen zwischen einzelnen Schnitten einer Reihe zu reduzieren, wurde als Referenz jeweils noch eine Aufnahme der Mittellinie gemacht miteinbezogen, so daß sich als endgültige Formel ergibt:

$$\text{Färbeintensität} = (\text{MEAN}_{\text{Mittellinie}} - \text{SD}_{\text{Mittellinie}}) - (\text{MEAN}_{\text{Nucleus}} - \text{SD}_{\text{Nucleus}})$$

2.3.6 Statistische Auswertung der Gesamt-Immunreaktivität

Zur Quantifizierung von Unterschieden der Gesamt-Immunreaktivität in den einzelnen Experimenten wurde jeweils pro Zeitpunkt bzw. Tiergruppe die Färbeintensität nach dem oben beschriebenen Algorithmus berechnet. Es wurde anschließend der Mittelwert der Färbeintensitäten je Gruppe (jeweils 4 - 6 Tiere) für die axotomierte und kontralaterale Seite gebildet. Die Werte wurden nach EXCEL übertragen, graphisch aufgetragen und mit einem gepaarten t-Test bei einem Signifikanzniveau von 5% auf statistisch signifikante Unterschiede getestet.

2.4 Fluoreszenz Immunhistochemie

Da nicht alle Fragestellungen mit der DAB-Niederschlagsfärbung hinreichend beantwortet werden konnten, wurden zusätzlich immunhistochemische Färbungen mit fluoreszenzgekoppelten Zweitantikörpern visualisiert. Dies hat mehrere wesentliche Vorteile. Wird in der konventionellen Immunhistochemie ein Anstieg der Immunreaktivität beobachtet, so läßt sich nicht mit Sicherheit feststellen wodurch dieser Anstieg zu Stande kommt. Es kann zum einen schlecht differenziert werden welcher Zelltyp das Antigen exprimiert, zum anderen kann keine Aussage getroffen werden, ob der Anstieg der Gesamtimmunreaktivität auf erhöhte Antigenexpression der einzelnen Zellen oder auf einer Proliferation von Zellen ohne individuellen Färbeanstieg beruht.

2.4.1 Immunfluoreszenz - Doppelmarkierungen

Eine Lösung für diese Probleme bieten Immunfluoreszenz-Doppelmarkierungen. Fluoreszenzfärbungen haben nicht nur den Vorteil einer besonders hohen Aufnahmesensitivität im konfokalen Lasermikroskop, sie ermöglichen auch, indem Zweitantikörper die an Farbstoffe mit unterschiedlichen Fluoreszenzspektren gekoppelt sind verwendet werden, die simultane Markierung mehrerer Antigene. Durch Auswahl eines konstitutiv exprimierten, Zelltyp-spezifischen Markers läßt sich die zu untersuchende Expression z.B. Astrozyten, Mikroglia oder Neuronen zuordnen. Zudem kann die Menge des Antigens unabhängig von einer eventuellen Proliferation der Zellen semiquantitativ abgeschätzt werden. In dieser Studie dient IBA1 als Marker für Mikroglia, TSP als Marker für phagozytierende Knötchen, und GFAP als Astrozytenmarker (Moore, 1989; Klein et al., 1997).

Das Färbeprotokoll ist dem unter 2.3.2 beschriebenen im wesentlichen sehr ähnlich. Eine Modifikation ist die Präinkubation der Schnitte in 5% Esel-Normalserum für 30 Minuten vor der simultanen Zugabe der monoklonalen und polyklonalen Erstantikörper. Diese stammen aus verschiedenen Wirtstieren, damit sie anschließend mit den entsprechenden Zweitantikörpern getrennt detektiert werden können. Die monoklonalen Antikörper wurden jeweils für 2 Stunden bei Raumtemperatur mit einem Fluoreszein-5-Isothiocyanat-gekoppelten (FITC) Antikörper aus Ziege (1:100 in PB/BSA), und dann in einem weiteren Verstärkungsschritt mit einem ebenfalls FITC-konjugierten, gegen Ziegen-Ig gerichteten tertiären Antikörper aus Esel (1:100 in PB/BSA) detektiert. Parallel wurde mit einem gegen Kaninchen-Ig gerichteter biotinyliertem Antikörper aus Ziege (1:100 in PB/BSA), gefolgt von TexasRed-Avidin (1:1000 in PB/BSA) inkubiert. Nach dem Waschen wurden die Schnitte in Vectashield eingebettet und bis zum weiteren Gebrauch bei 4°C im Dunklen gelagert. Die Digitalisierung erfolgte jeweils innerhalb von 5 Tagen.

2.4.2 Konfokale Laser Scanning Mikroskopie

Zur Darstellung und Analyse der Fluoreszenzfärbungen wurden digitale Mikrographien der FITC-, TexasRed- und zusätzlich der Autofluoreszenz mit einem Leica TCS 4D konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop aufgezeichnet. Die resultierenden Bilder hatten eine Größe von 1024 x 1024 Pixel, wobei jedem Bildpunkt ein OLW von 0 (maximal dunkel) bis 255 (maximal hell) zugeordnet wurde. Die FITC und TexasRed Aufnahmen wurden jeweils um die Autofluoreszenz korrigiert bevor der relative Färbefaktor, d.h. die durchschnittliche Färbung der einzelnen Zelle im Verhältnis zum Hintergrund, mit dem RISC-Algorithmus errechnet wurde.

Das Prinzip der Fluoreszenzmikroskopie basiert auf der Eigenschaft von Farbstoffen Licht bestimmter Wellenlängen zu absorbieren und dann Licht anderer Wellenlängen zu emittieren. Da sich die verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffe in ihrem Anregungs- und Emissionsspektrum unterscheiden, können sie simultan eingesetzt werden. Hier wurde vor allem FITC und TexasRed verwendet. FITC wurde mit der 488 nm Linie des Argon-Krypton-Laser angeregt und mit einem BP-FITC Filter, der Wellenlängen zwischen 510 und 530 nm berücksichtigt, detektiert. TexasRed wurde bei einer Wellenlänge von 588 nm angeregt und die Emission mit

einem LP590 Filter gemessen. Für die quantitativen Untersuchungen wurden die Bilder mit einem 10x Objektiv, was einer Fläche von 1 x 1 mm entspricht, bei konstanter Laser- und Detektionsspannung aufgenommen. Für Detailaufnahmen wurden auch 20x, 40x oder 100x Objektive benutzt. Da die konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie ein Fokussieren des Laserstrahls in einer genau definierten Tiefenebene ermöglicht, kann hier neben der zweidimensionalen Auflösung konventioneller Mikroskope auch noch die Dicke des Gewebeschnittes als dritte Dimension berücksichtigt werden. Für die Experimente wurden für jedes Bild 10 aufeinanderfolgende Schnittebenen in gleichen Abständen aufgenommen und mit dem MaxIntens-Algorithmus zu einer einzigen Mikrographie kondensiert. Bei diesem Verfahren wird an jedem der 1024 x 1024 korrespondierenden Pixel das hellste aus den 10 Ebenen ausgewählt und zu einer neuen Bildmatrix zusammengesetzt. So resultieren pro gescanntem Bildausschnitt nach dem Camera-lucida-Prinzip drei originale Bildmatrizen: eine FITC-Matrix, eine TexasRed-Matrix und eine Autofluoreszenz-Matrix. Diese Matrizen wurden als Graustufenbilder als TIFF-Datei gespeichert und zur weiteren Analyse nach OPTIMAS 6.2 exportiert.

2.4.2.1 Digitale Extraktion der Autofluoreszenz

Insbesondere in fixiertem Gewebe, führt die Bestrahlung mit Laserlicht zur Emission unspezifischer Fluoreszenz oder Autofluoreszenz (AF). Im Mäusegehirn sind vor allem phagozytierende Mikrogliazellen und Lipofuscinkörperchen in den Neuronen besonders stark leuchtende Strukturen. Da die Autofluoreszenz ein sehr breites Emissionsspektrum hat, scheint sie in alle Detektionskanäle durch und addiert sich zu den jeweils spezifischen FITC- oder TexasRed-Fluoreszenzen. Um das Problem der Überlagerung zu verringern, wurde eine Korrektur nach dem von Raivich beschriebenen Prinzip (Raivich et al., 1998b) durchgeführt. Dazu wurde der Schnitt bei 647nm mit maximaler Laserstärke angeregt und mit einem LP655-Filter die Emission im Infrarotbereich, in dem die beiden anderen Farbstoffe nichtmehr emittieren, mit maximaler Detektionsspannung aufgezeichnet. In diesem Bild wurden nun die hoch-autofluoreszenten Strukturen durch eine OLW-Schwellenwert, der sich aus Mittelwert und Standardabweichung nach der Formel $MEAN + 5xSD$ berechnet, gesucht. Die markierten Profile der entsprechenden Strukturen wurden als Maske in das FITC- und TR-Bild übertragen und mit der spezifischen Fluoreszenz in Bezug gesetzt. Daraus wurden dann jeweils lineare

Extraktionskoeffizienten bestimmt. Die Korrektur der Autofluoreszenz wurde durch Subtraktion des OLW des korrespondierenden Pixels im Autofluoreszenzbild, unter Gewichtung mit dem jeweiligen Koeffizienten, vom FITC- bzw. TR-Bild durchgeführt. Dazu wurden zuerst die TIFF-Dateien für FITC, TR und Autofluoreszenz (AF) nach OPTIMAS importiert. Dort wurde im AF-Bild der Mittelwert ($MEAN_{AF}$) und die Standardabweichung (SD_{AF}) aller Pixel bestimmt und stark leuchtende Strukturen durch einen OLW-Schwellenwert der sich nach $MEAN_{AF} + 5 \times SD_{AF}$ berechnete markiert. Nun wurde der Mittelwert der OLW dieser Strukturen bestimmt ($MEAN_{HAS-AF}$). Diese Profile wurden nacheinander auf die korrespondierende FITC- und TR-Matrix (OM_{FITC} , OM_{TR}) übertragen. In jeder der Matrizen wurde nun der Mittelwert der OLW zum einen in allen Pixeln ($MEAN_{FITC}$, $MEAN_{TR}$), zum anderen nur in den aus dem AF-Bild übertragenen Profilen bestimmt ($MEAN_{HAS-FITC}$, $MEAN_{HAS-TR}$). Die linearen Extraktionskoeffizienten für FITC (LEK_{FITC}) und TR (LEK_{TR}) wurden wie folgt errechnet.

$$LEK_{FITC} = (MEAN_{HAS-FITC} - MEAN_{FITC}) : (MEAN_{HAS-AF} - MEAN_{AF})$$

$$LEK_{TR} = (MEAN_{HAS-TR} - MEAN_{TR}) : (MEAN_{HAS-AF} - MEAN_{AF})$$

Dann wurden die korrigierten Matrizen für FITC (KM_{FITC}) und TexasRed (KM_{TR}) berechnet indem für jeden Bildpunkt folgende Formel angewandt wurde:

$$KM_{FITC} = OM_{FITC} [x,y] - LEK_{FITC} \times OM_{AF} [x,y]$$

$$KM_{TR} = OM_{TR} [x,y] - LEK_{TR} \times OM_{AF} [x,y]$$

wobei x und y die Position des Pixels in der 1024 x 1024 Matrix bezeichnen. Die Extraktion der Autofluoreszenz erfolgte teilautomatisch durch Programmierung in OPTIMAS und EXCEL (Kloss et al., 1999). Die Bilder wurden nun zur Weiterverarbeitung als TIFF-Datei gespeichert.

2.4.2.2 Zelltypspezifische Quantifizierung von Immunreaktivität (DIFF-RISC – Algorithmus)

Zur Quantifizierung von zellulärer Immunreaktivität wurden die Fluoreszenzdoppelmarkierungen nach Extraktion der Autofluoreszenz einer digitalen Bildanalyse basierend auf dem RISC-Algorithmus (Raivich et al., 1998b)

unterzogen. Dabei werden zuerst die gewünschten zellulären Profile mittels einer durch Färbung eines zelltypspezifischen Antigens entstehenden Fluoreszenz definiert. Im Falle der MHC1 Quantifizierung war dies zum Beispiel IBA1 im TR-Bild. Diese Maske wird dann in die zu untersuchende Mikrographie (hier das FITC-Bild) übertragen und das Verhältnis des Mittelwertes der Pixel innerhalb des markierten Bereiches im Vergleich zum Mittelwert aller Bildpunkte bestimmt. Der Logarithmus dieses Verhältnisses liefert den relativen Färbekoeffizienten. Im folgenden sind die einzelnen Rechenschritte beschrieben.

Die bezüglich der Autofluoreszenz korrigierten FITC und TR Bilder (KM_{FITC} , KM_{TR}) wurden in OPTIMAS mit der „local smoothing und averaging“ - Funktion bei einer Boxgröße von 100 x 100 Pixel geglättet. Anschließend wurde im korrigierten und geglätteten TR-Bild die Fläche des Nucleus facialis markiert und der Mittelwert ($MEAN_{FAC-TR}$) und Standardabweichung (SD_{FAC-TR}) der OLW im Fazialis-Areal berechnet. Die, sich aus einem durch $MEAN_{FAC-TR} + SD_{FAC-TR}$ errechneten Schwellenwert ergebenden zellulären Profile, wurden als Maske in das korrigierte, geglättete FITC-Bild übertragen. Auch für das FITC-Bild wurden Mittelwert und Standardabweichung der OWLs sowohl im gesamten Nucleus facialis ($MEAN_{FAC-FITC}$, $SD_{FAC-FITC}$) als auch spezifisch in der Maske ($MEAN_{MICRO-FITC}$, $SD_{MICRO-FITC}$) berechnet. Der relative Färbungskoeffizient für spezifisch mikrogliale MHC1-Immunreaktivität berechnet sich wie folgt:

$$RISC = \log (MEAN_{MICRO-FITC} : MEAN_{FAC-FITC})$$

Um die Variabilität der Färbeintensität zwischen einzelnen Schnitten auszugleichen wurde der relative Färbungskoeffizient jeweils für die operierte Seite ($RISC_{OPERIERT}$) und kontralateralen, gesunden Seite ($RISC_{KONTROLLE}$) berechnet und die Differenz ($DIFF-RISC$) dieser Werte gebildet.

$$DIFF-RISC = RISC_{OPERIERT} - RISC_{KONTROLLE}$$

Die Berechnung des DIFF-RISC erfolgte teilautomatisch durch Programmierung einer Makrofamilien in OPTIMAS (Kloss et al., 1999).

2.4.2.3 Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung wurden zu den definierten Zeitpunkten bzw. in den jeweiligen Versuchstiergruppen die DIFF-RISC Werte nach dem beschriebenen Algorithmus für jeweils 2 Gewebeschnitte in 4 – 7 unterschiedlichen Tieren berechnet. Die Mittelwerte der Färbeintensitäten wurden dann von OPTIMAS nach EXCEL übertragen, seitengetrennt graphisch aufgetragen und mit einem gepaarten t-Test bei einem Signifikanzniveau von 5% auf statistisch signifikante Unterschiede getestet.

2.5 Elektronenmikroskopie

2.5.1 Immunhistochemie für Elektronenmikroskopie

Die Immunhistochemische Färbung für die Elektronenmikroskopie erfolgte ähnlich wie für die konventionelle Lichtmikroskopie. Zu Erwähnen sind jedoch einige Abweichungen im Protokoll. Zum Einen wurden die Inkubationszeiten der einzelnen Schritte ausgedehnt, so daß die schwimmenden Gehirnschnitte bei 4°C 4 Stunden in Ziegen Serum, über Nacht in sekundärem Antikörper und für 8 Stunden in ABC-Reagenz inkubiert wurden. Bei der anschließenden DAB Färbung wurden die Schnitte erst für 20 Minuten in Co/Ni-DAB vorinkubiert, bevor die Reaktion mit H₂O₂ gestartet, und für weitere 15 Minuten aufrecht erhalten wurde. Nach der Immunfärbung folgte eine Nachfixierung der Schnitte für 6 Tage in 2% GA in PBS, Osmierung in Dalton Lösung I, Entwässerung und Einbettung in Araldit. Zur Orientierung im Lichtmikroskop wurden die Semidünnschnitte (80µm) mit Richardson-Lösung gefärbt. Die Nachkontrastierung der Ultradünnschnitte (100nm) wurden mit Uranylazetat und Bleizitrat (Leica UltraStain) durchgeführt. Letzlich folgten Untersuchung und Fotografie mit einem Zeiss EM 10 Elektronenmikroskop.

2.5.2 Darstellung von neutrophilen Granulozyten mittels endogener Peroxidase

Zur deutlicheren Darstellung der ins Gehirn eingewanderten Granulozyten, wurde auch für die Elektronenmikroskopie eine Verstärkung der endogenen Myeloperoxidase

mit biotinyliertem Tyramid durchgeführt. Dazu wurden die Semidünnschnitte ohne vorherige Präinkubation für 30 Minuten in 1% BT und 0,01% H₂O₂ in PBS inkubiert. Die Biotin-Reste wurden anschließend wie bei der oben beschriebenen immunhistochemischen Färbung mit ABC und Co/Ni-DAB visualisiert. Auch alle nachfolgenden Schritte liefen analog ab.

2.6 Quantifizierung von Zellzahlen und mikroglialen Knötchen

2.6.1 Zählung mikroglialer Knötchen

Zur Bestimmung der Anzahl der MHC1-positiven phagozytotischen Microglia-Knötchen wurden die zu untersuchenden Schnitte mit der Co/Ni-DAB Technik immunhistochemisch gefärbt. Die Untersuchungen fanden vor allem am Tag 14, und im Falle der TNFR 1&2 Doppelknockout-Mäuse, auch an Tag 21 und 29 nach Fazialisaxotomie statt. Die Zahl der Knötchen wurde in 2 – 4 Schnitten je Tier, auf der axotomierten und kontralateralen, gesunden Seite bestimmt. Die Daten wurden mit einem gepaarten t-Test bei einem Signifikanzniveau von 5% berechnet auf statistisch signifikante Unterschiede getestet.

2.6.2 Bestimmung der Zahl MHC2-positiver perivaskulärer Makrophagen

Die Anzahl MHC2-positiver Makrophagen wurde, nach Kobalt-Nickel verstärkter Immunhistochemie, bei 40-facher Vergrößerung bestimmt. Von jedem Tier wurden dazu die Anzahl der immunreaktiven Zellen auf der axotomierten und kontralateralen Seite in je zwei 350µm auseinanderliegenden Schnitten pro Tier bestimmt.

2.6.3 Bestimmung der Neuronenzahl im Nucleus facialis

Für die Bestimmung der Neuronenzahlen im Nucleus facialis nach Transsektion in Wildtyp bzw. Interleukin-1 Rezeptor, TNF-Rezeptor 1, TNF Rezeptor 2, TNF-Rezeptor 1&2 und Interferon-gamma-Rezeptor-1 Knockout-Mäusen, wurden die Tiere nach einem jeweils definierten Überlebensintervall von 14 Tagen, bzw. 29 und 60 Tagen getötet und wie oben beschrieben mit 4% PFA perfundiert. Aus den

fixierten Hirnstämmen wurden 36 25µm-dicke Schnitte angefertigt, die den gesamten Fazialiskernbereich, dessen Ausdehnung etwa 640-700 µm beträgt, einschlossen.

Nach einer Nissl-Färbung wurden in allen Schnitten alle Neurone im Bereich des Fazialiskerns gezählt. Anschließend erfolgte eine Korrektur der Werte bezüglich der neuronalen Größe mit Hilfe der Abercrombie-Korrektur (Abercrombie, 1946). Die Formel hierfür lautet:

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

wobei N die korrigierte Neuronenzahl, n die gezählte Neuronenzahl, D die Schnittdicke (25µm) und d der durchschnittliche, aus der neuronalen Zellgröße errechnete Durchmesser ist. Die Größe der Neuronen wurde pro Tier aus 3 Gewebeschnitten mit 100µm Abstand aus jeweils 210-370 Zellen auf der operierten, und 160-380 Zellen auf der unoperierten Seite berechnet. Dazu wurden die Schnitte digitalisiert und als RGB-Bild nach OPTIMAS transferiert. Die neuronalen Zellprofile wurden im roten Kanal mittels einem aus MEAN - 1,5x SD errechneten Schwellenwert detektiert. Der mittlere Durchmesser wurde anschließend unter Annahme einer praktisch sphärischen Form aus der mittleren Fläche der Zellen mit folgender Formel errechnet:

$$D = \sqrt{4 \times \text{Fläche} / \pi}$$

Der durchschnittliche Zelldurchmesser (+SEM) auf der unoperierten Seite war in allen untersuchten Gruppen etwa 18µm und nahm auf der axotomierten Seite um etwa 5% zu. Keine der untersuchten Zytokin-Rezeptor Knockout-Mäuse zeigte im t-Test einen signifikanten Unterschied des Zelldurchmessers im Vergleich zu den Wildtypkontrollen bzw. nach Axotomie. Der Effekt der Abercrombie-Korrektur war daher bezüglich des Vergleichs operierte versus unoperierte Seite sehr gering (zwischen 0% und 2,1%).

2.6.4 Bestimmung der Granulozyten- und Lymphozytenzahlen

Die Zählung der Granulozyten und CD3-positiver T-Lymphozyten erfolgte nach Co/Ni-DAB visualisierter BT-Verstärkung bzw. immunhistochemischen Färbung

unter einem 40x Objektiv im Hellfeld. Zahlen für die axotomierte bzw. Kontrollseite errechnen sich aus dem Mittelwert zweier 320µm entfernter Schnitte pro Tier. Im Falle der Lymphozyten wurden die Werte im gepaarten t-Test auf statistische Unterschiede getestet. Zur statistischen Analyse der Granulozytenzahlen nach LPS-Injektion wurden die gezählten Werte (x) erst in eine semilogarithmischen Funktion (f) umgeformt, mit

$$f = \log (x+1)$$

Die Addition von „1“ dient nur dazu unendliche negative Zahlen zu vermeiden, die bei einem Wert von 0, wie es auf der Kontrollseite unbehandelter Tiere der Fall ist, vorkommen. Diese Funktion führte zu einer deutlich Reduktion der sonst sehr hohen Variabilität und wurde für alle weiteren statistischen Berechnungen verwendet.

Zum Vergleich zwischen ICAM1 -/- und ICAM1 +/- Tieren wurde ein gepaarter t-Test angewendet. Bei der Analyse der Effekte in den verschiedenen Wildtypstämmen wurde erst mit einem einseitigen ANOVA Test die Wahrscheinlichkeit, dass eine der Gruppen abweicht berechnet. Die abweichende Gruppe wurde in einem zweiten Schritt durch einen Duncan-multiple-range-test identifiziert.

2.7 Materialien

2.7.1 Versuchstiere

In allen durchgeführten Versuchen wurden adulte, weibliche Mäuse in einem Alter von 2-4 Monaten verwendet. Falls nicht explizit anders erwähnt, wurden die Experimente an normalen C57BL/6-Wildtypmäusen durchgeführt. Für die Versuche zur Einwanderung von Granulozyten nach LPS-Gabe wurden zusätzlich Wildtypiere vom Balb/c, C3H, SJL und FVB Hintergrund eingesetzt. Alle Wildtyp-Mäuse stammen aus der Tierzucht des MPI Biochemie in Martinsried. Bei den im folgenden aufgeführten transgenen Mäusen, wurden für die Experimente jeweils die bezüglich Alter und Hintergrund passenden Wildtypkontrollen aus der gleichen Bezugsquelle verwendet.

Tabelle 1: Transgene Mausstämme

Ausgeschalteter Genort bzw. Phänotyp	Genetischer Hintergrund	Bezugsquelle
Interferon gamma Rezeptor Typ 1 (IFNgR -/-)	129Sv/Ev	B&K Universal; Hull/UK
Tumor Necrosis Factor Rezeptor Typ 1 (TNFR1-/-)	C57Bl/6	Klaus Pfeffer; TU München/Deutschland
Tumor Necrosis Factor Rezeptor Typ 2 (TNFR2-/-)	C57Bl/6	BRL Biological Research Laboratories Ltd; Füllinsdorf/Schweiz
Tumor Necrosis Factor Rezeptor Typ 1&2 (TNFR1&2-/-)	B6x129	BRL Biological Research Laboratories Ltd; Füllinsdorf/Schweiz
Interleukin 1 Rezeptor Typ 1 (IL1R1-/-)	B6x129	BRL Biological Research Laboratories Ltd; Füllinsdorf/Schweiz
Beta 2-Microglobulin (Beta2MG-/-)	C57Bl/6J	Jackson Laboratory Bar Harbor/USA
Interzelluläres Adhäsionsmolekül (ICAM-1-/-)	C57Bl/6	W. Brück Berlin/Deutschland
SCID	Balb/c	Jackson Laboratory Bar Harbor/USA

2.7.2 Antikörper, Tierseren, Immunreagenzien

Tabelle 2: Primäre, monoklonale Antikörper

Antigen	Spezifität/Klon	Wirt	Verd.	Herkunft
7/4	Maus/MCA771	Ratte	1:400	Camon; Wiesbaden/Deutschland
CD 3	Maus/28001D	Ratte	1:2000	Pharmingen; San Diego, CA/USA
CD 11b	Maus/5c6	Ratte	1:4000	Serotec, Kidlington/UK
CD 54 (ICAM1)	Maus/MCA818	Ratte	1:3000	Camon; Wiesbaden/Deutschland
CD 80 (B7-1)	Maus/1G10	Ratte	1:3000	Pharmingen; San Diego, CA/USA
CD 86 (B7-2)	Maus/GL-1	Ratte	1:3000	Pharmingen; San Diego, CA/USA
MHC-1	Maus/ER-HR52	Ratte	1:100	BMA/Dianova; Hamburg
MHC-1	Maus/ER-MP42	Ratte	1:100	BMA/Dianova; Hamburg
MHC-2	Maus/ER-TR3	Ratte	1:100	BMA/Dianova; Hamburg
MHC-2	Maus/YE2/36HLK	Ratte	1:100	Camon; Wiesbaden/Deutschland

Tabelle 3: Primäre, polyklonale Antikörper

Antigen	Spezifität	Wirt	Verd.	Herkunft
CGRP	Maus	Kaninchen	1:5000	Peninsula; Belmont, CA/USA
GFAP	Rind	Kaninchen	1:6.000	DAKO; Hamburg/Deutschland
hSA	Mensch	Kaninchen	1:100.000	Sigma; Deisenhofen/Deutschland
IBA1	Maus	Kaninchen	1:400	Dr. Y. Imai; Tokyo/Japan
Laminin	Maus	Kaninchen	1:1.000	DAKO; Hamburg/Deutschland
TSP	Maus	Kaninchen	1:6000	Alexis; Grünberg/Deutschland

Tabelle 4: Sekundäre Antikörper

Antigen	Wirt	Konjugat	Verdünnung	Herkunft
Kaninchen-Ig	Ziege	Biotin	1:100	Vector, Wiesbaden
Kaninchen-Ig	Esel	Biotin	1:100	Dianova, Hamburg
Ratte-Ig	Ziege	Biotin	1:100	Vector, Wiesbaden
Ratte-Ig	Ziege	FITC	1:100	Sigma, Deisenhofen
Ziege-Ig	Esel	FITC	1:100	Dianova, Hamburg

Tierseren

Eselserum	Vector, Wiesbaden
Pferdeserum	Vector, Wiesbaden
Mäuseserum	Sigma, Deisenhofen
Ziegenserum	Vector, Wiesbaden

Weitere Reagentien

TexasRed-Avidin	Vector, Wiesbaden
Tyramin, biotinyliert	Dupont, Bad Homburg
Vectastain® ABC Kit	Vector, Wiesbaden
VectaShield	Vector, Wiesbaden
DePeX (Gurr)®	BDH Laboratory Supplies, Poole/UK
Kaisers Glyzeringelatine	Merck, Darmstadt

2.7.3 Lösungen, Puffer

Phosphat-Puffer (PB)

100 mM Na₂HPO₄,
mit H₃PO₄ auf pH 7,4 eingestellt

PB/BSA

PB mit 1g/l Rinderalbumin (BSA)

Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS)

10 mM Na₂HPO₄
8,4 g/l NaCl,
mit H₃PO₄ auf pH 7,4 eingestellt

Elektronenmikroskopie- Phosphatgepufferte Salz Lösung (EM-PBS)

10 mM Na₂HPO₄
10mM MgCl₂
8,4 g/l NaCl,
mit H₃PO₄ auf pH 7,4 eingestellt

Perfusionsfixativ (FA)

40 g/l Paraformaldehyd (in warmen bi-destilliertem Wasser gelöst)
10 mM Na₂HPO₄
8,4 g/l NaCl,
gefiltrert und mit H₃PO₄ auf pH 7,4 eingestellt

Elektronenmikroskopie - Perfusionsfixativ (EM-FA)

40 g/l Paraformaldehyd (in warmen bi-destilliertem Wasser gelöst)
10 mM Na₂HPO₄
10mM MgCl₂
8,4 g/l NaCl,
gefiltrert und mit H₃PO₄ auf pH 7,4 eingestellt

Barnett-Fixativ

0,5% Glutaraldehyd
50mM Na-Cacodylat
250mM D-Glucose Monohydrat
mit H₃PO₄ auf pH 7,4 eingestellt

Saccharose-Lösung (Gefrierschutz)

30% Saccharose in PBS

Gelatine-Lösung (Objekträgerbeschichtung)

0,5 g/l Gelatine in bi-destilliertem Wasser

Diaminobenzidin/ H₂O₂ (DAB/ H₂O₂)

0,5 g/Diaminobenzidin
0,01% H₂O₂
in PBS

Kobalt-Nickel verstärktes Diaminobenzidin/ H₂O₂ (Co/Ni-DAB/H₂O₂)

0,5 g/l Diaminobenzidin
0,25 g/l CoCl₂
0,2 g/l NiSO₄
0,01% H₂O₂ in PBS

Dalton-Lösung I (EM-Osmierung)

1,1 g K₂Cr₂O₇
0,9 g NaCl
1 g OsO₄
in 100 ml Aqua dest., mit 1N KOH auf pH 7 eingestellt

Richardson-Lösung (Semidünnschnitt-Gegenfärbung)

100 ml Azur II
100 ml Methylenblau
80 g Saccharose
5 Tropfen 4% Paraformaldehyd in 100 ml Aqua dest.

Kresylviolett-Lösung für Nissl-Färbung

1g Kresylviolett in 10ml 100% Ethanol lösen
mit warmen Aqua bidest ad 100ml auffüllen

2.7.4 Chemikalien

Araldit	Fluka; Deisenhofen/Deutschland
Avertin (Tribromethanol)	Sigma; Deisenhofen/Deutschland
Azeton	Merck; Darmstadt/Deutschland
Azur II	Merck; Darmstadt/Deutschland
Bleizitrat	Leica; Nussloch/Deutschland
D-19 Entwickler	Kodak; Stuttgart/Deutschland
3-3'-Diaminobenzidin	Sigma; Deisenhofen/Deutschland
Diäthyläther	Merck; Darmstadt/Deutschland
Äther zur Narkose	Chinosol

Ethanol	Merck; Darmstadt/Deutschland
Paraformaldehyd	Merck; Darmstadt/Deutschland
Gelatine	Merck; Darmstadt/Deutschland
Glutaraldehyd	Merck; Darmstadt/Deutschland
Isopropanol	Merck; Darmstadt/Deutschland
Perhydrol (H ₂ O ₂)	Merck; Darmstadt/Deutschland
Kobaltchlorid (CoCl ₂)	Merck; Darmstadt/Deutschland
Kochsalz (NaCl)	Merck; Darmstadt/Deutschland
Kresylviolett	Merck; Darmstadt/Deutschland
Lipopolysaccharid E.coli	Sigma; Deisenhofen/Deutschland
Methylenblau	Merck; Darmstadt/Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat	Merck; Darmstadt/Deutschland
Natriumhydrogenphosphat	Merck; Darmstadt/Deutschland
Nickelsulfat (NiSO ₄)	Merck; Darmstadt/Deutschland
NTB2 Filmemulsion	Kodak; Stuttgart/Deutschland
Rhodamin-B-isothiocyanat	Sigma; Deisenhofen/Deutschland
Rinderalbumin	Sigma; Deisenhofen/Deutschland
Saccharose	Merck; Darmstadt/Deutschland
Superfix	Tetenal; Norderstedt/Deutschland
Uranyl-Azetat	Leica; Nussloch/Deutschland
Xylol	Merck; Darmstadt/Deutschland

3. Ergebnisse

3.1 Der Einfluß proinflammatorischer Zytokine auf das neuronale Überleben nach Fazialisaxotomie

Verletzungen des ZNS lösen inflammatorische Prozesse und zelluläre Reaktionen aus, die Einfluß auf das neuronale Überleben haben. In dem hier untersuchten Mausmodell, kommt es etwa 14 Tage nach Transsektion des Nervus facialis im entsprechenden Kerngebiet zu einem Verlust von Motoneuronen. Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war, den Einfluß proinflammatorischer Zytokine auf neuronalen Zelltod zu charakterisieren. Dafür wurde das neuronale Überleben in Tieren mit deletiertem Interferon gamma Rezeptor Typ 1 (IFN γ R1 $^{-/-}$), Interleukin 1 Rezeptor (IL1R1 $^{-/-}$), Tumor Necrosis Factor Rezeptor Typ 1 (TNFR1 $^{-/-}$), Tumor Necrosis Factor Rezeptor Typ 2 (TNFR2 $^{-/-}$) und Tumor Necrosis Factor Rezeptor Typ 1&2 (TNFR1&2 $^{-/-}$) und den jeweils entsprechenden Wildtypkontrollen untersucht.

3.1.1 Nachweis α X β 2/IBA1 positiver Mikroglia – Knötchen

Neuronaler Zelluntergang führt zur Entstehung von Zelldebris, welches im Gehirn von phagozytierender Mikroglia aufgenommen wird. Die aktivierte Mikroglia lagert sich hierbei dicht um die Zellfragmente und bildet sogenannte phagozytotische Knötchen. Dabei nimmt die Expression einer Reihe charakteristischer Antigene, wie z.B. IBA1, einem mikrogliaspezifischen Ca-bindenden Protein (Ito et al., 1998), deutlich zu. Zudem ist eine Hochregulierung von α X β 2 Integrin spezifisch für die Umwandlung von ruhender Mikroglia zu Makrophagen (Kloss et al., 1999). Aus diesem Grund wurden initial Gehirnschnitte verschiedener Zytokinrezeptor-Knockouts auf die Präsenz von IBA1- und α X β 2-positiver Knötchen, einem indirekten Hinweis auf neuronalen Zelluntergang, hin untersucht (Abbildung 5).

Die IL1R, IFN γ R1, TNFR1 und TNFR2 defizienten Tiere zeigten am Tag 14 nach Axotomie einen deutlichen Anstieg von IBA1 und α X β 2-Integrin Immunreaktivität im betroffenen Kerngebiet. Im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollen fiel optisch kein Unterschied in der Zahl der phagozytotischen Knötchen auf. Bei den TNFR1&2 $^{-/-}$ -Tieren war jedoch praktisch keine IBA1/ α X β 2 Doppelimmunfluoreszenz zu sehen. In

diesen Tieren wurde auch an Tag 21 und Tag 29 im Vergleich mit den Kontrollen, fast keine Mikroglia-Knötchen beobachtet.

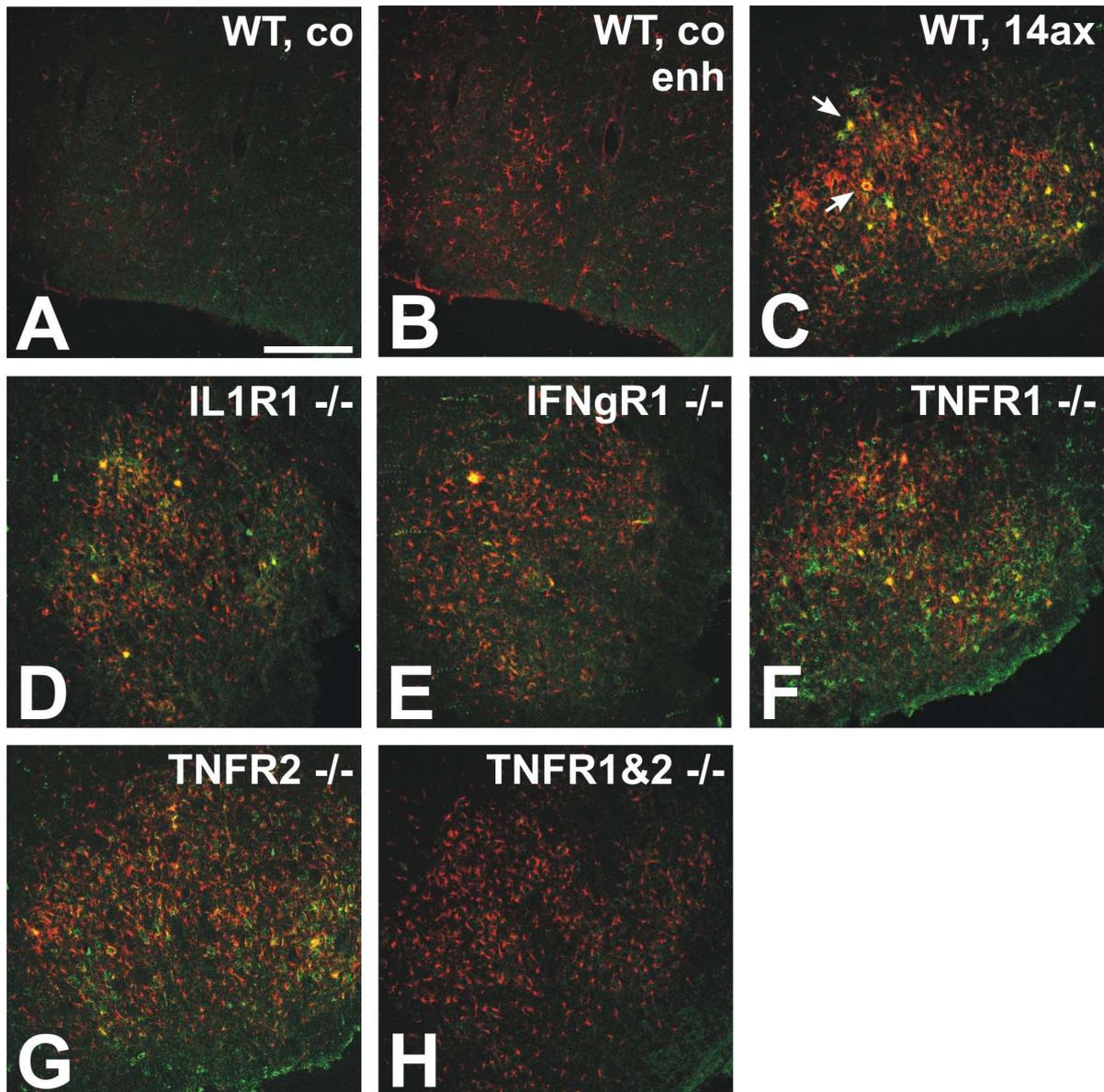


Abbildung 5: Kombinierte Deletion von TNF-Rezeptor 1 und TNF-Rezeptor 2 verhindert das Auftreten alphaXbeta2/IBA1 positiver Mikroglia-Knötchen am Tag 14 nach Axotomie des Nervus facialis.

Rot dargestellt ist die Fluoreszenz für IBA1. Nach Axotomie ist die Expression von IBA1 deutlich gesteigert. **A** und **B** zeigen den kontralateralen, unverletzten Fazialiskern. Zur besseren Darstellung ist die IBA1-Färbung in **B** digital verstärkt. Für die Abbildungen **C-H** wurde sie mit dem gleichen Algorithmus ebenfalls stärker kontrastiert. Grün dargestellt ist die Immunfluoreszenz für α Xb2, einem spezifischen Marker für sich in phagozytierende Makrophagen umwandelnde Mikroglia. In **C** sind mit Pfeilen doppelt gefärbte (gelb) phagozytische Knötchen im axotomierten Fazialiskern eines Wildtyp-Tieres (B6/129) markiert. **C-H** zeigt den axotomierten Fazialiskern verschiedener Zytokin-Rezeptor defizienten Mäuse am Tag 14. Auf dem letzten Bild (**H**) sieht man, daß die Deletion von TNFR 1&2 zwar noch zu einem Anstieg der IBA1-Immunreaktivität, aber zu einem völligen Verschwinden der doppelt-markierten Mikroglia-Knötchen führt. Die Bilder wurden unter der gleichen Einstellung am konfokalen Lasermikroskop aufgenommen und **B - H** im Anschluß daran gleich digital aufgearbeitet. Die Skalierung entspricht 0.25 mm in **A-H**.

3.1.2 Motoneuronenzahl am Tag 29 in Zytokin-Rezeptor defizienten Tieren

Um Veränderungen der Anzahl an Neuronen im Nucleus facialis zu quantifizieren, wurden alle Motoneurone im Kerngebiet auf der axotomierten sowie intakten Seite gezählt. Dazu wurde der in seiner rostro-caudalen Ausdehnung etwa 650 – 700 µm grosse Fazialiskern über seine gesamte Länge in 25 µm-dicke Schnitte unterteilt. Auf jedem der Schnitte wurden alle Neurone gezählt und eine Korrektur nach Abercrombie durchgeführt (siehe 2.6.2). Für den normalen, unoperierten Fazialiskern ergaben sich dabei, je nach genetischem Hintergrund, 1800 – 2000 Motoneurone. Auf der axotomierten Seite waren es an Tag 29 etwa 20% weniger bei den 129Sv/Ev Mäusen, 30% weniger bei den C57Bl/6 und 50% weniger bei den gemischten B6/129 Tieren.

In den transgenen Tieren war für IFN γ R1 -/- und TNFR1 -/- ein geringer Anstieg des neuronalen Zelltodes von +3,2% bzw. +3,4% im Vergleich zu den Kontrolltieren zu verzeichnen, während es bei den IL1R1 -/- und den TNFR2 -/- mit -6,4% bzw. -8,4% zu einer leichten Verringerung kam (Abbildung 6). Diese Veränderungen waren nicht signifikant. Im Gegensatz dazu führte die Deletion von sowohl TNFR1 als auch TNFR2 zu einer deutlichen Reduktion des normalerweise auftretenden Zelltodes auf der axotomierten Seite (Abbildung 7). Am Tag 29 nach der Operation sank der neuronale Zelltod um 21,9% ($p < 0,05$ im t-Test).

Um zu ermitteln ob das Fehlen beider TNF-Rezeptoren neuronales Sterben verzögert oder verhindert, wurden die Versuche am Tag 60 wiederholt. Zwischen Tag 29 und 60 kam es nur zu sehr geringen Veränderungen in den Neuronenzahlen, aber auch hier zeigte sich in den Mutanten ein besseres Überleben der Neurone auf der axotomierten Seite im Vergleich zu den Kontrolltieren (-22,2%; $p < 0,01$ im t-Test). TNFR1 und TNFR2 abhängiger Zelltod war fast ausschließlich auf die ersten 29 Tage nach Axotomie begrenzt (Abbildung 7D). TNFR1&2 unabhängiges neuronales Sterben war während der frühen Phase, aber deutlicher im Zeitintervall zwischen Tag 29 und 60 zu beobachten. In den Doppel-Knockouts scheint es nicht zu kompensatorisch erhöhten Zelluntergang in der späten Phase zu kommen.

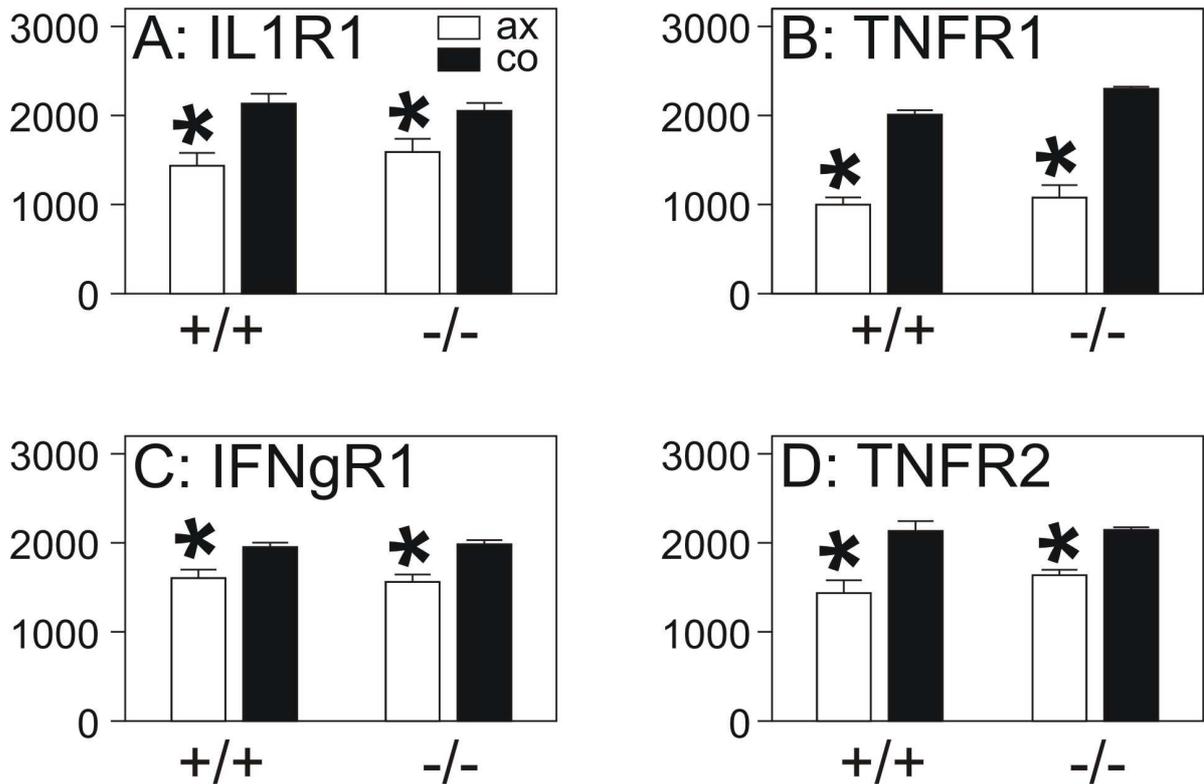


Abbildung 6: Effekte von Fazialisaxotomie (ax) und homozygoter Deletion verschiedener Zytokin-Rezeptoren (-/-) auf die Gesamtzahl der Motoneuronen 29 Tage nach Verletzung. **A** zeigt die Ergebnisse für Interleukin 1 Rezeptor 1 (IL1R1), **B** Tumor Necrosis Factor Rezeptor 1 (TNFR1), **C** Interferon gamma Rezeptor (IFN γ R1) und **D** Tumor Necrosis Factor Rezeptor 2 (TNFR2) defiziente Tiere. Die weißen Balken stellen jeweils die Neuronenzahl (Mittelwert +/- SEM) der unverletzten Kontrollseite, die schwarzen die der axotomierten Seite dar. In allen Gruppen zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied der Neuronenzahl mit einer Abnahme auf der verletzten Seite. Zwischen den einzelnen Mutanten (-/-) und den bezüglich des genetischen Hintergrundes passenden Wildtypkontrollen (+/+) zeigte sich jedoch kein statistisch signifikanter Unterschied.

Tabelle 5: Neuronales Überleben

	Anzahl der Tiere (+/+ / -/-)	Prozentuale Veränderung des Zelltodes bezogen auf die unoperierte Seite
IL1R1 (d29)	7/7	- 6,4%
IFNγR1 (d29)	8/8	+ 3,2%
TNFR2 (d29)	7/7	- 8,2%
TNFR1 (d29)	8/8	+ 3,4%
TNFR1&2 (d29)	6/5	- 21,9%
TNFR1&2 (d60)	14/15	- 22,2%

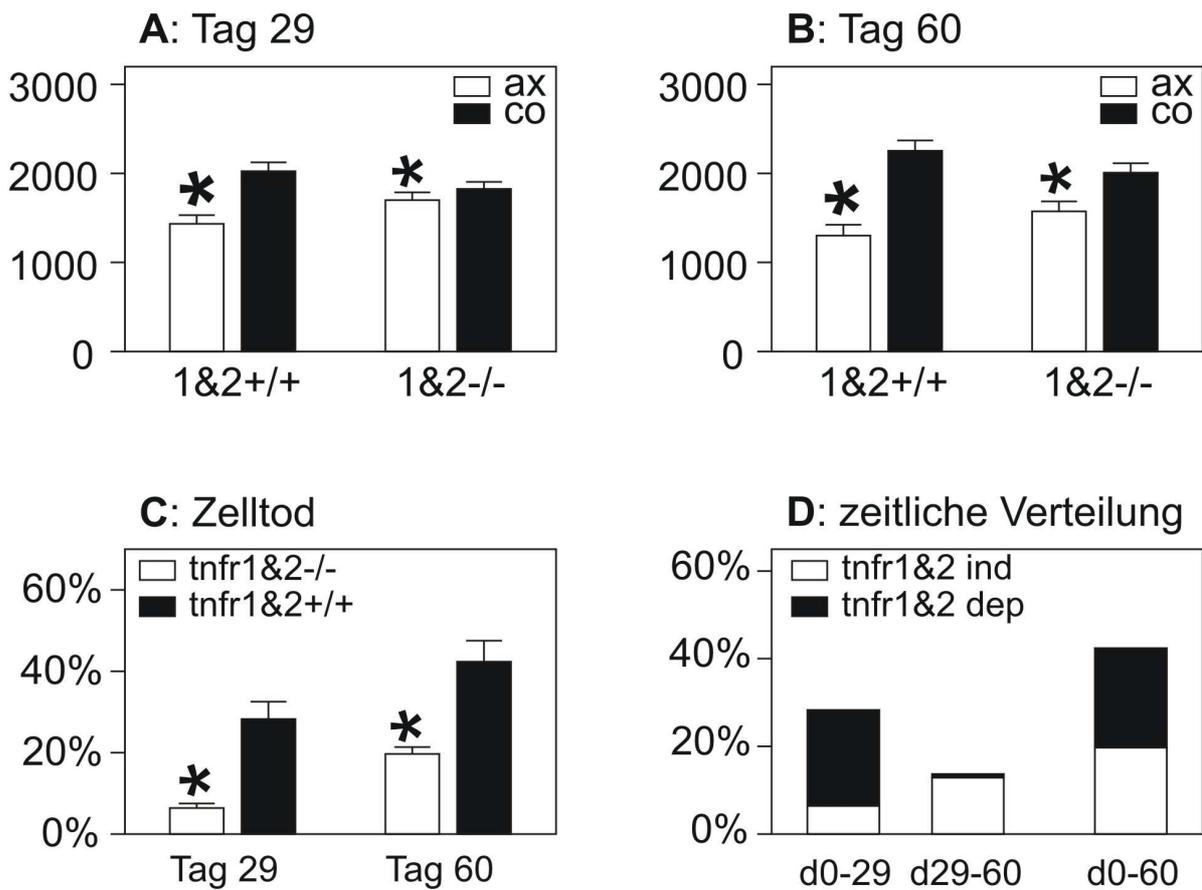


Abbildung 7: Kombinierte Ausschaltung von TNF-Rezeptor 1 und 2 führt zu einer Reduktion des Verlustes an Motoneuronen nach Fazialisaxotomie.

Abbildung **A & B** zeigen die neuronale Zellzahl im Fazialis-Kerngebiet nach respektive 29 und 60 Tagen. Der weiße Balken entspricht jeweils dem Durchschnitt der gezählten Neurone +/- SEM der normalen, der schwarze der axotomierten Seite der Wildtypkontrollen (+/+) bzw. Mutanten (-/-). Die Sternchen kennzeichnen einen signifikanten Unterschied zwischen der axotomierten und Kontrollseite ($p < 0.01$ im gepaarten t-Test). **C** stellt den Zelltod prozentual anteilig am Verhältnis der Gesamtneuronenzahl auf der axotomierten zur gesunden Seite dar. Sowohl nach 29, als auch nach 60 Tagen verhindert die gleichzeitige Abwesenheit beider TNF-Rezeptoren im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren einen Verlust von 22% der Motoneurone auf der axotomierten Seite. Die Sternchen indizieren hier einen signifikanten Unterschied ($p < 0.05$ im t-Test) zwischen Mutanten und Kontrollen.

D Differenzierung zwischen frühem (Tag 0-29) und spätem (Tag 29-60) Auftreten des Zelltodes nach Axotomie. Die Prozentzahlen die das Verschwinden der Motoneuronen angeben sind aus C übernommen. TNFR1&2 indiziert den Neuronenverlust in -/- Mäusen, TNFR1&2 dep den Unterschied zwischen +/- und -/- Tieren. Die Werte für das d29-60 Intervall ergeben sich aus der Subtraktion der d0-29 Werte von den d0-60 Werten. Der TNFR1&2 abhängige Untergang von Motoneuronen (schwarzer Block) scheint auf die ersten 4 Wochen beschränkt zu sein, während es einen zweiten, langsameren TNFR1&2 unabhängigen Mechanismus zu geben scheint.

3.2 Der Einfluß proinflammatorischer Zytokine auf die MHC-Klasse-1 - Expression nach Fazialisaxotomie

3.2.1 MHC1 Expression im normalen und axotomierten Fazialiskern

Eine zentrale Frage der vorliegenden Arbeit war, immunhistochemisch die Expression und Regulation von MHC1 im normalen und axotomierten Fazialiskern zu charakterisieren. Dazu wurde zuerst die MHC1 Verteilung im normalen Nucleus facialis und deren Änderung nach peripherer Transsektion des Nerves im Zeitverlauf untersucht. Um die Spezifität des verwendeten MHC-1-Antikörpers zu prüfen, wurden Titrationsversuche in der Milz und im axotomierten Gehirn von β 2-Mikroglobulin-defizienten Tieren, die kein natives MHC Klasse 1 auf der Zelloberfläche exprimieren können (Koller et al., 1990), und den entsprechenden Wildtyp-Kontrollen durchgeführt. In den Knockout-Tieren fehlte sowohl die Immunreaktivität in der weißen Pulpa, als auch die nach Fazialisaxotomie auftretende mikrogliale Expression (Abbildung 8 M&N). Bei der im folgenden beschriebenen Immunreaktivität ist also von einer spezifischen Färbung des exprimierten MHC1 auszugehen. Für alle quantitativen Untersuchungen der Proteinexpression wurde der gegen murines MHC Klasse 1 gerichtete monoklonale Antikörper Klon ER-HR 52 verwendet.

Im unverletzten Nucleus facialis findet sich nur äußerst geringe MHC1 Immunreaktivität (IR). Nach Durchtrennung des motorischen Anteils des Nerven kommt es jedoch, selektiv in dem betroffenen Kerngebiet, zu einem deutlichen Anstieg der MHC1 Expression. Die kontralaterale Seite und das umgebende Hirnparenchym sind von diesem Anstieg nicht betroffen.

3.2.2 Zelluläre Lokalisation der MHC1 Immunreaktivität

Um die genaue Lokalisation der MHC1 Expression zu klären, wurde eine immunhistochemische Färbung für die Elektronenmikroskopie angefertigt (Abbildung 9). Ultrastrukturelle Analyse der MHC1 Färbung ergab eine starke, selektive IR auf aktivierten, phagozytierenden Mikrogliazellen, die sich zu phagozytierenden Knötchen um neuronales Debris zusammengelagert hatten. Die Färbung war auf die Zelloberfläche beschränkt und auf nicht-phagozytierende Mikroglia nur sehr schwach ausgeprägt. Blutgefäße, Astrozyten und

Oligodendrozyten zeigten keine Immunreaktivität. Die mikrogliale Lokalisation der MHC1 Expression wurde zudem durch Doppelimmunfluoreszenzfärbungen mit IBA1, einem selektiv auf Mikroglia exprimiertem Antigen (Imai et al., 1996) bestätigt (Abbildung 10).

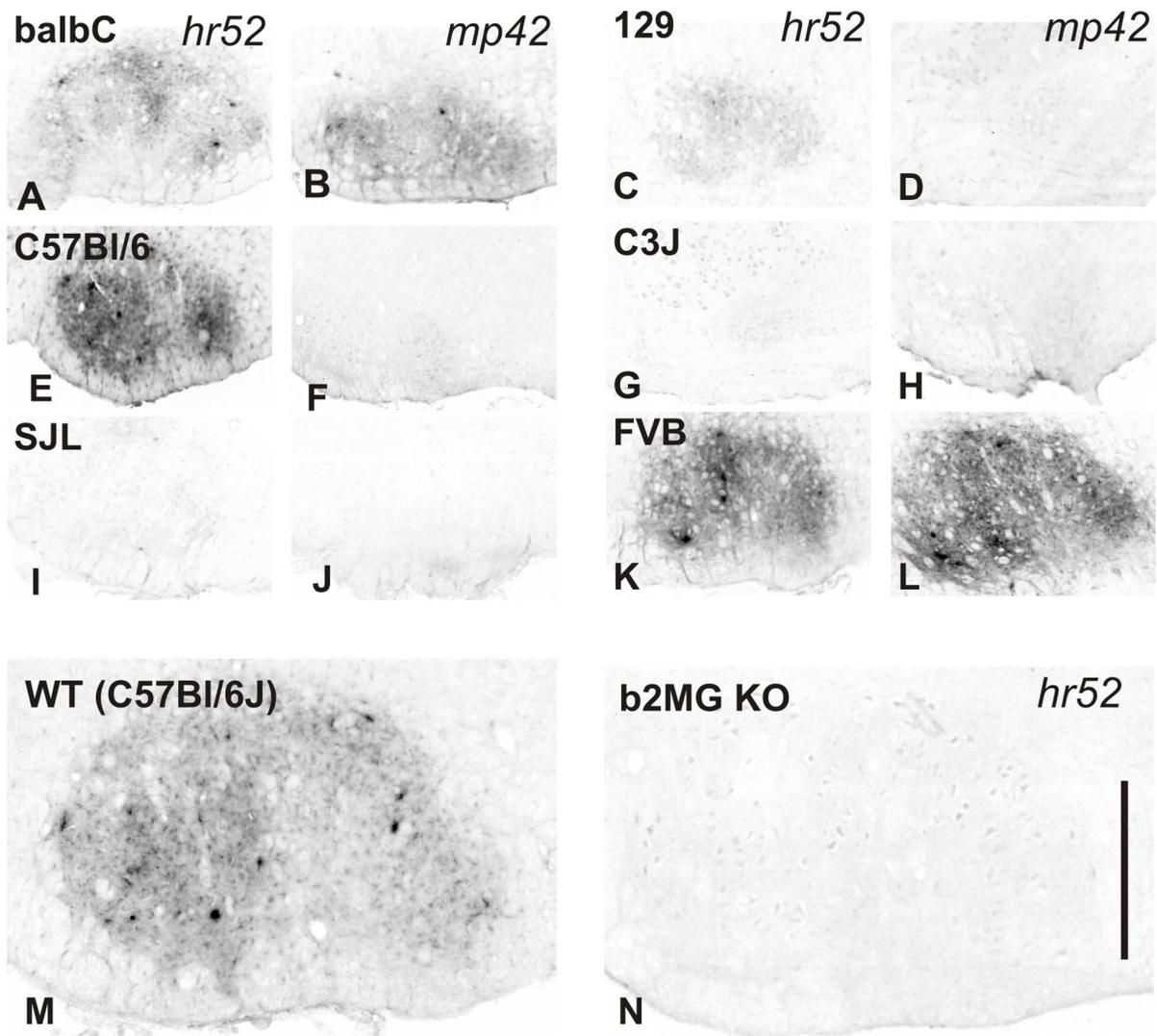


Abbildung 8: Immunreaktivität für MHC1 im axotomierten Fazialiskern von Mäusen mit verschiedenem genetischen Hintergrund: (A&B) balb/c, (C&D) 129, (E&F) c57Bl/6, (G&H) c3J, (I&J) SJL, (K&L) FVB. Es sind jeweils die Färbungen mit zwei verschiedenen MHC1-Antikörpern gegenübergestellt (A, C, E, G, I, K: ER-HR52; (B, D, F, H, J, L: ER-MP52). Für die quantitativen Untersuchungen wurde nur ER-HR52 benutzt.

Die Spezifität des Antikörpers wird in N und M demonstriert. **M** zeigt den verletzten Fazialiskern von C57Bl/6J Mäusen. Man sieht die typische diffuse und um mikrogliale Knötchen fokal besonders intensive Immunreaktivität. In beta-2 Mikroglobulin defizienten Tieren (b2MG-KO), die kein intaktes MHC1 auf der Oberfläche exprimieren können (**N**), sind keine spezifisch angefärbten Strukturen zu erkennen.

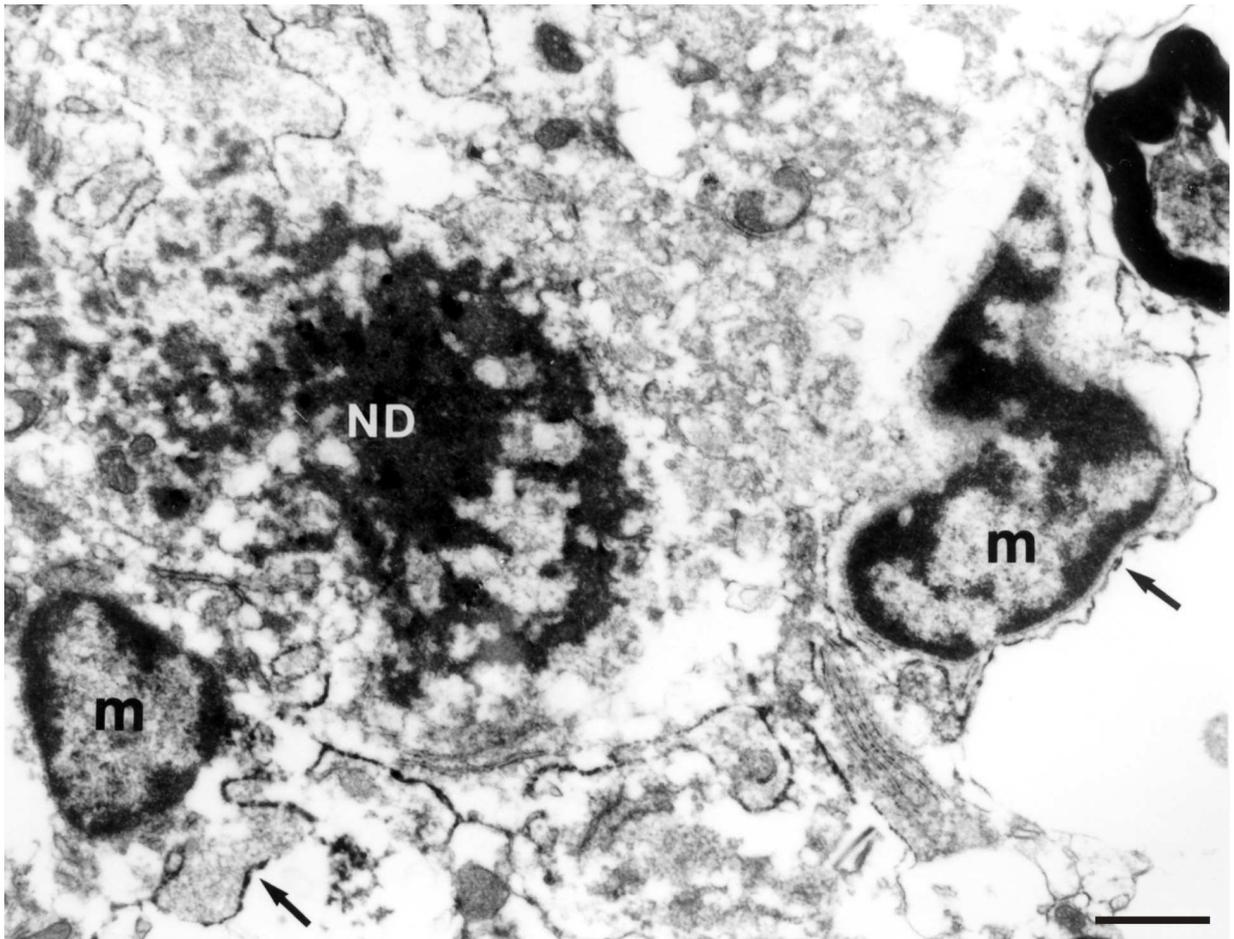


Abbildung 9: Ultrastrukturelle Aufnahme der MHC1-Immunreaktivität in einem phagozytotischem Mikroglia-Knötchen 14 Tage nach Fazialsaxotomie. Beachtenswert ist die selektive und kontinuierliche Immunreaktivität für MHC1 auf der Membranoberfläche (Pfeile) der um das neuronale Debris (ND) gelagerten Mikroglia-Zellen (m). Die Mikroglia umschließt die Reste des untergegangenen Neurons praktisch vollständig. Die Skalierung entspricht 1 μ m.

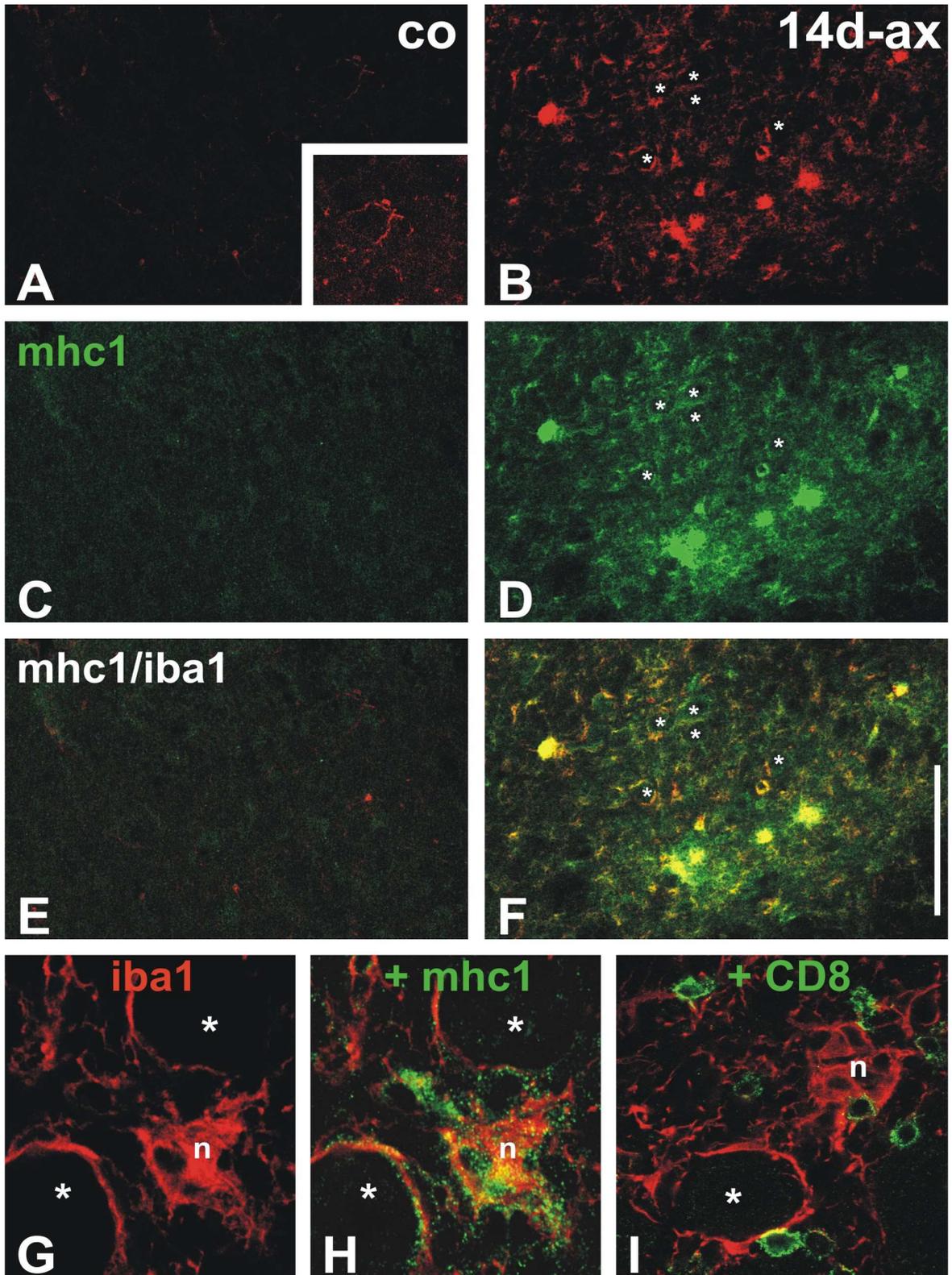


Abbildung 10: A-H zeigen Doppelimmunfluoreszenz-Färbungen für IBA1, einem Marker für Mikroglia (rot) und MHC1 (grün) 14 Tage nach Fazialisaxotomie (B, D, F, G, H) bzw. auf der kontralateralen Seite (A, C, E). Die Kolokalisation von IBA1 und MHC1 stellt sich gelb dar (E, F, H).

Sowohl die IR für MHC1 als auch die für IBA nimmt nach Axotomie insbesondere auf den phagozytotischen Knötchen (n) deutlich zu. G & H zeigen ein aus neuronalem Debris und Mikroglia bestehendes Knötchen in hoher Vergrößerung. Das Insert in A zeigt einen digital 2,5-fach verstärkten Bildausschnitt um die niedrige, aber selektiv vorhandene Immunreaktivität für IBA1 auf Mikroglia im unverletzten Fazialiskern zu demonstrieren. I zeigt eine Doppelmarkierung von IBA1 (rot) und CD8 (grün). Die CD8+ Lymphozyten sind nicht nur perivaskulär (* in Gefäß) sondern auch in direkter Nachbarschaft zu aktivierter Mikroglia und adhärierend an phagozytotischen Knötchen zu finden. Die Skalierung entspricht 250 µm.

3.2.3 Zeitverlauf der MHC 1-Immunreaktivität nach Axotomie

Bei der nach einer Fazialisaxotomie auftretenden MHC1 Immunreaktivität lassen sich zwei distinkte Färbemuster erkennen. Bereits nach 2 Tagen kommt es diffus über den ganzen Kern verteilt zu einem leichten Anstieg der Expression, die ab Tag 4 auch statistisch signifikant ist (Abbildung 11B). Das Maximum dieser diffusen IR wird am Tag 14 erreicht. Von diesem Zeitpunkt an, nimmt die MHC1 Expression wieder langsam ab. Neben dem diffusen Verteilungsmuster fallen, insbesondere am Tag 14, extrem stark MHC1-positive gliale Knötchen auf (Abbildung 11A). Wie durch Elektronenmikroskopie bestätigt, setzen sich diese aus aktivierten, phagozytierenden Mikrogliazellen und neuronalem Debris zusammen.

Das Auftreten dieser MHC1-positiven Strukturen und der Höhepunkt der Gesamtimmunreaktivität fallen mit dem ebenfalls um Tag 14 erreichten Maximum des verzögerten neuronalen Zelltodes zusammen. Die phagozytotische Mikroglia bleibt auch in den folgenden Tagen stark MHC1 positiv. Allerdings nimmt die Zahl der Knötchen bis zum Tag 42 kontinuierlich ab.

Parallel zum Anstieg der MHC1-IR findet sich eine Zunahme CD8-positiver Lymphozyten im axotomierten Fazialiskern (Abbildung 12B). Eine erste Zunahme der Einwanderung von CD8+ Zellen ist bereits ab Tag 2 zu verzeichnen, wobei der Gipfel, ebenso wie der der MHC1-Expression, um Tag 14 liegt. Im Anschluß daran, kommt es bis zu Tag 42 wieder zu einem fast vollständigen verschwinden der T-Zellen.

3.2.4 Quantifizierung der mikroglialen MHC1 & IBA1 Immunreaktivität nach Axotomie

Zur Quantifizierung der MHC1 Expression im Zeitverlauf wurde die Immunreaktivität im gesamten Fazialiskern gemessen. Um spezifisch den Anstieg des mikroglialen MHC1 nachzuweisen, wurde im folgenden zusätzlich eine Doppelimmunfluoreszenzfärbung mit IBA1, einem selektiv auf Mikroglia exprimiertem Marker (Imai et al., 1996) durchgeführt. Die relativen Färbekoeffizienten wurden mit dem Relative Intensity of Staining Coefficient (RISC) Algorithmus berechnet. Mit Hilfe der IBA1 Färbung, wurden dabei die mikroglialen Zellprofile, auf denen im Anschluß die MHC1 Immunreaktivität gemessen wurde, definiert. Wie in der lichtmikroskopischen Untersuchung, zeigte sich auch hier keine

signifikanten Änderungen der MHC1 Menge auf der nichtoperierten, gesunden Seite.

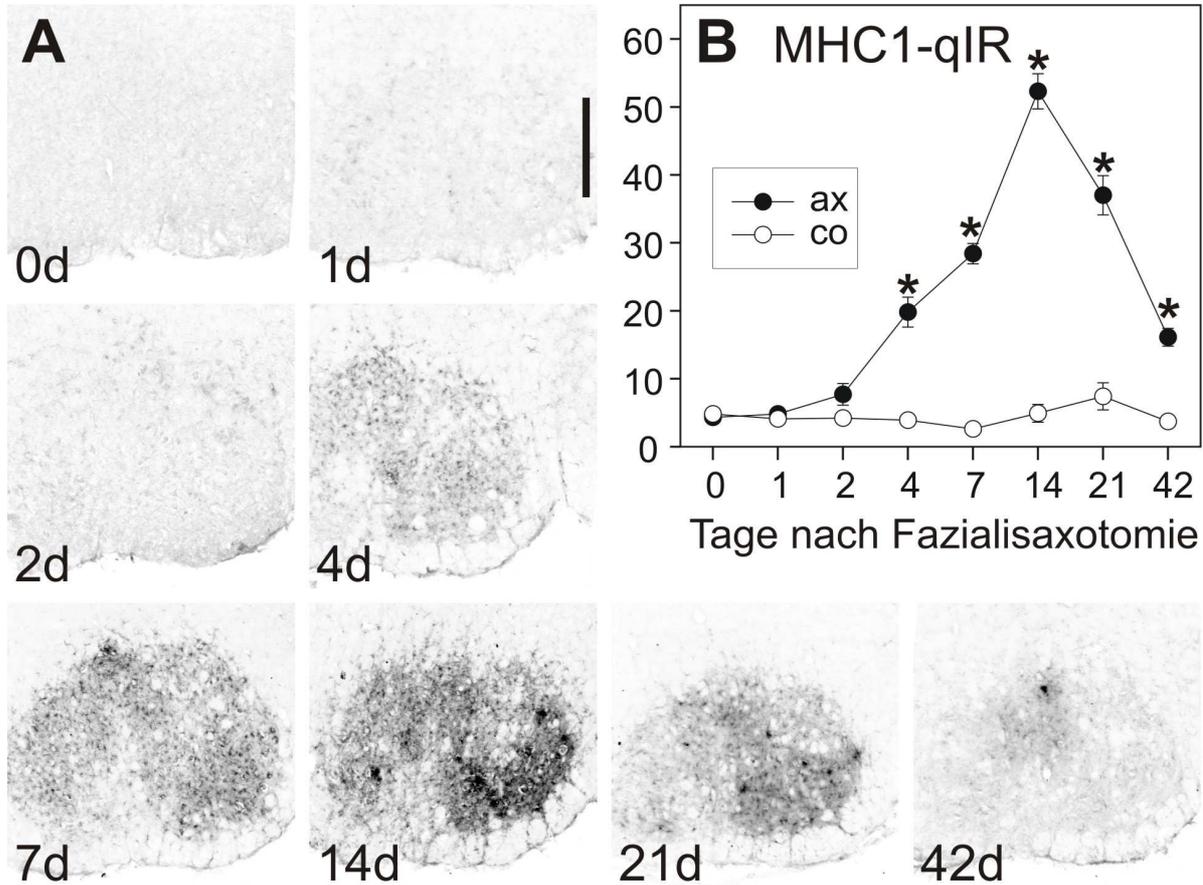


Abbildung 11: Fazialisaxotomie führt zu einem starken Anstieg der MHC1-Immunreaktivität (IR) im betroffenen Kerngebiet.

A zeigt die IR im unverletzten (0d) Hirnstamm und 1 bis 42 Tage nach Transektion des N. facialis im Verlauf. Im normalen Gehirn besteht praktisch keine IR für MHC1, aber bereits 2 Tage nach Axotomie ist ein leichter Anstieg zu erahnen, der ab Tag 4 deutlich sichtbar wird. Neben der diffusen Anfärbbarkeit sind besonders stark angefärbte Knötchen, die ab Tag 14 auftreten, bemerkenswert. Nach Tag 14 nehmen sie in ihrer Häufigkeit wieder ab. Die Knötchen sind von einem 100 - 200 µm Halo schwächerer IR umgeben. Dies wird besonders an Tag 42 sichtbar.

In **B** ist die mittels des Mean-SD Algorithmus quantifizierte MHC1-Immunreaktivität im axotomierten Fazialiskern im Zeitverlauf dargestellt. Mit ax ist die IR auf der axotomierten, mit co die auf der Kontrollseite bezeichnet. Man sieht auch hier einen kleinen, ersten Anstieg der Färbintensität an Tag 2, der aber erst ab Tag 4 statistisch signifikant ist. Der Gipfel des monophasischen Verlaufs ist um Tag 14 erreicht. Von diesem Zeitpunkt an nimmt die IR wieder langsam ab. Auf der unoperierten Gegenseite kommt es zu keiner Veränderung der MHC1 Expression. Mit * sind statistisch signifikante Unterschiede zwischen axotomierter und Kontroll-Seite ($p < 0,05$ im t-Test) markiert.

Abbildung 12 zeigt die DIFF-RISC Werte für MHC1 und IBA1 zu verschiedenen Zeitpunkten nach Durchtrennung des Fazialisnerves. Sie stellen die Differenz der

relativen Färbekoeffizienten auf der unoperierten und axotomierten Seite dar. Sowohl bei IBA1 als auch bei MHC1, zeigt sich ein deutlicher Anstieg der Expression im operierten Fazialiskern. Die Kinetik unterscheidet sich hingegen merklich. Während IBA1 bereits an Tag 1 signifikant ansteigt und bis etwa Tag 14 auf einem Plateau bleibt, verläuft die Kurve bei MHC1 deutlich langsamer. Erst nach Tag 2 kommt es zu einer kontinuierlichen Zunahme der Immunreaktivität, die an Tag 14 ihren Höhepunkt erreicht. Die Expression von MHC1 fällt in Folge bis Tag 42 wieder stark ab. Der Verlauf der mikroglialen Expression von MHC1 läuft somit weitgehend parallel zu dem in Abbildung 11B dargestellten Verlauf der diffusen MHC1 Immunreaktivität.

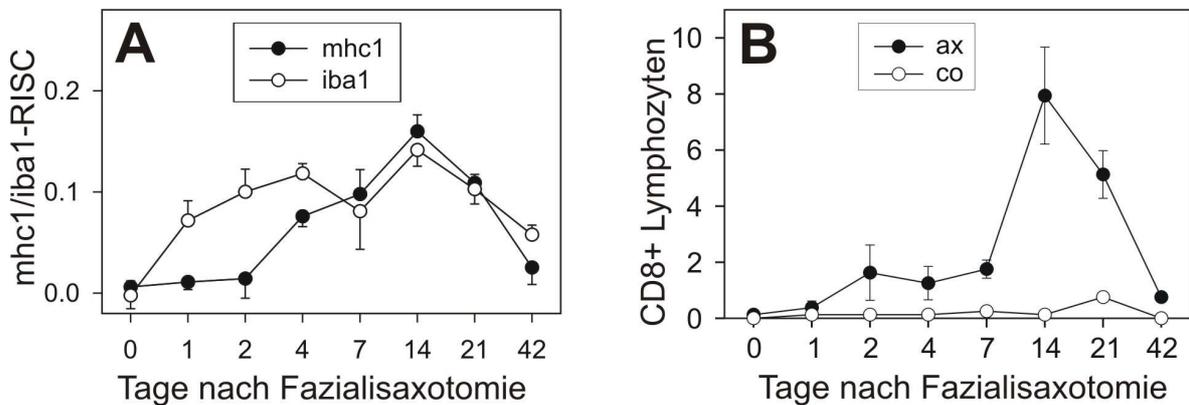


Abbildung 12: A Darstellung der MHC1/IBA1- DIFF-RISC Werte. Sowohl MHC1- als auch IBA1-Immunreaktivität nimmt nach Axotomie auf der verletzten Seite deutlich zu, wobei sich allerdings der Zeitverlauf unterscheidet. Während IBA1 bereits an Tag 1 einen Plateau-Wert erreicht, zeigt die mikrogliale MHC1-IR zwischen Tag 4 und 14 einen fast linearen Anstieg, um dann bis Tag 42 wieder abzunehmen. Der Zeitverlauf der mikroglialen MHC1-Expression der gesamten IR sehr ähnlich (siehe Abb. 11).

B Anzahl der in das axotomierte Fazialsareal einwandernden CD8+ Lymphozyten zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Operation. Die Zahl der in den verletzten Kern einwandernden CD8+ Zellen zeigt ebenso wie die MHC1-IR einen Anstieg um Tag 4 und ein deutliches Maximum an Tag 14. Nach 42 Tagen sinkt die Zahl der detektierbaren CD8+ Lymphozyten wieder auf das Ausgangsniveau.

3.2.5 Quantifizierung von mikroglialem MHC1 in Zytokin-Rezeptor defizienten Mäusen

Wie bereits in früheren Untersuchungen gezeigt wurde, fällt der Gipfel der MHC1 Expression an Tag 14 mit dem Maximum der Expression proinflammatorischer Zytokine, wie Tumor Necrosis Factor α (TNF α), Interleukin 1 β (IL1 β) und Interferon γ (IFN γ) zusammen. Zu diesem Zeitpunkt ist auch die höchste Einwanderung CD3-

positiver T-Lymphozyten zu verzeichnen (Raivich et al., 1998a; Galiano et al., 2001). Um den Einfluß dieser Zytokine bzw. einwandernder T-Zellen auf die MHC1 Expression im axotomierten Nucleus facialis zu prüfen, wurden Gehirnschnitte von Tieren mit homozygoter Deletion verschiedener Zytokin – Rezeptoren untersucht. Dazu wurden Tiere mit deletiertem Interferon gamma Rezeptor Typ 1 (IFN γ R1 -/-), Interleukin 1 Rezeptor (IL1R1 -/-), Tumor Necrosis Factor Rezeptor Typ 1 (TNFR1 -/-), Tumor Necrosis Factor Rezeptor Typ 2 (TNFR2 -/-) und Tumor Necrosis Factor Rezeptor Typ 1&2 (TNFR1&2 -/-) jeweils mit den entsprechenden Wildtypkontrollen am Tag 14, bzw. letztere ebenso an Tag 21 und Tag 29, nach Axotomie getötet. Der T-Zell Effekt wurde an Tieren mit Severe Combined Immune Deficiency (SCID), welche durch ein Fehlen von B- und T-Zellen gekennzeichnet ist, untersucht.

In Abbildung 13 sind Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen für IBA1 (rot) und MHC1 (grün) der axotomierten Fazialiskerne verschiedener Knock-out Mäuse dargestellt. In den TNFR1&2-/- Tieren sticht das fast völlige Fehlen MHC1- und IBA1-positiver phagozytotischer Knötchen ins Auge. Dieses Phänomen war sowohl am Tag 14 nach Operation, als auch zu zwei späteren Zeitpunkten (Tag 21 und Tag 29) zu beobachten. Alle anderen Zytokin-Rezeptor KOs, einschließlich der Tiere, die für entweder TNFR1 oder TNFR2 defizient waren, zeigten im Vergleich zu den Kontrollen normale Knötchenzahlen. In SCID-Mäusen war die Zahl phagozytotischer Konglomerate hingegen im Vergleich zu den Balb/C Kontrollen erhöht (Abbildung 13).

Quantifizierung der mikroglialen MHC1 Immunreaktivität, zeigte den normalen Anstieg des MHC1 DIFF-RISC Wertes an Tag 14 auf der axotomierten Seite in IL1R1-/-, IFN γ R1-/- und TNFR2-/- Tieren. Hier ließ sich kein statistisch signifikanter Unterschied zu den entsprechenden Wildtypkontrollen zeigen (Abbildung 14). Das Fehlen von TNFR 1&2 hingegen, führte zu einem um 43% reduzierten Anstieg des mikroglialen MHC1 an Tag 14. An Tag 21 und Tag 29 war der Effekt mit einem um 65%, bzw. 60% verminderten Anstieg sogar noch deutlicher. Zu allen Zeitpunkten waren die Unterschiede zu den Wildtyptieren statistisch signifikant. Alleinige Deletion von TNFR1 führte, wenn auch nicht so ausgeprägt, ebenfalls zu einer statistisch signifikanten Abnahme der MHC1 Immunreaktivität um 21%. Bei den SCID Tieren war ein um 44% stärkerer Anstieg von MHC1 zu sehen, der jedoch nicht statistisch signifikant war.

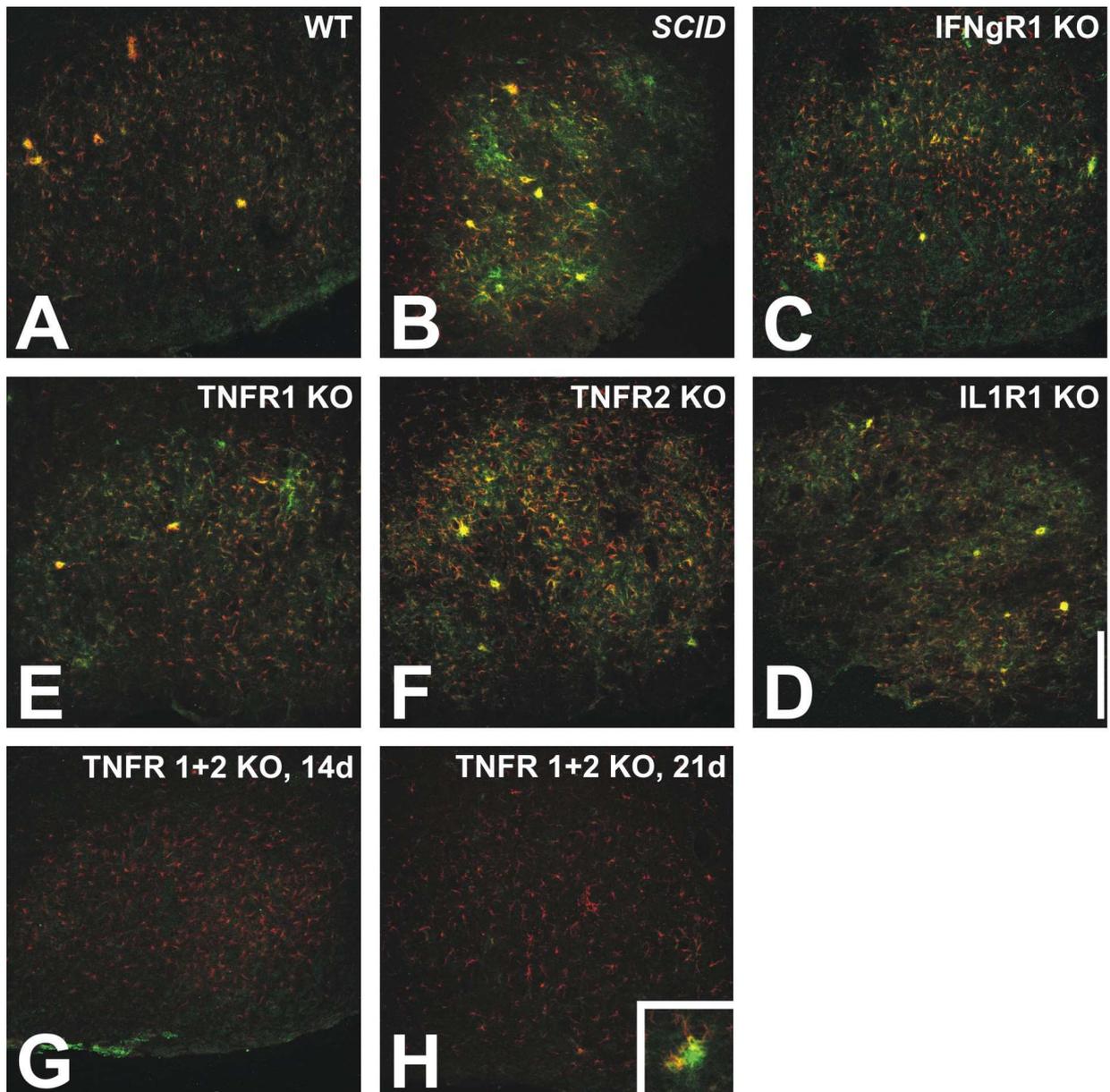


Abbildung 13: Effekt von Zytokin-Rezeptor- und Immundefizienz auf die MHC1-Immunreaktivität im Fazialiskern 14 Tage (A-G) bzw. 21 Tage (H) nach Axotomie. Die Abbildungen zeigen eine Doppelimmunfluoreszenz für IBA1 (rot), einem konstitutiv auf Mikroglia exprimiertem Marker, und MHC1 (grün). Die Kolokalisation beider Marker, insbesondere auf phagozytotischen Mikroglia-Knötchen ist gelb dargestellt.

A zeigt den Wildtyp (B16/129), B Severe Combined Immunodeficiency (SCID) und C-H defiziente Tiere für C: Interferon gamma Rezeptor 1 (IFNgR1), D: Interleukin 1 Rezeptor 1 (IL1R1), E: Tumor Necrosis Factor Rezeptor 1 (TNFR1), F: Tumor Necrosis Factor Rezeptor 2 (TNFR2) and G & H Tumor Necrosis Factor Rezeptor 1 und 2 (TNFR1&2). Nur die kombinierte Ausschaltung von TNFR1&2 führt zu einem Verschwinden der MHC1/IBA1+ Mikroglia-Knötchen, sowohl an Tag 14 als auch später an Tag 21. Wie das Insert in H zeigt, gleicht die MHC1/IBA-IR auf den vereinzelt doch zu sehenden Knötchen in den TNFR1&2 -/- Mäusen der in Wildtyp-tieren detektierbaren Anfärbung. In SCID Tieren (B), kommt es zu einem vermehrten Auftreten von phagozytotischen Knötchen.

In allen untersuchten transgenen Tieren stiegen die DIFF-RISC Werte für die IBA1 Immunfärbung nach Axotomie an. Es zeigte sich aber im Gegensatz zu MHC1 kein signifikanter Unterschied im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren.

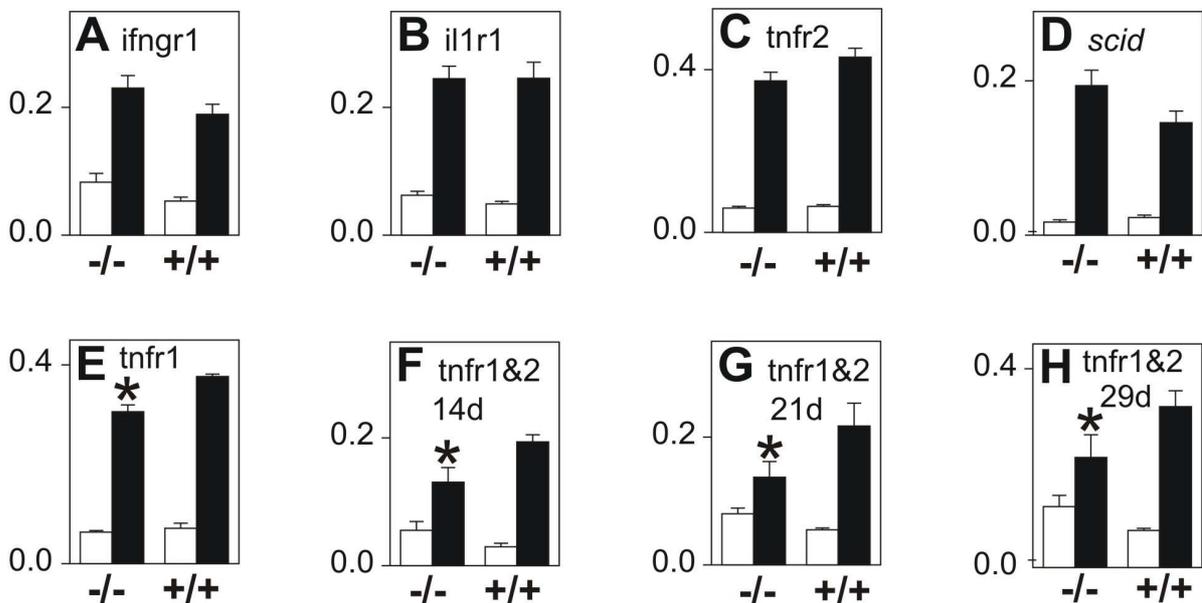


Abbildung 14: Effekte von Zytokinrezeptor- bzw. Immundefizienz auf die mit dem RISC-Algorithmus quantifizierte MHC1-Immunreaktivität auf IBA1-definierten mikroglialen Zellprofilen. Die Graphen zeigen jeweils die Werte für die unoperierte Kontrollseite (weißer Balken) und axotomierte Seite (schwarzer Balken) in Wildtyp- (+/+) bzw. transgenen Mäusen (-/-) an Tag 14 (A-F) und Tag 21 (G) bzw. 29 (H). IFNgR1(A), IL1R1 (B) und TNFR2 (C) zeigten keine Unterschiede in der Immunreaktivität zwischen Wildtyp und KO-Tieren.

Die Abwesenheit von sowohl TNFR1 als auch TNFR2 führte an allen untersuchten Zeitpunkten (F-H) zu einem geringeren Anstieg der Immunreaktivität (Axotomierte Seite - Kontrollseite) als in den, bezüglich des genetischen Hintergrundes passenden, Kontrollen. Die Unterschiede waren statistisch signifikant ($p < 0,05$, t-Test).

Alleinige Deletion des TNFR1 (E) führte am Tag 14 auch zu einer, wenn auch nicht so deutlichen, aber dennoch statistisch signifikanten, Reduktion der MHC1-IR. In den SCID-Tieren (D), zeigte sich im Vergleich zu den Balb/c Kontrollen ein Anstieg der MHC1-Immunreaktivität um 44%. Dieser Unterschied war aber statistisch nicht signifikant.

3.2.6 Diffuse MHC1-Färbung und MHC1-positive Mikroglia Knötchen in transgenen Mäusen

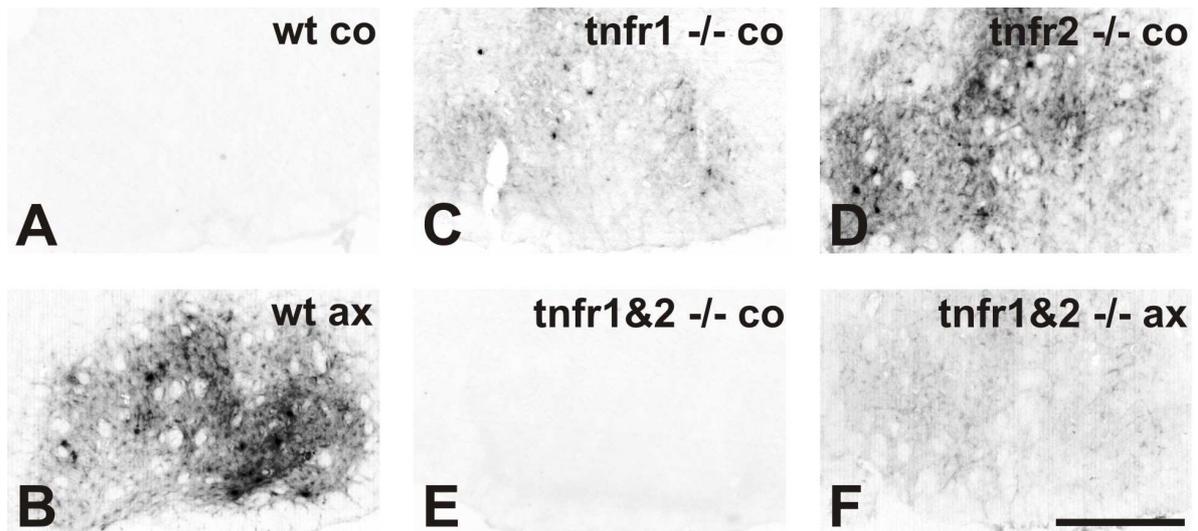
In den vorhergegangenen Experimenten, wurde spezifisch die MHC1 Immunreaktivität auf Mikroglia gemessen. Dadurch ist es möglich Erkenntnisse hinsichtlich zellspezifischer Expression zu gewinnen. Allerdings kann der verwendete Algorithmus zur Erkennung der relevanten Zellprofile, eine leichte Verschiebung Richtung stark IBA1 positiver Strukturen, in diesem Fall der

phagozytotischen Mikroglia-Knötchen, verursachen. Da das Färbemuster von MHC1 neben den stark positiven Knötchen zudem eine diffuse Komponente hat, ergänzten wir die Versuche um eine MHC1-DAB-Färbung. Hier kann zum einen die Knötchenzahl einfacher bestimmt, und zum anderen eine Aussage über die gesamte MHC1 Expression getroffen werden.

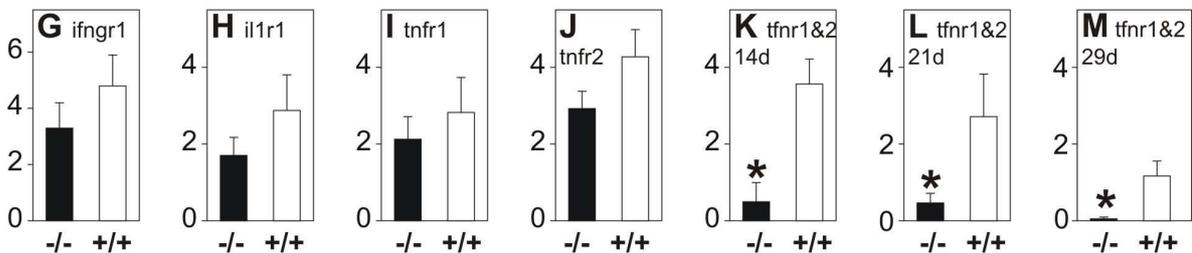
Auf der kontralateralen, gesunden Seite wurden keine phagozytotischen Knötchen gefunden. In Wildtyp-Tieren sind hingegen im Nucleus facialis auf der axotomierten Seite zahlreiche mikrogliale Konglomerate zu sehen. Deletion von TNFR2 und TNFR1 hatte, verglichen mit den Kontrolltieren, keinen signifikanten Effekt auf das Auftreten von Mikroglia-Knötchen. Die Abwesenheit von TNFR1 führte jedoch zu einer statistisch signifikanten Reduktion der diffusen MHC1-Immunreaktivität um 51%. Wie bereits oben beschrieben, waren auch in diesem Versuch in Tieren, denen sowohl TNFR1 als auch TNFR2 fehlte, auf der operierten Seite praktisch keine mikroglialen Knötchen zu sehen. Dies war sowohl an Tag 14, wo es 86% weniger Ereignisse waren ($p < 0.05$ in einem gepaarten t-Test), als auch an Tag 21 (-83%) und Tag 29 (-96%) der Fall (Abbildung 15). Neben den TNFR1-Mutanten waren die DKO-Tiere die einzigen Tiere bei denen auch das diffuse MHC1 statistisch signifikant erniedrigt war (-50%).

Die Quantifizierung der phagozytotischen Knötchen in IL1R^{-/-}, IFN γ R1^{-/-}, TNFR1^{-/-} und TNFR2^{-/-} Tieren zeigte ein Trend zu niedrigeren Werten. Im Vergleich zu den Kontrolltieren war der Unterschied aber in keinem der Stämme signifikant. Die Auswertung der Gesamt-Immunreaktivität für MHC1 im axotomierten und normalen Fazialiskern zeigte in IL1R^{-/-}, IFN γ R1^{-/-} und TNFR2^{-/-} Tieren den normalen Anstieg an Tag 14. Es waren auch hier keine statistisch signifikanten Unterschiede zu den Wildtyp-Tieren zu sehen.

In den SCID-Mäusen fand sich ein statistisch signifikanter, 1.9 facher-Anstieg der phagozytotischen Knötchen. Während in balb/c Tieren (n=6) durchschnittlich $3,4 \pm 0,7$ (Mittelwert \pm SEM) Mikroglia-Konglomerate zu sehen waren, wurden in den SCID Mäusen (n=5) $6,5 \pm 0,8$ Ereignisse gezählt. Im Gegensatz dazu, fand sich bei der diffusen MHC1-IR kein Unterschied. Die Farbintensitätswerte in den Kontrollmäusen waren 8 ± 1 auf der unoperierten, und 19 ± 3 auf der axotomierten Seite. In den SCID Tieren betragen sie 9 ± 2 und 18 ± 4 , respektive.



MHC1+ Mikroglia-Knötchen



Diffuse MHC1-Immunreaktivität

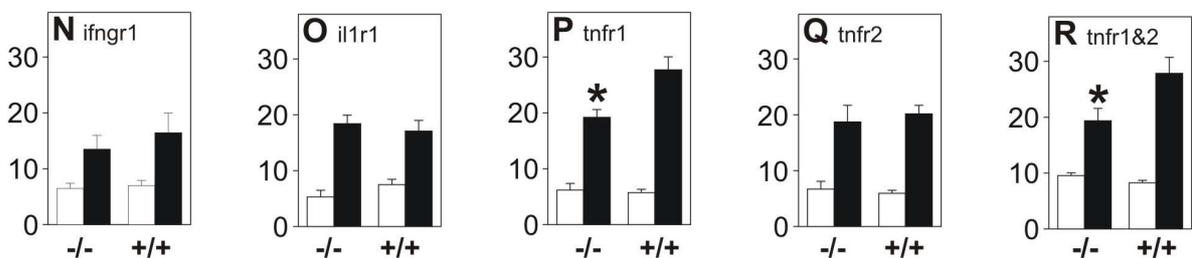


Abbildung 15: Veränderungen in der diffusen MHC1-IR und der Zahl der MHC1-positiver Mikroglia-Knötchen im axotomierten Fazialiskern von Zytokin-Rezeptor defizienten Mäusen.

Abbildungen **A - F** zeigen immunhistochemische Färbungen für MHC1 im normalen (A, E) und axotomierten (B, C, D, F) Kernareal 14 Tage nach der Transektion. **A&B** zeigen die IR im Wildtypier, während **C - E** aus Tieren mit Zytokin-Rezeptor Defizienz stammen (**C**: TNFR1, **D**: TNFR2, **E&F**: TNFR1&2). Man beachte das völlige Fehlen von MHC1+ Knötchen in den TNFR1&2 DKO, sowohl auf der unoperierten als auch auf der axotomierten Seite. Die Deletion von nur TNFR1 führt zu einer starken Verminderung der diffusen MHC1 Immunreaktivität. Die phagozytotischen Mikroglia-Knötchen bleiben aber in ihrer Zahl unvermindert vorhanden.

G - M zeigt die Quantifizierung der MHC1+ Knötchen an Tag 14 nach Axotomie im verletzten Fazialiskern in Wildtyp- (+/+) bzw. transgenen (-/-) Tieren. TNFR1&2 defiziente Tiere zeigen an allen untersuchten Zeitpunkten (**K**: Tag 14, **L**: Tag 21, **M**: Tag 29) eine deutlich verringerte Zahl an phagozytotischen Knötchen im Vergleich zu den WT-Tieren (* indiziert eine Signifikanz mit $p < 0,05$ im t-Test). Tiere mit fehlendem IFNgR1(**G**), IL1R1 (**H**), TNFR1 (**I**) und TNFR2 (**J**) zeigten an Tag 14 einen Trend zu niedrigeren Knötchenzahlen. Die Reduktion war im Vergleich zu den jeweiligen Wildtypkontrollen nicht signifikant.

N - R: Quantifizierung der gesamten MHC1-Immunreaktivität im axotomierten (schwarz) und normalen (weiß) Nucleus facialis 14 Tage nach der Operation zeigte bei den IFNgR1(**N**), IL1R1 (**O**) und TNFR2 (**Q**) defizienten Tieren einen normalen Anstieg der Färbung. In den TNFR1(**P**) und TNFR1&2 (**R**)KO hingegen war eine Reduktion des Anstiegs um etwa 50% zu sehen. Mit * sind signifikante Unterschiede in der Differenz zwischen axotomierter und normaler Seite, bzw. zwischen den Kontrollen (+/+) und den Mutanten (-/-) markiert.

3.3 Der Einfluß proinflammatorischer Zytokine auf die Expression des Ko-Stimulatorischen Faktors B7-2

Ko-stimulatorische Moleküle der B7 Familie spielen bei der Aktivierung von T-Lymphozyten eine entscheidende Rolle. Aus diesem Grund war ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit, die Expression von B7 im unverletzten und axotomierten motorischen Nucleus facialis zu untersuchen. In den verwendeten Mäusestämmen ließ sich mit keinem von drei verschiedenen Antikörper-Klonen die Expression von B7-1 immunhistochemisch nachweisen. Auch nach Stimulierung zeigte sich weder in der Milz noch im ZNS spezifische Immunreaktivität (Abbildung 16a). Der Fokus in den nachfolgend beschriebenen Versuchen lag daher auf der Expression von B7-2.

3.3.1 B7-2 Immunreaktivität nach Fazialisaxotomie in Wildtyp-Tieren

Im normalen, unverletzten Gehirn findet sich praktisch keine spezifische Immunreaktivität für B7-2. Nach peripherer Axotomie des Nervus facialis kommt es jedoch im betroffenen Kerngebiet zu einer deutlichen Zunahme der B7-2 Expression. Der Anstieg der B7-2 Immunreaktivität beschränkt sich auf das verletzte ZNS Gewebe. Umliegende Hirnareale und das Kerngebiet des Nucleus facialis auf der intakten Gegenseite sind nicht betroffen. Bereits ab Tag 2 nach Fazialisaxotomie sind B7-2 positive Zellen im verletzen Nukleus zu erkennen. Die Intensität der Färbung nimmt bis Tag 14 deutlich zu, bevor sie bis Tag 42 wieder weniger wird (Abbildung 16b). Zwischen Tag 2 und Tag 42 ist zu jedem Zeitpunkt ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen B7-2 Expression auf der operierten und unoperierten Seite zu verzeichnen ($p < 0.05$ in einem gepaarten Student's t-test, $n=5$ Tiere pro Zeitpunkt).

Ähnlich wie bei MHC1, ist die intensivste B7-2 Immunreaktivität auf phagozytotischen Knötchen zu finden. Rings um die mikroglialen Aggregate herum findet sich jeweils eine ca 100 μm weite Zone mit leicht erhöhter B7-2 Expression. Auch nach Tag 14, bleibt die Intensität der B7-2 Immunreaktivität auf den Knötchen weiterhin sehr hoch, ihre Anzahl nimmt jedoch stetig ab.

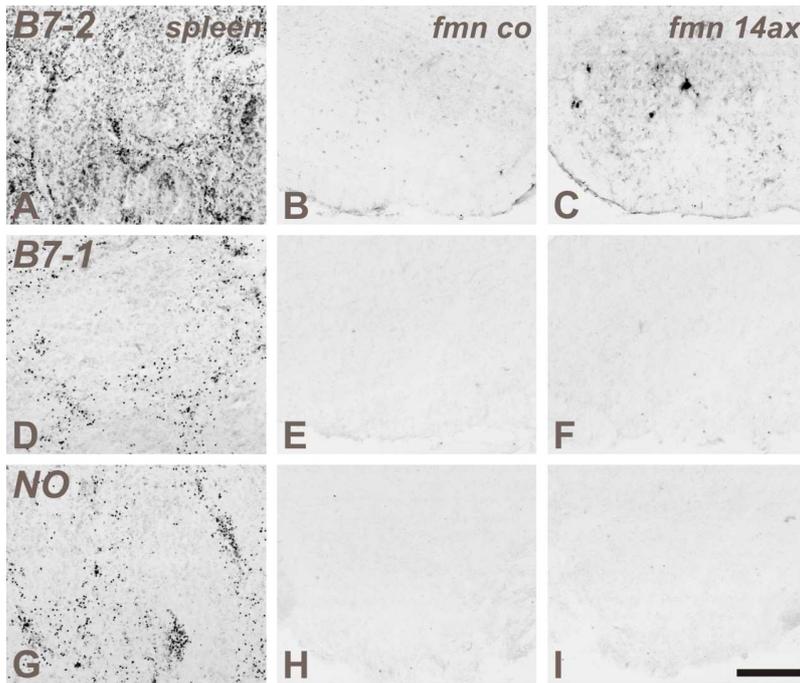


Abbildung 16a:

B7 Immunreaktivität in der murinen Milz (A,D,G), unverletztem (B,E,H) und verletztem Nucleus facialis (C,F,I) an Tag 14 nach Axotomie.

Man beachte die spezifische B7-2 Immunreaktivität in einer Subpopulation von Zellen in der weißen und roten Pulpa sowie auf mikroglialen Knötchen im axotomierten Fazialiskern.

B7-1 (D,E,F) war weder in der Milz noch im Nucleus facialis nachweisbar.

In G, H & I wurde der spezifische Antikörper weggelassen, was zu einem verschwinden der spezifischen Färbung führt.

Die Skalierung entspricht 0.2mm

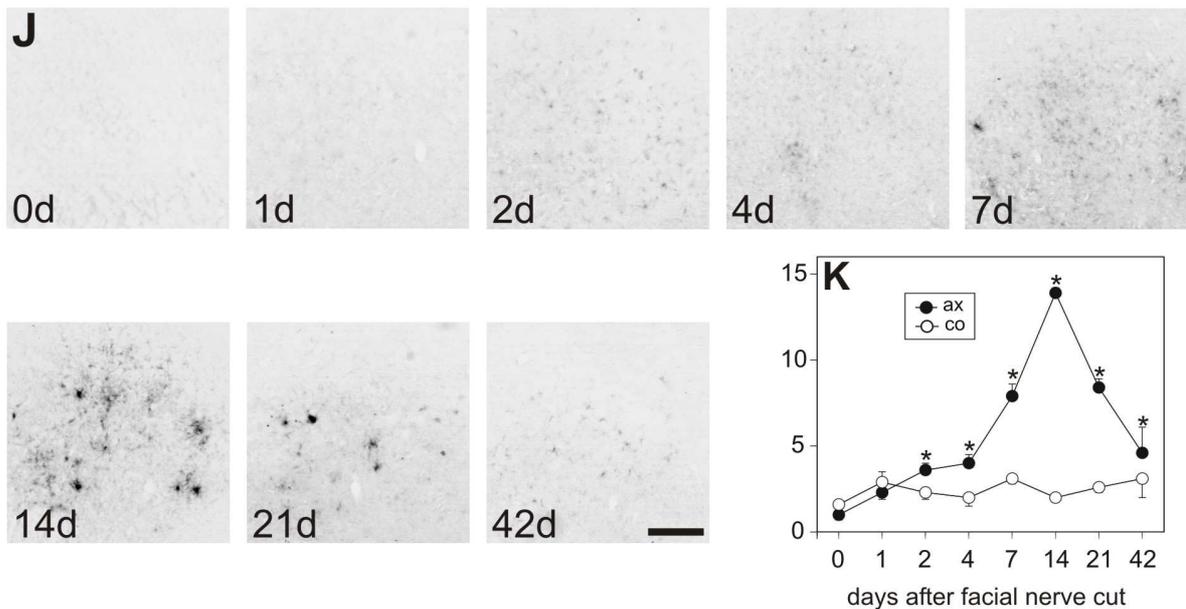


Abbildung 16b: Fazialisaxotomie führt zu einem langsamen Anstieg der B7 Immunreaktivität (B7-IR) im axotomierten motorischen Fazialiskern (FMN).

(J) Man beachte das Fehlen spezifischer IR im unverletzten FMN (0d). Von Tag 2 an wird IR sichtbar und nimmt bis zum Tag 14 deutlich zu. Ab Tag 7 sind einzelne phagozytische Mikroglialknötchen zu sehen, deren Zahl an Tag 14 ihr Maximum erreicht. Um die Knötchen zeigt sich ein 100µm halo mit weniger intensiver B7-2 IR.

(K) Quantifizierung der B7-2 IR in 20µm dicken Gewebeschnitten im axotomierten (ax) und kontralateralen (co) FMN zeigt einen ersten Anstieg an Tag 2, gefolgt von einem Maximum an Tag 14. Nach Tag 14, nimmt die IR bis Tag 42 wieder deutlich ab. Auf der Kontrollseite zeigte die B7-2 IR keine Veränderung. Eine statistisch signifikanter Unterschied zwischen axotomierter und kontralateralen Seite (* $p < 0.05$ in einem gepaarten Student's t-test, $n = 5$ Tiere pro Zeitpunkt) ließ sich an allen Zeitpunkten zwischen Tag 2 und Tag 42 nachweisen.

3.3.2 Zelluläre Lokalisation von B7-2

Die zelluläre Lokalisation von B7-2 auf aktivierter, phagozytierender Mikroglia wurde sowohl durch Doppelmarkierung mit mikroglialen Markern, als auch durch Elektronenmikroskopie bestätigt.

Ultrastrukturelle Analyse der B7-2 Färbung zeigte eine starke Immunreaktivität auf Mikroglia-Knötchen (Abbildung 17). Die Färbung war beschränkt auf die Zelloberfläche von um neuronale Debris zusammengelagerten, phagozytierenden mikroglialen Zellen und konnte weder auf nicht-aktivierter Mikroglia, noch auf Neuronen, Astrozyten oder Endothelzellen nachgewiesen werden.

Bestätigt wurde das auf Mikroglia beschränkte Expressionsmuster von B7-2 durch Ko-Lokalisation bei Doppel-Immunfluoreszenz Markierung mit IBA1, einem konstitutionell auf Mikroglia exprimiertem Molekül (Imai et al., 1996) (Abbildung 18).

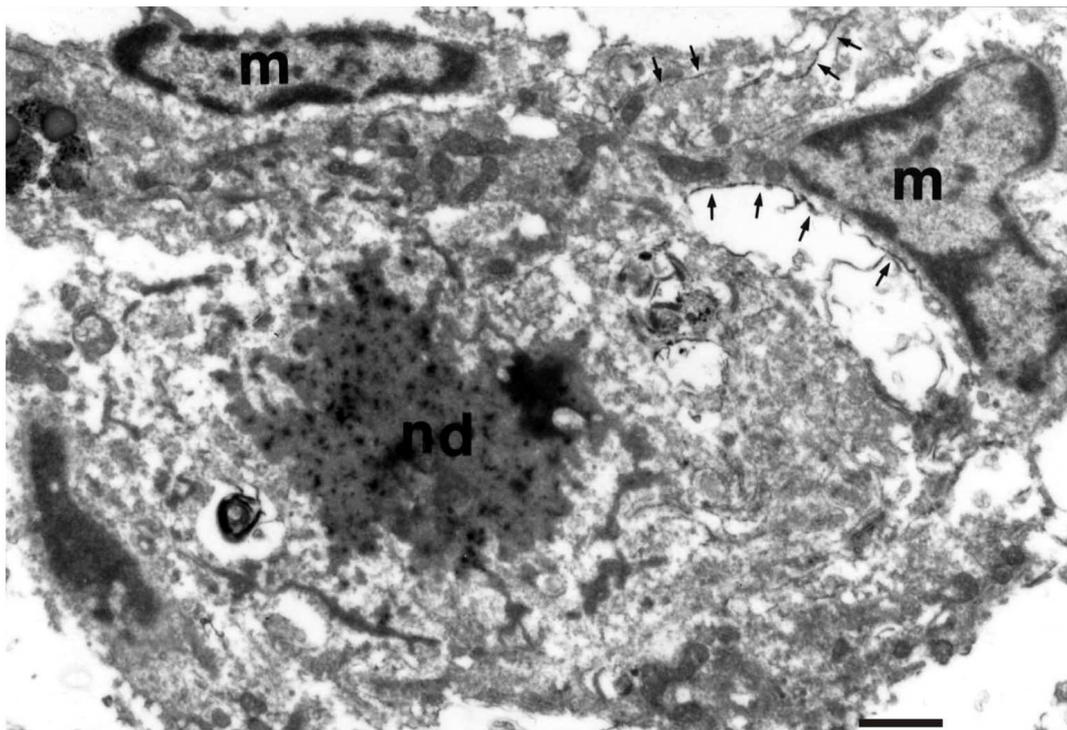


Abbildung 17: Elektronenmikroskopische Aufnahme der B7-2 Immunreaktivität auf einem phagozytotischen Mikroglia-Knötchen am Tag 14 nach Fazialisaxotomie. Man beachte die kontinuierliche Immunreaktivität (Pfeile) für B7-2 selektiv auf der Membranoberfläche mikroglialer Zellen (m), die sich um ein sterbendes Motoneuron gruppiert haben (nd). Die Skalierung entspricht 1 µm.

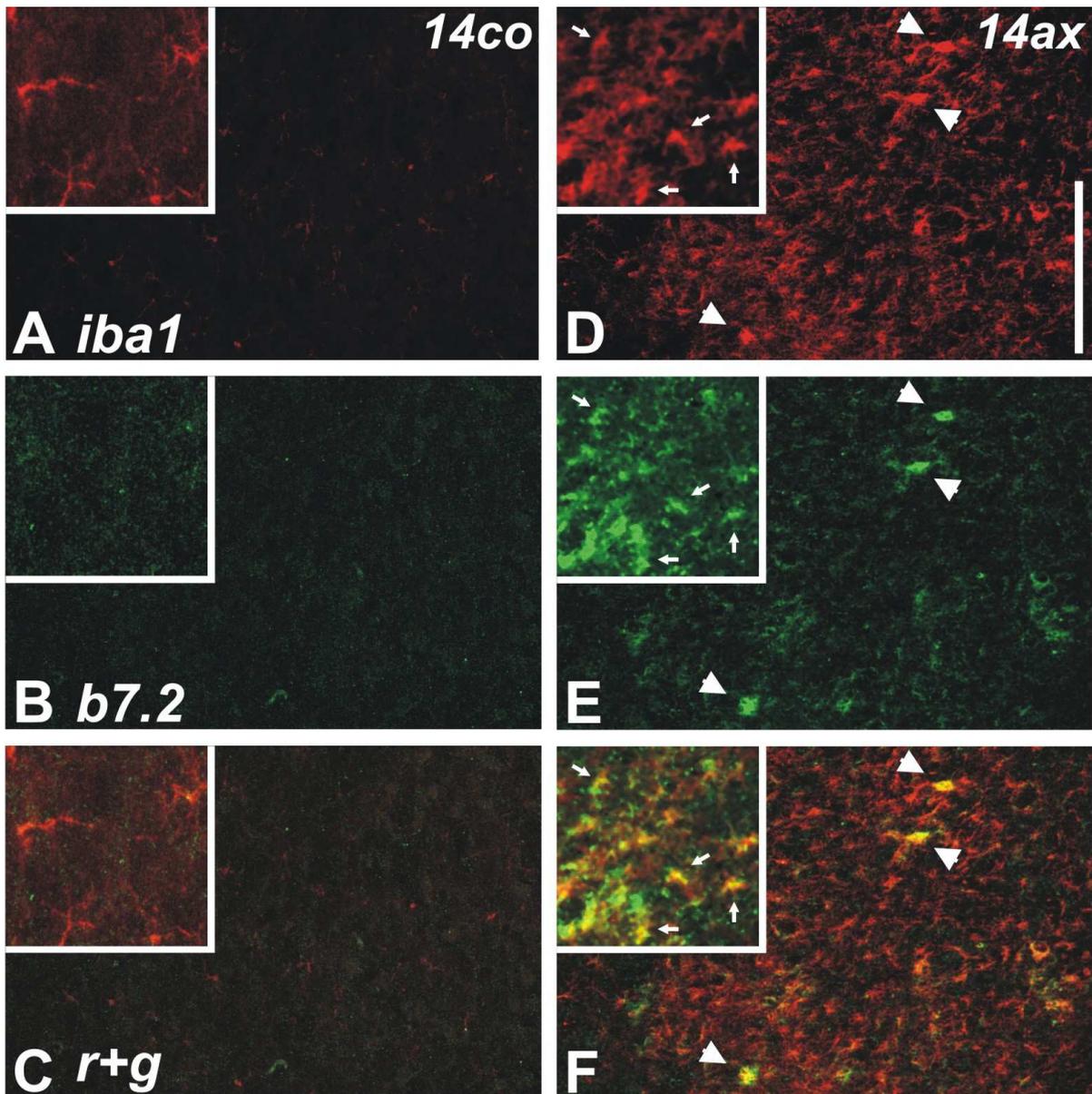


Abbildung 18: Doppelimmunfluoreszenz-Färbung des unverletzten (co, **A,B,C**) und axotomierten FMN (ax, **D,E,F**) am Tag 14 nach peripherer Nerven transektion. Sowohl B7-2 (grün) als auch IBA1 (rot), ein selektiver Mikroglia Marker, zeigen einen deutlichen Anstieg nach Fazialisaxotomie. Die Ko-lokalisierung (gelb) ist besonders deutlich auf den 40µm großen phagozytotischen Knötchen (**F**, Pfeilspitzen) zu sehen.

Die Inserts in A, B & C zeigen jeweils eine 2.5-fache digitale Verstärkung der B7-2 und IBA1 IR auf der unverletzten Seite, und in D, E & F jeweils eine 2.2-fache digitale Verstärkung von B7-2 und IBA auf der axotomierten Seite. Auf der unverletzten Seite zeigen die Inserts A, B & C ein Fehlen der B7-2 IR auf ruhender Mikroglia. Auf der verletzten Seite ist eine sehr variable, mäßige starke B7-2 IR auch auf einer Untergruppe aktivierter, aber nicht phagozytierender Mikroglia zu erkennen (kleine Pfeile).

Skalierung entspricht 250µm, bzw. 125µm in den Inserts.

3.3.3 Quantifizierung der mikroglialen B7-2 IR im Zeitverlauf

Zur Quantifizierung der B7-2 Immunreaktivität auf aktivierter Mikroglia nach Fazialisaxotomie, wurde der in Material & Methoden beschriebene DIFF-RISC Algorithmus verwendet. Für jeden Zeitpunkt wurden 20µm Gewebeschnitte aus jeweils 5 Tieren verwendet. Zu allen Zeitpunkten war auf der Kontrollseite weder für B7-2 noch für IBA signifikante Veränderungen in der Immunreaktivität zu sehen.

Die in Abbildung 19 dargestellten DIFF-RISC Werte der axotomierten Seite zeigen sowohl für B7-2, als auch für IBA1 einen Anstieg ab Tag 2. Während IBA1 bis zum einem Maximum an Tag 14 kontinuierlich zunimmt, verläuft die Kurve für B7-2 in zwei Stufen. Einem ersten Zuwachs an Tag 2 folgt ein weiterer großer Sprung in den DIFF-RISC Werten an Tag 14, bevor sie schließlich an Tag 42 wieder deutlich abfallen.

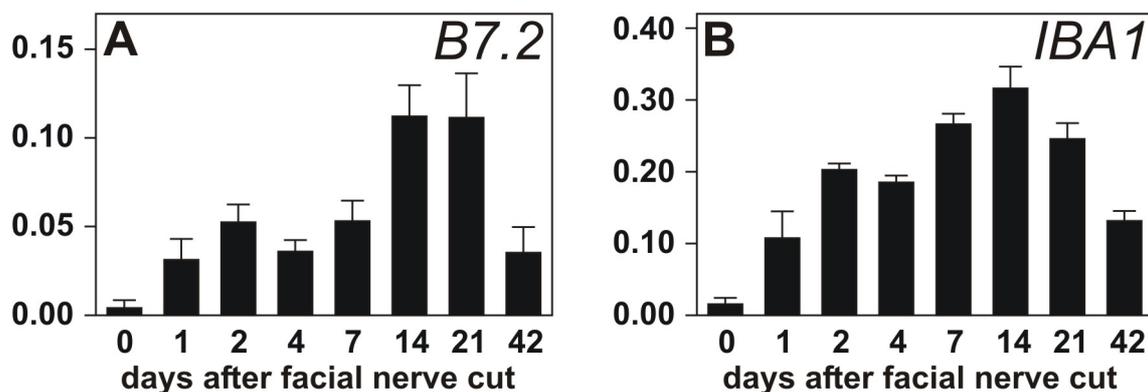


Abbildung 19: Quantitativer Zeitverlauf der mikroglialen B7-2 (A) und IBA1 (B) Immunreaktivität. Die Werte wurden mittels des DIFF-RISC Algorithmus in 20µm dicken Gewebeschnitten von jeweils 5 Tieren pro Zeitpunkt ermittelt.

Nach Fazialisaxotomie kommt es zu einem schnellen, aber nur mäßig starken Anstieg der B7-2 Immunreaktivität bereits an Tag 2 (A) und einem zweiten, deutlicheren Gipfel an Tag 14 & 21. Die IBA1 Immunreaktivität (B) zeigt einen ähnlichen, aber weniger abgestuften Verlauf mit einem Maximum ebenfalls an Tag 14 nach Fazialisaxotomie.

3.3.4 Expression von B7-2 in Zytokin-defizienten Mäusestämmen

Wie in den vorhergegangenen Experimenten gezeigt, erreicht die B7-2 Immunreaktivität um Tag 14 ihren Höhepunkt. Um einen möglichen Einfluß der ebenfalls zu diesem Zeitpunkt ihr Maximum erreichenden Expression proinflammatorischer Zytokine zu prüfen (Raivich et al., 1998a), untersuchten wir die B7-2 Expression immunhistologisch in verschiedenen Zytokin-Rezeptor

defizienten Mäusestämmen. Zu den verwendeten Tieren gehörten homozygot defiziente Mäuse für Interferon Gamma Rezeptor Typ 1 (IFN γ R1 $^{-/-}$), Interleukin Rezeptor Typ 1 (IL1R1 $^{-/-}$), Tumor Necrosis Factor Type 1 Rezeptor (TNFR1 $^{-/-}$, p55), Tumor Necrosis Factor Type 2 Rezeptor (TNFR2 $^{-/-}$, p75) und Tumor Necrosis Factor Type 1 & 2 Rezeptor kombiniert (TNFR1&2 $^{-/-}$). Für jeden der Knock-out Stämme wurden Kontrollen mit gleichem genetischen Hintergrund verwendet.

Phagozytotische Knötchen

Abbildung 20 zeigt repräsentative Gewebeschnitte (20 μ m) der einzelnen Knock-out Stämme am Tag 14 nach Fazialisaxotomie. B7-2 Immunreaktivität ist hier grün und IBA1 Immunfluoreszenz rot dargestellt. In normalen Tieren sowie IL1R1 $^{-/-}$ und IFN γ R1 $^{-/-}$ Mäusen lassen sich deutlich die doppelt markierten phagozytotischen Mikroglia-Knötchen (gelb) erkennen. In TNFR1&2 $^{-/-}$ finden sich praktisch keine dieser Zellaggregate. Bestätigt wurde die Reduktion mikroglialer Knötchen in TNFR1&2 $^{-/-}$ Mäusen auch durch Quantifizierung B7-2 positive Knötchen in lichtmikroskopischer Immunhistochemie. Dabei wurden in den für beide TNF-Rezeptoren defizienten Mäusen (n=8 WT/7KO) 8-mal weniger Knötchen gesehen als in den Kontrolltieren. Pro 20 μ m Gewebeschnitt wurden in den Wildtyp Mäusen in Durchschnitt 5.7 ± 0.6 , in den Mutanten hingegen nur 0.7 ± 0.3 gezählt (p<0.1% student t-test). Es ist jedoch anzumerken, daß die wenigen phagozytotischen Knötchen die in den Doppel-Knock-outs präsent sind, ebenso stark B7-2 positive sind wie in den Kontrolltieren. Die Anzahl B7-2 positiver Mikroglia-Knötchen in IFN γ R1 $^{-/-}$, IL1R1 $^{-/-}$, TNFR1 $^{-/-}$ und TNFR2 $^{-/-}$ defizienten Tieren war unverändert im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollen.

B7-2 Immunfluoreszenz

Quantifiziert wurden die B7-2 und IBA1 Intensität auf mikroglialen Zellen jeweils mit dem DIFF-RISC Algorithmus. Während in den IFN γ $^{-/-}$ Mäusen die B7-2 Werte am Tag 14 nach Fazialisaxotomie vergleichbar mit den Wildtyp Tieren waren, zeigten alle anderen untersuchten Knock-out Stämme eine statistisch signifikante Reduktion von B7-2 auf der operierten Seite (Abbildung 21). In den IL1R1 $^{-/-}$ Mäusen war im verletzten Nucleus facialis der Anstieg von B7-2 um 31% vermindert (n=8 WT/7KO). Am deutlichsten war der Effekt in den TNF-Rezeptor Doppelmutanten.

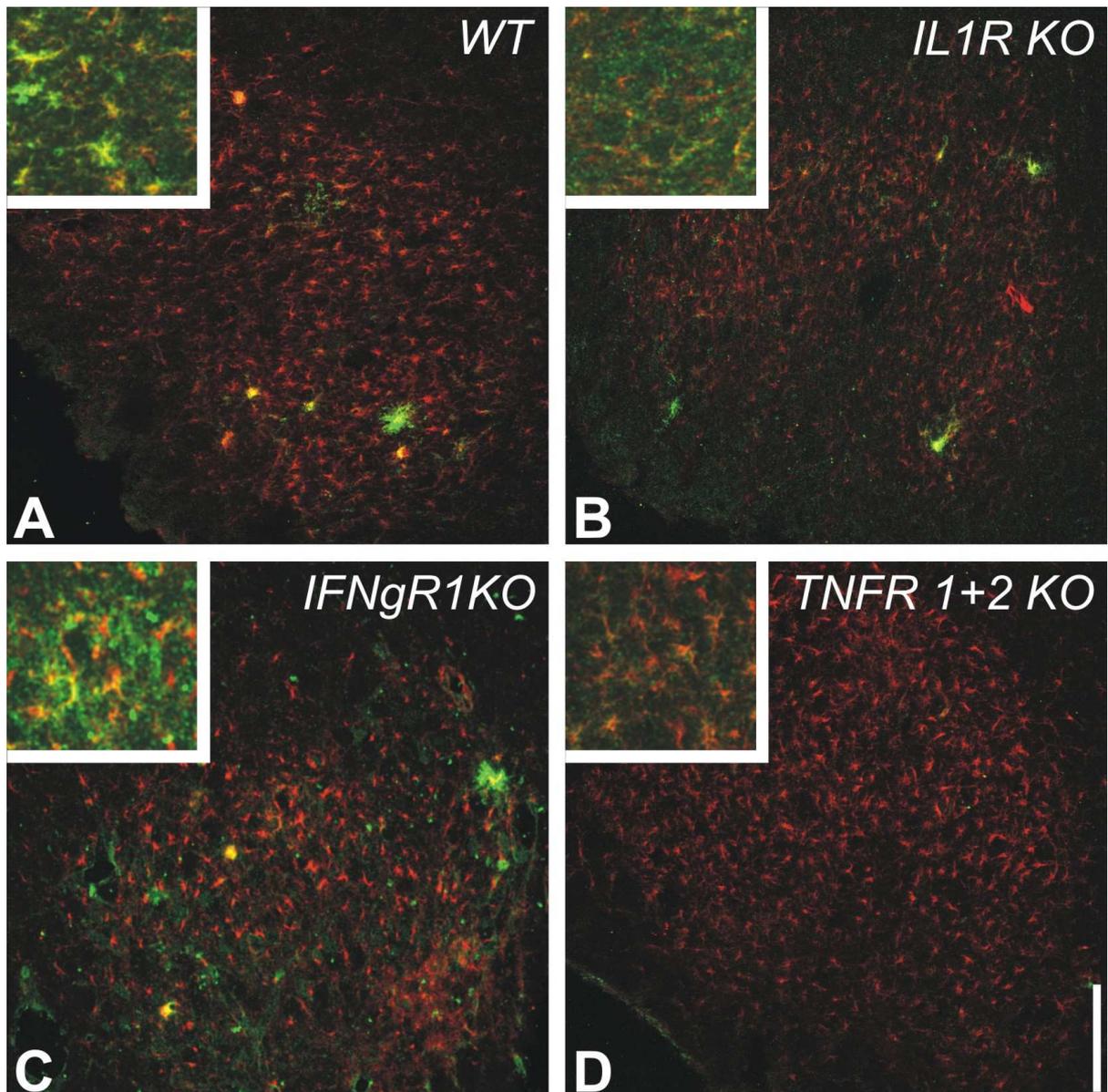


Abbildung 20: B7-2 Immunreaktivität in Zytokin-Rezeptor defizienten Mäusen an Tag 14 nach Fazialisaxotomie. Dargestellt ist eine doppelimmunfluoreszente Färbung für B7-2 (grün) und IBA1 (rot), wobei die Ko-lokalisation beider Marker auf phagozytotischen Knötchen gelb erscheint. In den Einschüben ist jeweils eine digital 2.5-fach verstärkte und 2-fach vergrößerte Färbung auf nicht-phagozytierende Mikroglia dargestellt.

In **A** ist die Immunreaktivität im Wildtyp Bl/6x129 zu sehen, während in **B** die Färbung in Interleukin1 Rezeptor 1 (IL1R KO), in **C** Interferon gamma Rezeptor (IFNgRKO) und in **D** Tumor Necrosis Factor alpha Rezeptor 1 & 2 (TNFR1+2 KO) defizienten Tieren abgebildet ist.

Im Gegensatz zu den anderen Mutanten, finden sich in den TNFR1+2 KO (**D**) keine phagozytotischen Knötchen. In den vergrößerten Bildausschnitten ist in den TNFR1+2 KO, aber auch in den IL1R KO, zudem eine Abnahme der B7-2 Immunreaktivität auf nicht-phagozytierende Mikroglia zu sehen.

Die Skalierung entspricht 200µm, beziehungsweise 100µm in den vergrößerten Einschüben.

Die Abnahme B7-2 positiver phagozytotischer Knötchen in den TNFR1&2-/- Tieren war von einem um 54% reduzierten Anstieg der globalen B7-2 Immunreaktivität auf ramifizierter, nicht aktivierter Mikroglia begleitet. Obwohl die Deletion von jeweils TNFR1 oder TNFR2 alleine keinen Einfluß auf die Anzahl B7-2 positiver phagozytotischer Knötchen hatte, zeigt sich in beiden Mutanten eine statistisch signifikante Abnahme der diffusen B7-2 Immunreaktivität. In den TNFR1-/- Tieren war der Anstieg um 39%, in den TNFR2-/- Tieren um 49% vermindert (Abbildung 22).

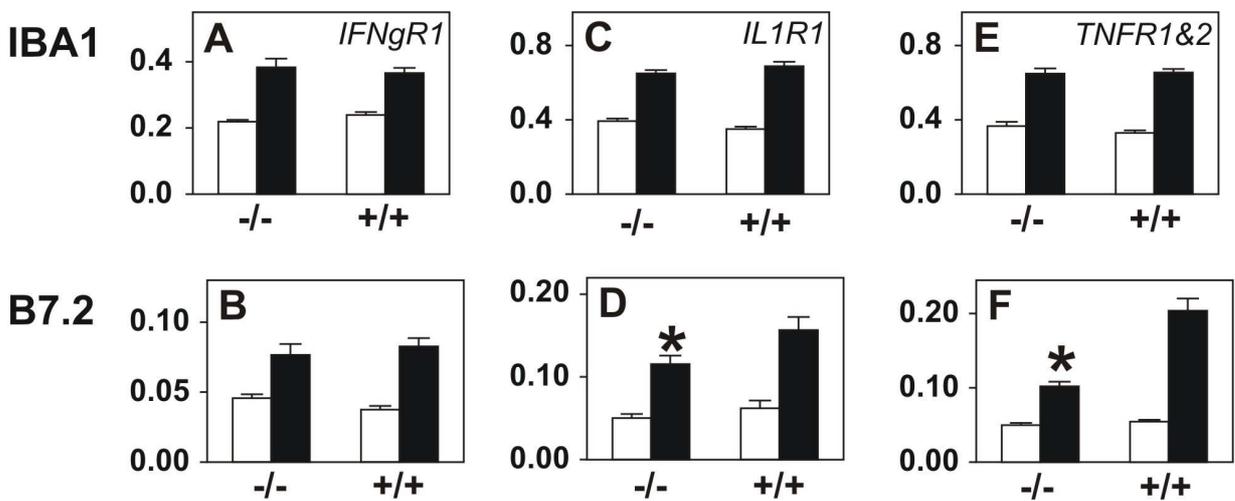


Abbildung 21: Effekt von Zytokin-Rezeptor Defizienz auf die, mittels des DIFF-RISC Algorithmus quantifizierte, B7-2 Immunreaktivität auf IBA1 definierten mikroglialen Zellen an Tag 14 nach Fazialisaxotomie.

Die weißen Balken zeigen jeweils den Durchschnitt \pm SEM auf der Kontrollseite, die schwarzen Balken die Werte für die axotomierte Seite. Die Anzahl der Tiere war für IFNg+/+ und IFNg -/- 6 und 7, für IL1R1+/+ und IL1R1-/- 7 und 8 und für TNFR1&2+/+ beziehungsweise TNFR1&2-/- jeweils 7 und 8.

Die IBA1 Immunreaktivität nimmt nach Axotomie in allen transgenen Tieren im normalen Maße zu (A,C,E). In den IL1R1-/- (D) und TNFR1&2-/- (F) zeigt sich jedoch ein im Vergleich zu den Wildtyptieren (+/+) deutlich reduzierter Anstieg der B7-2 Expression auf der verletzten Seite. Die Reduktion war statistisch signifikant ($p < 1\%$ in einem ungepaarten Student's t-test). IFNgR1 Defizienz (B) hatte keinen Einfluß auf die B7-2 Immunreaktivität.

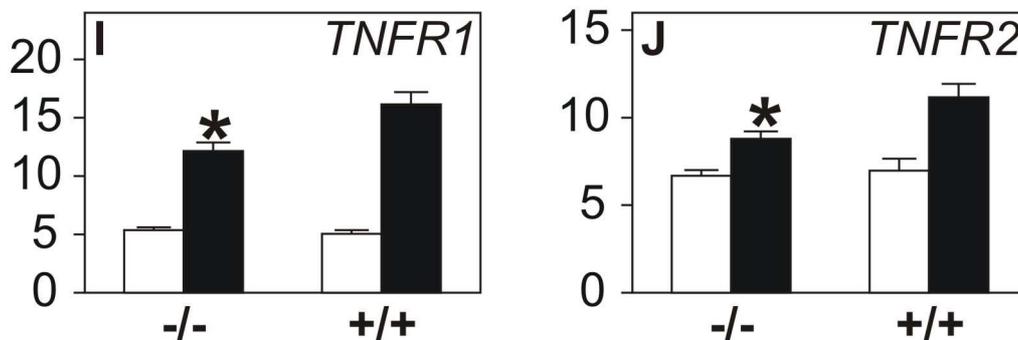
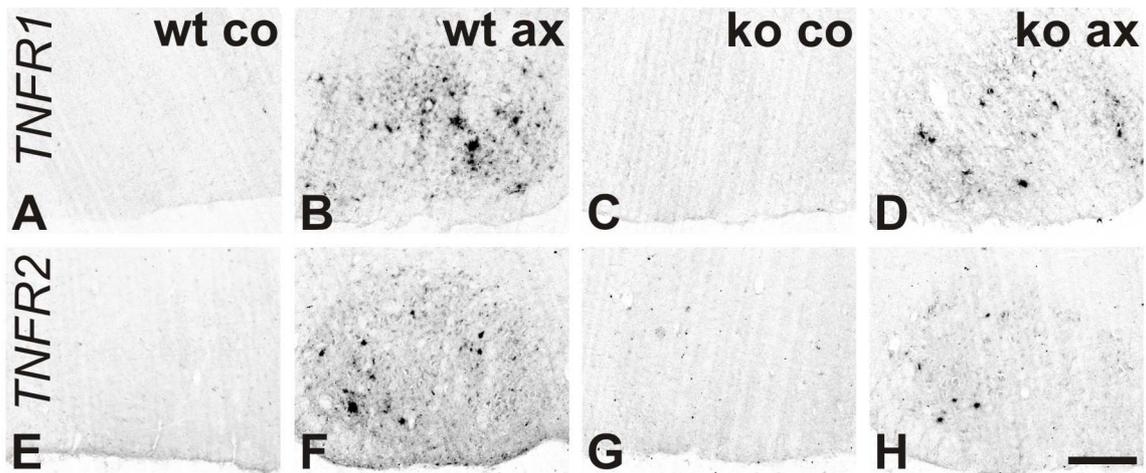


Abbildung 22: Die Auswirkung von TNFR1- (A-D,I) und TNFR2-Defizienz (E-H,J) auf die B7-2 Immunreaktivität am Tag 14 nach Fazialisaxotomie.

Auf der unverletzten Kontrollseite (A,C,E,G) ist weder in den Wildtyp-Mäusen (wt) noch den Knock-outs (ko) B7-2 Immunreaktivität zu sehen. Nach Axotomie kommt es in den Wildtyp-Tieren (B,F) zu einem deutlichen Anstieg der B7-2 Färbung, während diese Zunahme in den Mutanten (D,H) deutlich reduziert ist. Sowohl in den TNFR1^{-/-} als auch in den TNFR2^{-/-} Mäusen sind jedoch stark B7-2-positive phagozytotische Knötchen nachzuweisen.

Quantifizierung der B7-2 Immunreaktivität bestätigt sowohl in den TNFR1^{-/-} (I) als auch den TNFR2^{-/-} (J) einen statistisch signifikant verringerten Anstieg der B7-2 Expression auf der verletzten Seite.

Die Skalierung entspricht 20µm.

3.3.5 Effekt von LPS auf B7-2 und MHC1 Expression

Der Effekt von zusätzlich zur Fazialisaxotomie systemisch appliziertem LPS auf die mikrogliale B7-2 und MHC1 Expression wurde mit Hilfe von IBA1 Doppelmarkierung und des DIFF-RISC Algorithmus bestimmt. Am Tag 12 nach peripherer Durchtrennung des Nervus facialis wurden jeweils 3 Tieren 0.1mg E. coli LPS, beziehungsweise isotone Kochsalzlösung intraperitoneal verabreicht. 48 Stunden später wurden die Mäuse sakrifiziert.

Im Vergleich zu den Kontrolltieren, zeigten die mit LPS behandelten Mäuse interessanterweise einen statistisch signifikanten Anstieg von B7-2 auf IBA1-positiven mikroglialen Profilen auf der unoperierten Seite ($p < 0.1\%$, Student's t-test). Auf der operierten Seite kam es ebenfalls zu einem leichten, aber statistisch nicht signifikanten Anstieg der B7-2 Immunreaktivität (Abbildung 23). Für MHC1 hingegen, zeigte sich ein komplett entgegengesetztes Expressionsmuster. Nach Injektion von LPS war auf der unoperierten Seite kein Anstieg der MHC1 Immunreaktivität zu sehen. Im axotomierten Fazialiskern hingegen kam es zu einer statistisch signifikanten 27%igen Abnahme des MHC1 Wertes.

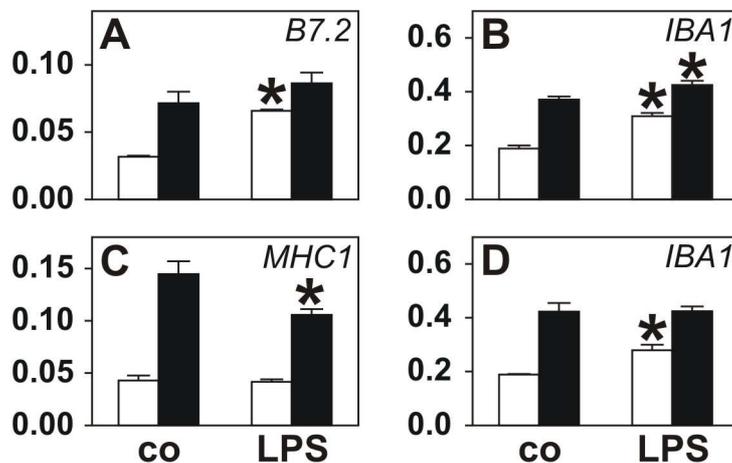


Abbildung 23: Der Effekt von systemisch verabreichten Lipopolysaccharid (LPS) auf die mikrogliale Expression von MHC1, B7-2 und IBA1.

Die Quantifizierung erfolgte mittels des DIFF-RISC Algorithmus an Tag 14 nach Fazialisaxotomie. Den Kontrolltieren (co, n=3) wurde intraperitoneal isotone Kochsalzlösung verabreicht, während den LPS behandelten Tieren (LPS, n=3) jeweils 0.1mg LPS injiziert wurde. Die Werte der unoperierten Kontrollseite sind in weiß, die der axotomierten Seite in schwarz dargestellt.

In beiden Versuchsansätzen zeigte sich nach LPS Administration ein signifikanter Anstieg ($p < 5\%$ in t-test) der IBA1 Immunreaktivität auf der unoperierten Seite (B,D). Eine ähnliche, statistisch signifikante Zunahme auf der Kontrollseite wurde für die B7-2 Expression gesehen (A), während die MHC1 Immunreaktivität (C) auf der verletzten Seite signifikant reduziert war.

3.4 Die Rolle proinflammatorischer Zytokine bei der Lymphozyten-Einwanderung in verletztes ZNS

Periphere Axotomie des Nervus facialis führt zu einem Auftreten CD3-positiver Lymphozyten im betroffenen zentralnervösen Kerngebiet (Raivich et al., 1998a). Im

Modell der peripheren Fazialisaxotomie läßt sich der Zeitverlauf der Rekrutierung in eine frühe Phase (Tag 1 – 4) mit nur wenig, und eine späte Phase zwischen Tag 7 und 21, mit deutlicher Einwanderung von Lymphozyten unterteilen (Raivich et al., 1998a; Galiano et al., 2001). Ein Ziel dieser Arbeit war, mit Hilfe von Zytokin-Rezeptor defizienten Mäusen, den Einfluß proinflammatorischer Zellmediatoren auf die Rekrutierung von Lymphozyten in den axotomierten Nucleus facialis zu verschiedenen späten Zeitpunkten zu untersuchen.

3.4.1 Lymphozyten-Rekrutierung in Wildtyp und Zytokin-Rezeptor defizienten Tieren

Wie in den vorhergegangenen Experimenten wurden homozygot defiziente Mäuse für Interferon Gamma Rezeptor Typ 1 (IFN γ R1 $^{-/-}$), Interleukin Rezeptor Typ 1 (IL1R1 $^{-/-}$), Tumor Necrosis Factor Type 1 Rezeptor (TNFR1 $^{-/-}$, p55), Tumor Necrosis Factor Type 2 Rezeptor (TNFR2 $^{-/-}$, p75) und Tumor Necrosis Factor Type 1 & 2 Rezeptor kombiniert (TNFR1&2 $^{-/-}$) verwendet. An den Tagen 7, 14 und 21 nach Fazialisaxotomie wurden die transgenen Tiere und die genetisch entsprechenden Wildtyp-Kontrollen sakrifiziert. Die Gehirnschnitte wurde mittels Immunhistochemie auf die Präsenz CD3-positiver Zellen im Fazialiskern hin untersucht.

Bereits im normalen Gehirn kommt es in sehr geringem Ausmaß zu einer Extravasation von Lymphozyten (Hickey, Hsu, and Kimura, 1991). Dies sind jedoch äußerst seltene Ereignisse und in unserer Versuchsserie wurde im unverletzten Nucleus facialis durchschnittlich weniger als eine CD3+ Zelle pro 20 μ m Schnitt gesehen.

Effekt des genetischen Hintergrundes

Die in den Versuchen eingesetzten transgenen Tiere hatten zum Teil verschiedene genetische Hintergründe. So wurden die TNFR1 $^{-/-}$ und TNFR2 $^{-/-}$ aus C57Bl/6, die IFN γ R1 $^{-/-}$ aus 129Sv/Ev und die TNFR1&2 $^{-/-}$ und IL1R $^{-/-}$ aus einem gemischten B6/129 generiert. Die Durchtrennung des Fazialisnerves führt bei allen Wildtyptieren zu einem reproduzierbaren Anstieg der Lymphozyten im verletzten Kerngebiet. Das Maximum wird jeweils an Tag 14 erreicht, aber die absoluten Zahlen schwanken in Abhängigkeit vom Mausstamm (Abbildung 24). So zeigen C57Bl/6 Tiere mit $58,7 \pm 4,2$ (Mittelwert \pm SE) bzw. $45,8 \pm 6,2$ die höchste Einwanderung an CD3+ Zellen.

Vergleichsweise niedrig sind die Werte bei 129Sv/Ev Mäusen ($11,6 \pm 1,6$) und etwas höher in B6/129 Tieren ($21,8 \pm 1,6$ bzw. $33,2 \pm 6,1$). Die angeführten Zahlen beziehen sich auf Tag 14, waren aber an Tag 7 und Tag 21 vergleichbar.

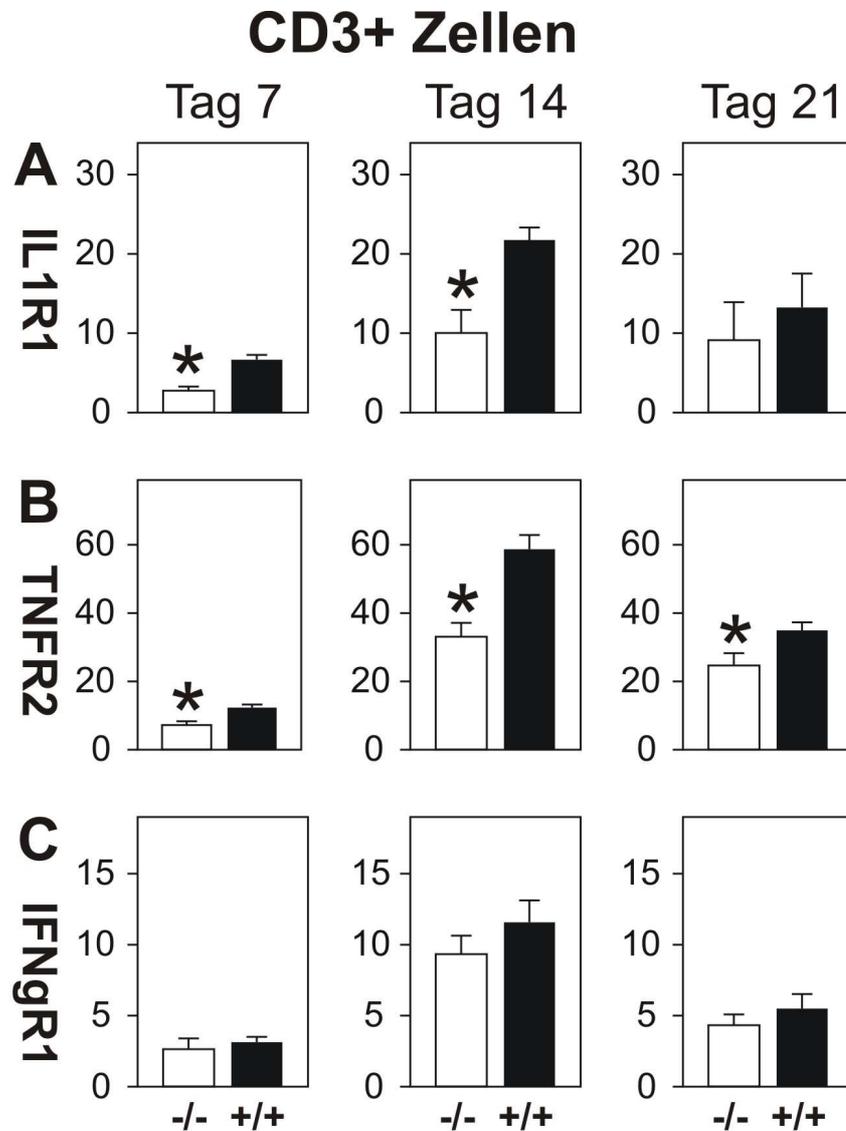


Abbildung 24: Effekt der Zytokin-Rezeptordefizienz für (A) IL1R1, (B) TNFR2, (C) IFNgr1 auf die Zahl der an den Tagen 7, 14, 21 in den Fazialiskern eingewanderten Lymphozyten (Mittelwert +/- SEM). Deletion des IL1R1 und TNFR2 führte an Tag 7 und 14 zu einem statistisch signifikant geringeren Einstrom CD3+-Lymphozyten in den axotomierten Nucleus facialis der Mutanten (-/-) im Vergleich zu den Wildtypkontrollen (+/+). Die Wildtyptiere sind jeweils bezüglich des genetischen Hintergrundes identisch zu den transgenen Tieren, bei **A** B6/129, **B** c57Bl/6 und **C** 19Sv/Ev. Statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) sind mit einem Sternchen versehen.

Tabelle 6: Lymphozyten-Zahlen im axotomierten FMN an Tag 14

Maus Stamm	Mittelwert	SE
C57Bl/6	58.7	4.2
C57Bl/6	45.8	6.2
B6/129	33.2	6.1
B6/129	21.8	1.6
129Sv/Ev	11.6	1.6

Zytokin-Rezeptor defiziente Tiere

Verglichen mit den bezüglich des genetischen Hintergrundes gleichen Kontrolltieren, kam es bei IL1R1^{-/-} Tieren an Tag 14 zu einer um 54% verringerten Infiltration von CD3⁺ T-Zellen in das axotomierte Kerngebiet ($p < 0,01$) (Abbildung 24). Der Effekt zeichnete sich mit einer Reduktion um 59% bereits an Tag 7 ab ($p < 0,01$), und war im Trend auch an Tag 21 zu erkennen (- 31%; nicht signifikant). In TNFR2^{-/-} Mäusen kam es ebenfalls zu einer verminderten Lymphozyten-einwanderung. An Tag 14 war der Effekt mit einer Verminderung um 44% gegenüber Wildtyptieren am eindruckvollsten ($p < 0,01$), aber auch an Tag 7 (-42%, $p < 0,01$) und Tag 21 (-29%, $p < 0,05$) war die Leukozytenrekrutierung deutlich vermindert. Die Deletion von IFN γ R1 führte zu einer etwa 20%igen Reduktion von CD3⁺ Zellen zu allen Zeitpunkten, war aber nicht statistisch signifikant. Ebenso zeigte sich in den TNFR1^{-/-} Mäusen an Tag 14 ein geringer, aber nicht signifikanter Effekt (-4%). Hingegen war bei TNFR1&2 DKO's im Nucleus facialis eine Verminderung der T-Zellen um 63% zu verzeichnen ($p < 0,01$) (Abbildung 25). In allen transgenen Tieren fand sich auf der unverletzten Seite durchschnittlich weniger als ein Lymphozyt pro Schnitt.

Tabelle 7: Anzahl der Tiere für die Bestimmung der Lymphozyten Zahlen (+/+ / -/-)

	Tag 7	Tag 14	Tag 21
IL1R1	4/4	8/8	4/4
IFNγR1	4/3	7/7	4/6
TNFR2	4/5	7/7	5/5
TNFR1		6/8	
TNFR1&2		8/6	

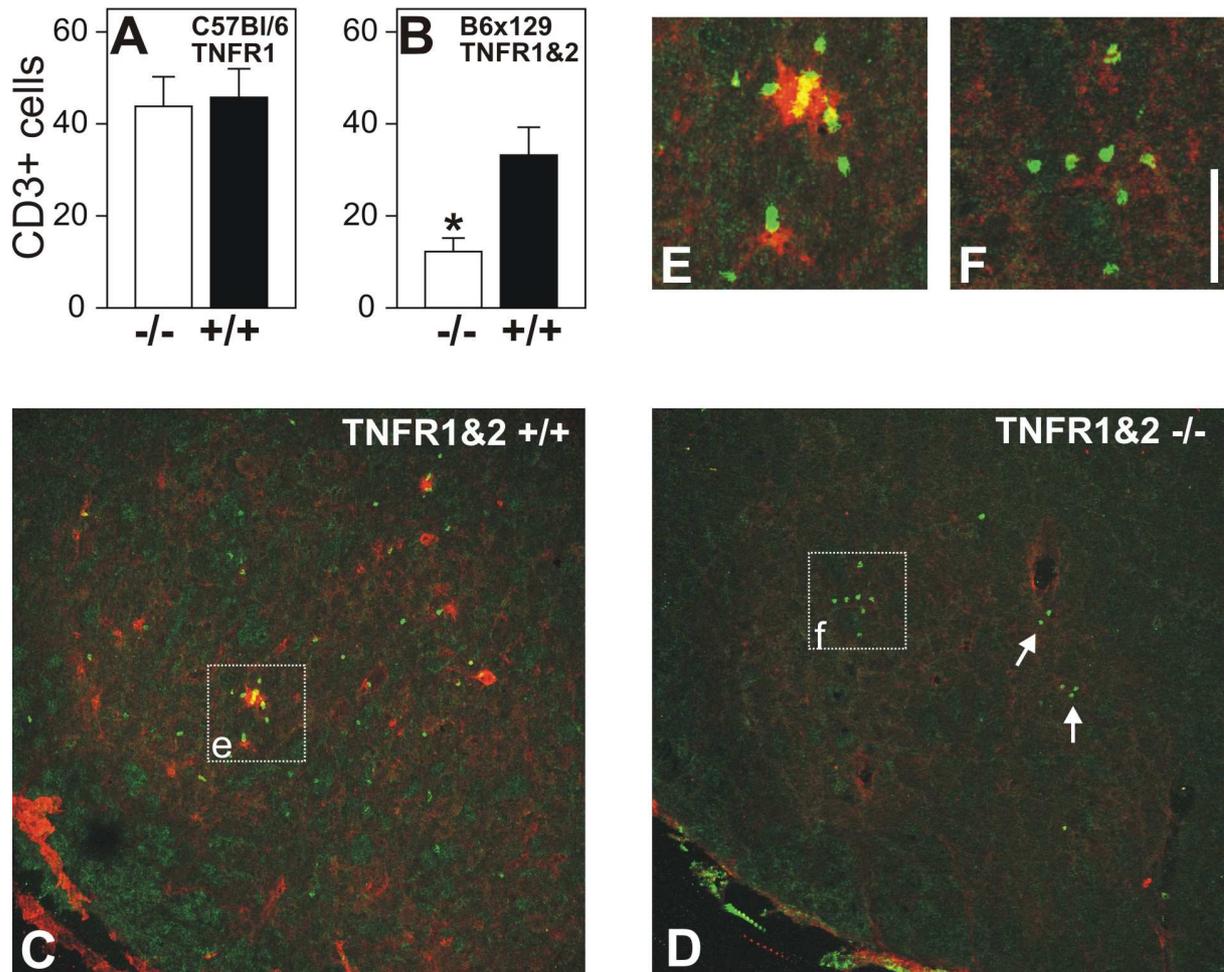


Abbildung 25: Effekt der TNFR1 und TNFR1&2 Deletion auf die Rekrutierung CD3+ Lymphozyten in den axotomierten Fazialiskern am Tag 14.

(A) Die Deletion von TNFR1 (C57Bl/6 Hintergrund) ist nur mit einer geringfügigen Abnahme der CD3+ Zellen assoziiert. (B) Kombinierte Deletion beider TNF-Rezeptoren (B6/129 Hintergrund) führt auf der axotomierten Seite zu einer Reduktion der einwandernden Lymphozyten um 63% im Vergleich zu den Kontrolltieren (+/+). Der Unterschied ist statistisch signifikant ($p < 0.01$) und wesentlich ausgeprägter als der Effekt von TNFR2 alleine.

C - F zeigen Doppelimmunfluoreszenz-Färbungen für CD3+ Lymphozyten (grün) und Thrombospondin (rot) vom axotomierten Fazialiskern in Wildtyp (+/+) und TNFR1&2-defizienten Tieren. Thrombospondin färbt unter anderem Blutgefäße und die Meningen an, ist aber besonders kräftig auf den etwa 15-25 μm großen phagozytotischen Mikroglia-Knötchen. In den Wildtyp-tieren (C, E) adhären an einem Teil dieser Knötchen CD3+ Lymphozyten. In den TNFR1&2 -/- Tieren fehlen die TSP+ Knötchen (D, F). Trotzdem lassen sich einige T-Zell-Aggregate nachweisen (Pfeile).

Die gepunkteten Kästchen in C und D zeigen, respektive, den in E und F vergrößert dargestellten Ausschnitt an. Die Skalierung entspricht 0,2 mm in C&D bzw. 65 μm in E&F

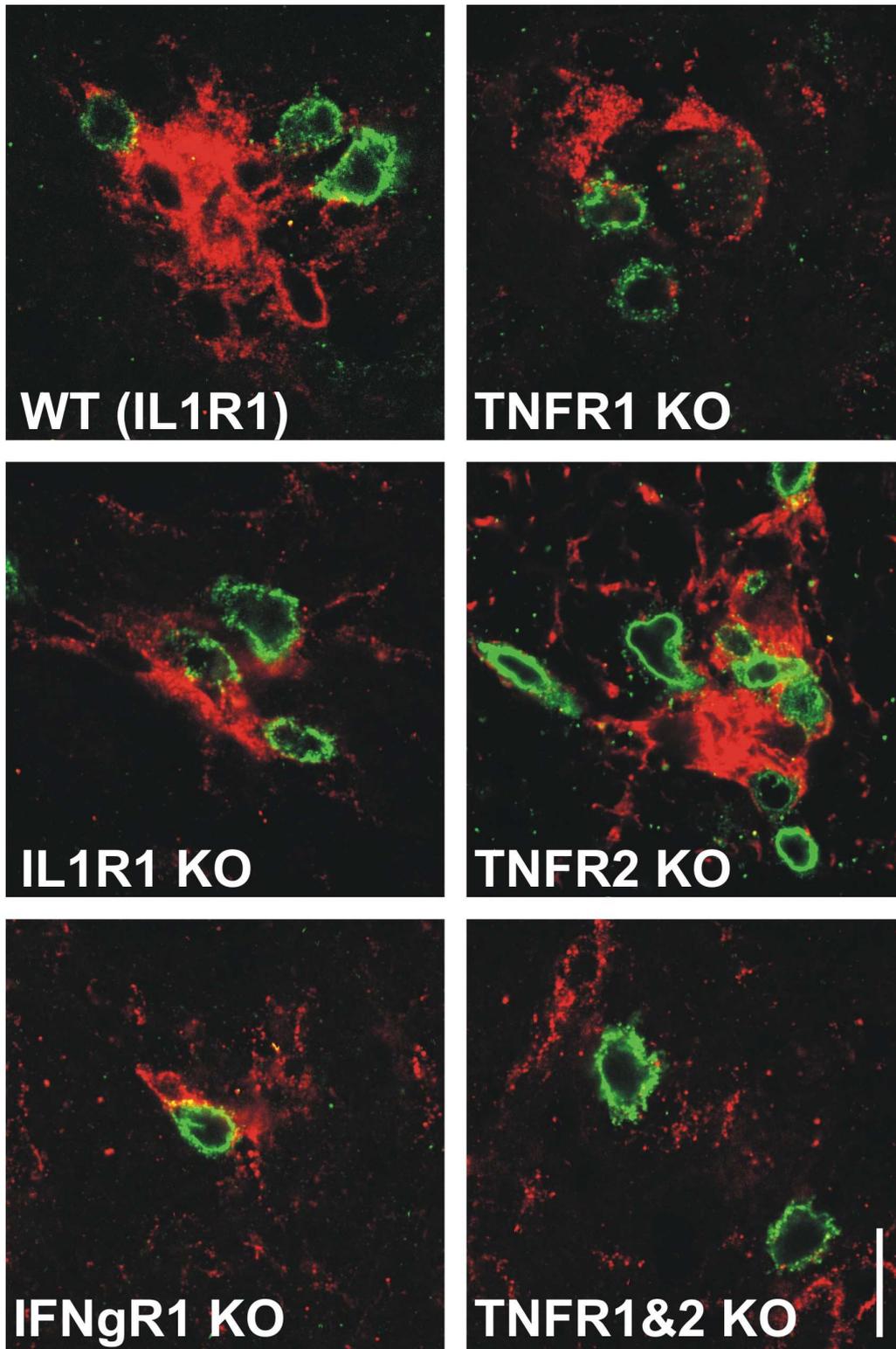


Abbildung 26: Interaktion zwischen CD3⁺ Lymphozyten und Mikroglia im axotomierten Fazialiskern an Tag 14 in Wildtyp bzw. Zytokin-Rezeptor-defizienten Mäusen. In der Doppel-Immunfluoreszenzfärbung sind die CD3⁺ Lymphozyten grün, die IBA1⁺ Mikrogliazellen rot in einer hohen Vergrößerung (die Skalierung entspricht 10 μ m) dargestellt. IBA1 ist im ZNS ein konstitutiver Marker für Mikroglia und wird auf phagozytotischen Zellen besonders hoch exprimiert. Man beachte den in den Wildtyptieren und Einzel-Rezeptor defizienten Tieren besonders deutlichen enge Kontakt zwischen Lymphozyten und Mikroglia-Knötchen. In den TNFR1&2 Mutanten fehlen phagozytotische Knötchen, aber die CD3⁺ T-Zellen finden sich auch weiterhin in der Nähe IBA1⁺ Mikroglia. Es besteht aber keine so nahe Verbindung zwischen Mikroglia und Lymphozyten wie in den anderen Tieren.

3.4.2 Lokalisation der eingewanderten Lymphozyten

Das Verteilungsmuster der in das verletzte Hirnparenchym einwandernden CD3+ T-Zellen ist ebenso interessant wie die Häufigkeit ihres Auftretens. Im axotomierten Nucleus facialis lagern sich die Lymphozyten praktisch immer phagozytotischen Mikroglia-Knötchen an. Am Tag 14 nach der Operation sind im Fazialiskerngebiet zahlreiche dieser großen (15 –25µm), TSP-positiven Konglomerate aus aktivierten, um neuronales Debris gelagerten Mikrogliazellen zu finden. Etwa 30 - 40% dieser Knötchen zeigen eine oder mehrere eng anhaftende T-Zellen (Abbildung 26).

Obwohl die kombinierte Ausschaltung von TNFR1 und TNFR2 zu deutlich verminderten neuronalen Zelltod und fast völligem Fehlen von Mikroglia-Knötchen führt, sind trotzdem vereinzelt eingewanderte Lymphozyten zu sehen. Diese formieren sich in losen Gruppen von bis zu 7 Zellen in der Nähe von TSP-positiven Zellen. Es fehlt hier allerdings der in Wildtypmäusen so ausgeprägte direkte enge Kontakt zwischen T-Zellen und Mikroglia (Abbildung 26). In allen anderen untersuchten Rezeptor-KOs blieb diese enge Verbindung zwischen phagozytotischem Knötchen und CD3+ Zelle erhalten.

3.5 Effekte von peripher applizierten Lipopolysacchariden im normalen und verletzten Gehirn

Die periphere Applikation von Lipopolysacchariden (LPS), einem potenten Mediator von Entzündungsreaktionen, führt im Gehirn von Nagern zu einer Induktion von Zytokinen und Aktivierung von Mikroglia (Eskay, Grino, and Chen, 1990; Lee et al., 1993; Buttini et al., 1997; Hartlage-Rubsamen, Lemke, and Schliebs, 1999). In den folgenden Experimenten wurde der Effekt von LPS auf die Blut-Hirnschranke und die Rekrutierung von Leukozyten in das Parenchym des normalen und des durch Fazialisaxotomie vorgeschädigten Hirnstammes untersucht.

3.5.1 LPS zerstört die Blut-Hirnschranke

Die Intaktheit der Blut-Hirnschranke wurde durch intraperitoneale Applikation von humanem Serumalbumin (hSA) und immunhistochemischer Detektion dieses Proteins in Gehirnschnitten überprüft. Während im unbehandelten Mäusegehirn keine hSA-Immunreaktivität zu detektieren ist, läßt sich hSA 48 Stunden nach

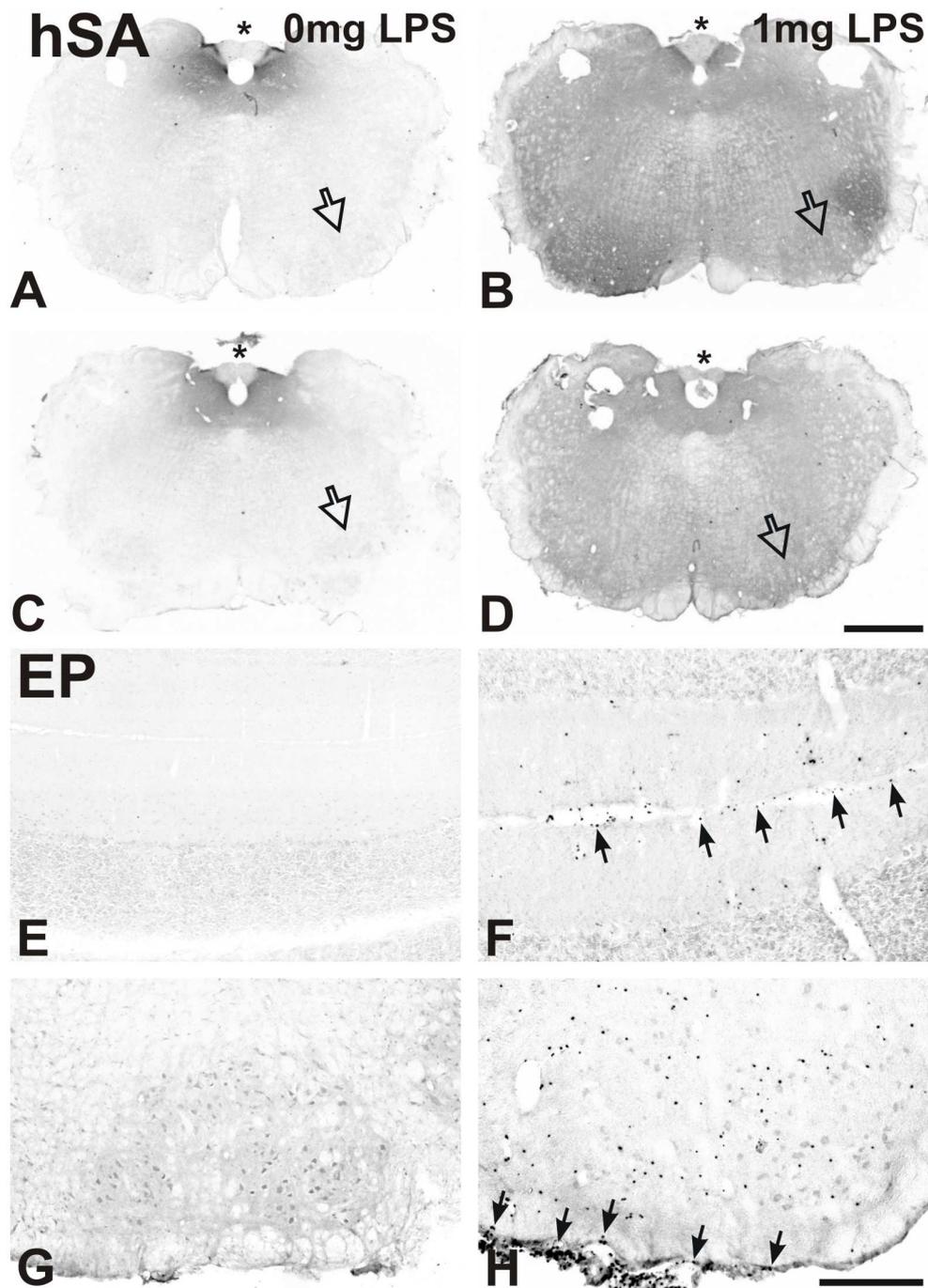


Abbildung 27: Injektion von Lipopolysaccharid (LPS) führt zu einer Zerstörung der Blut-Hirnschranke (BHS) und der Infiltration des Parenchyms durch myeloperoxidase-positive Granulozyten.

A - D zeigt die Immunreaktivität für humanes Serum-Albumin (hSA) 48h nach dessen intraperitonealer Applikation in Tieren, die zusätzlich isotone Kochsalzlösung (A, C) oder 1mg LPS injiziert bekommen hatten. 12 Tage vor den Injektionen war sowohl bei den C57Bl/6 (A, B) als auch in den Balb/c (C, D) zudem der rechte N. facialis durchtrennt worden. In den nicht LPS-behandelten Tieren ist die hSA-Immunreaktivität auf das die Area postrema (*) umgebende Areal begrenzt. Die Area postrema selbst ist wegen des Auswasch-Effektes beim Fixieren ungefärbt. LPS behandelte Tiere zeigen über den gesamten Hirnstamm hinweg eine starke Anfärbung, wobei die Fasertrakte weniger stark als die graue Substanz markiert sind. Fazialisaxotomie führt zu keinem zusätzlichen Effekt im betroffenen Kerngebiet (offene Pfeile). Die Skalierung in A bis D entspricht 1 mm.

E - H zeigen eine Färbung der Endogenen Peroxidase (EP) im Zerebellum (E&F) und im intakten Fazialiskern (G&H) 48h nach Injektion von Kochsalzlösung (E&G) bzw. 1 mg LPS (F&H). Die Behandlung mit LPS führt zum Auftreten von zahlreichen EP+ Zellen im Parenchym und um die Meningen (Pfeile). Die Skalierung in E bis H entspricht 0,25 mm.

Injektion in Hirnstammregionen mit durchlässiger BHS wie etwa um die Area postrema nachweisen (Abbildung 27A-D). Alle übrigen Hirnareale, insbesondere auch der axotomierte Nucleus facialis, bleiben ungefärbt. Die relativ niedrige Immunreaktivität in der Area postrema selbst läßt sich durch einen Auswascheffekt bei der Fixierung erklären (Brightman et al., 1970). LPS behandelte Tiere zeigen, unabhängig von ihrem genetischen Hintergrund (C57Bl/6 oder Balb/c), einen Anstieg des nachweisbaren hSA im gesamten Hirnstamm. Die Färbung ist in der grauen Substanz stärker ausgeprägt als in der Fasertrakten.

3.5.2 LPS führt zu einem Einstrom Peroxidase-positiver Zellen in das Gehirn

3.5.2.1 Dosisabhängigkeit

Zusätzlich zu einer erhöhten Permeabilität der Bluthirnschranke, wurde das Erscheinen Myeloperoxidase-positiver Zellen im gesamten Hirnstammparenchym beobachtet (Abbildung 27E-H). Zur weiteren Untersuchung der Dosisabhängigkeit der Einwanderung dieser kleinen, runden Zellen wurden C57Bl/6 Mäuse fazialisaxotomiert und am Tag 12 mit 0µg, 1µg, 10µg, 100µg, 1mg oder 3mg in 0,9% NaCl gelöstem LPS subkutan injiziert (Abbildung 28). Die Zahl der Peroxidase-positiven Zellen im Nucleus facialis auf der normalen und axotomierten Seite wurde 48h später bestimmt. Obwohl auch vereinzelte Zellen in unbehandelten Tieren beobachtet wurden, zeigte sich erst ab 1mg LPS auf der unoperierten Seite ein drastischer Anstieg dieser Zellen. Bei Gabe von 3mg LPS war der Effekt noch deutlicher (Abbildung 29A). Dieser Anstieg war nicht nur auf die Fazialisregion beschränkt, sondern schloß den gesamten Hirnstamm, das Zerebellum und die an Meningen angrenzenden Areale mit ein. Die Transsektion des Nervus facialis führte zusätzlich zu einem vielfach stärkeren Anstieg im betroffenen Kerngebiet. Bei 1mg LPS waren im axotomierten Fazialiskern etwa 3-4 mal so viele Peroxidase-positive Zellen, bei 3mg ungefähr doppelt so viele wie auf der Gegenseite zu sehen.

3.5.2.2 Kinetik

Um den Zeitverlauf der Rekrutierung dieser Zellen zu erhellen, wurde in einer zweiten Serie den Tieren jeweils 96h, 48h, 24h und 12h vor Ablauf der 14 Tage nach Fazialisaxotomie 1mg LPS subkutan verabreicht. Bereits nach 12h war ein leichter Anstieg Peroxidase-positiver Zellen zu verzeichnen, der sich zwischen 24h

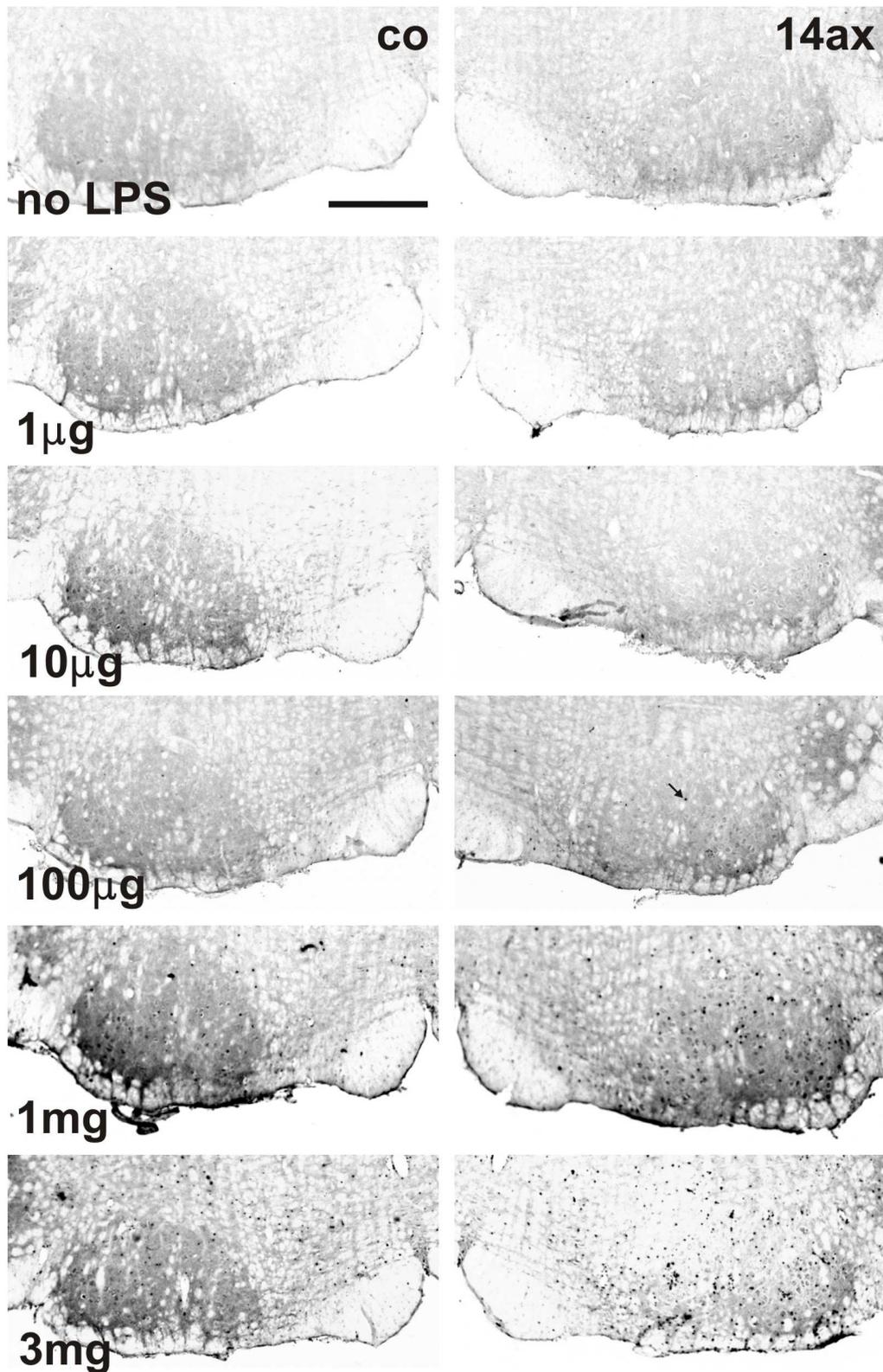


Abbildung 28: Peroxidase-positive Zellen im axotomierten (14ax) und kontralateralen (co) Fazialiskern 48 Stunden nach der Injektion zunehmender Dosen LPS. Die Axotomie des N. Facialis erfolgte 12 Tage vor LPS-Behandlung.

Im normalen, gut perfundierten Hirngewebe sind peroxidase-positive Zellen sehr selten. Dies ist ebenso bei niedrigen LPS-Konzentrationen der Fall (siehe Pfeil bei 100 µg). Behandlung mit 1 mg und 3 mg LPS hingegen führt zu einem starken Einstrom peroxidase-positiver Granulozyten. Man beachte, dass die Pyramidenbahn auch bei hohen Konzentrationen relativ ausgespart bleibt.

und 96h auf einem höheren Plateau einpendelte (Abbildung 29B). Auch hier zeigte die Fazialisaxotomie einen zusätzlich verstärkenden Effekt auf die Zelleinwanderung. Durchschnittlich fanden sich je Fazialiskern 35-45 Zellen. Bei einer Fläche des Kerngebiets von etwa 0,3 mm² und einer Schnittdicke von 20 µm entspricht dies einer Dichte von etwa 6000/mm³.

Die Gewebepräparation erfolgte zu verschiedenen Zeitpunkten, aber in allen Tieren strikt nach dem gleichen Protokoll. Die Färbung, die den hier gezeigten Daten zugrunde liegt wurde für alle Schnitte zum gleichen Zeitpunkt durchgeführt um Zählfehler durch eventuelle Unterschiede in der Färbeintensität zu reduzieren. Trotzdem war zwischen den einzelnen Tieren bei 1mg und 3mg eine deutliche Variabilität der Zahl der Peroxidase-positiver Zellen zu sehen. Da sich in Vorversuchen eine Reduktion dieser Variabilität durch Aufteilung der LPS Dosis in 4 Einzelgaben á 0,5 mg im Abstand von jeweils 12h zeigte, wurden alle folgenden Versuche unter diesem Regime durchgeführt.

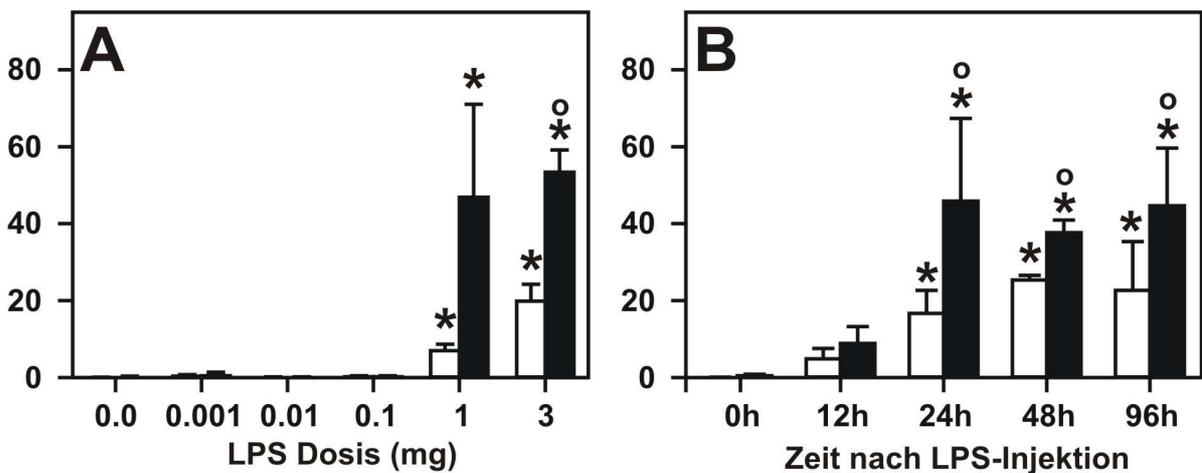


Abbildung 29: Quantifizierung Peroxidase-positiver Zellen im operierten (schwarzer Balken) und kontralateralen (weißer Balken) Fazialiskern am Tag 14 nach Axotomie. Die Zahlen entsprechen dem Mittelwert +/- dem SEM aus jeweils 3 C57Bl/6 Tieren (2 je 20 µm-dicke Schnitte pro Tier).

A gibt die Dosis-Wirkungskurve für den Bereich zwischen 0,001 und 3 mg wieder. Die Einwanderung von Granulozyten ist ab einer Dosis von 1mg deutlich zu sehen.

B zeigt den zeitlichen Ablauf nach Applikation von 1 mg LPS. Der Beginn der Rekrutierung ist ab 12 Stunden zu sehen. Dieser Anstieg von Peroxidase-positiven Granulozyten im Fazialiskern erreicht nach 24 Stunden ein Plateau auf dem er bis 96 Stunden verbleibt.

* * * indizieren einen im ANOVA ($p < 0,002$) und anschließenden Duncan-multiple-range Test ($p < 0,05$) statistisch signifikanten Unterschied zu unbehandelten Kontrollen (A: 0 mg LPS, B: 0 h).

“ o ” indizieren einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen der axotomierten und normalen Seite (gepaarter t-Test; $p < 0,05$).

3.5.2.3 Einfluß des genetischen Hintergrundes

Um zu überprüfen ob es sich bei dem Einstrom Peroxidase-positiver Zellen nach LPS Gabe um ein für Mäuse allgemeingültiges Phänomen handelt, wurden die Versuche an fünf Mausstämmen wiederholt. Dabei wurden 7 C57Bl/6, 5 FVB, und jeweils 3 SJL, C3H/N und Balb/c Tiere untersucht. Bei keinem dieser Stämme waren Peroxidase-positive Zellen in den unbehandelten Kontrollen zu sehen. Alle zeigten jedoch ein Auftreten dieser Zellen nach LPS-Behandlung (Abbildung 30). Dabei konnte man deutlich 2 Gruppen unterscheiden. Balb/c, C3H/N, FVB und C57Bl/6 zeigten einen ausgeprägten Influx an anfärbaren Zellen. Durchschnittlich waren es 21 - 43 Zellen pro Schnitt auf der unoperierten und 64 - 88 auf der verletzten Seite. In SJL Mäusen hingegen war der Effekt, mit 5,5 Zellen im intakten, und 2,8 Zellen im axotomierten Fazialiskern, um eine Zehnerpotenz niedriger.

Da die Axotomie eines Nervus facialis auch zu Veränderungen im kontralateralen Kerngebiet führen kann, wurden zusätzlich 4 unoperierte C57Bl/6 Mäuse mit 4x 0,5 mg LPS behandelt. Hier kam es auf der linken Seite zu einem Influx von $77,9 \pm 4,2$ (Mittelwert \pm SEM) Peroxidase+ Zellen in das Fazialisareal, auf der rechten Seite von $76,1 \pm 10,2$. Es zeigte sich im t-Test kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Seiten.

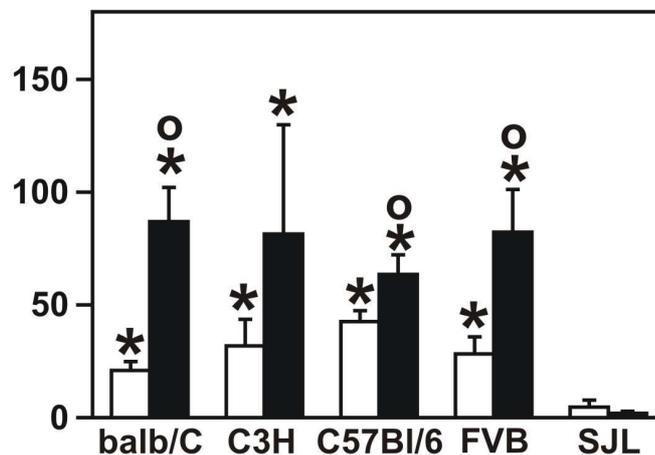


Abbildung 30: Quantifizierung Peroxidase-positiver Zellen (Mittelwert \pm SEM) im axotomierten (schwarzer Balken) und normalen (weißer Balken) Fazialiskern in 5 verschiedenen Mausstämmen.

Für balb/c, C3H und SJL wurden jeweils 3, für FVB 5 und für C57Bl/6 je 7 Tiere eingesetzt. Alle Tiere erhielten ab Tag 12 nach Fazialisaxotomie 4x 0,5 mg LPS in 12-stündigen Abständen. Bis auf die SJL-Mäuse zeigen alle Stämme nach LPS-Gabe eine starke Granulozyten-Rekrutierung, die auf der axotomierten Seite sogar noch deutlicher ist.

“ * “ indizieren einen statistisch signifikanten Unterschied zu SJL-Mäusen im einseitigen ANOVA ($p < 0,01$) und anschließendem Duncan-multiple-range Test ($p < 0,05$).

“ o ” indizieren einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen der axotomierten und normalen Seite (gepaarter t-Test; $p < 0,05$).

3.5.3 Zelluläre Identität der einwandernden Zellen

3.5.3.1 Fluoreszenz-Doppelmarkierungen

Um die zelluläre Identität der etwa 7 - 10 µm großen, runden, Peroxidase-positiven Zellen zu klären, wurden immunfluoreszente Doppelfärbungen angefertigt. Dabei wurde die Myeloperoxidase Aktivität über Koppelung mit biotinyliertem Tyramid durch ein Cy3-konjugiertes Avidin visualisiert. Diese Färbung wurde mit verschiedenen Zelltypspezifischen Antikörpern kombiniert. Dazu zählten 7/4, ein Granulozytenmarker, CD11b (αM-Integrin-Untereinheit) als Monozyten / Granulozytenmarker, CD3 zur Darstellung von T-Zellen und IBA1, ein spezifischer Mikroglia marker. Wie in Abbildung 31 zu sehen ist, zeigte sich eine Kolokalisation der Fluoreszenzen mit 7/4 und αM, zwei auf Granulozyten vorkommenden Antigenen. Reine Mikroglia- (IBA1) oder T-Zellmarker (CD3) kolokalisierten nicht. Es scheint allerdings, als würden sich die Granulozyten eng an Mikroglia und T-Zellen lagern.

3.5.3.2 Markierung hämatogener Zellen

Um den hämatogenen Ursprung der Zellen zu sichern, wurden in einigen Tieren die zirkulierenden Leukozyten durch subkutane Injektion von Rhodamine-B-isothiocyanat (RITC) 48h vor der ersten LPS Gabe fluoreszenz-markiert. Bei dieser Methode färben sich insbesondere Monozyten und Granulozyten an (Ling and Wong, 1993), während Lymphozyten weitgehend unbetroffen bleiben (Jones et al., 2000). Abbildung 31 Mitte rechts zeigt die Doppelfärbung von RITC und endogener Peroxidase auf den eingewanderten Zellen. Eine Kolokalisation von RITC mit IBA1 positiven Zellen konnte in dieser Studie nicht gezeigt werden (Abbildung 31 unten rechts).

3.5.3.3 Ultrastrukturelle Analyse

Es wurden zudem elektronenmikroskopische Bilder der nach LPS-Gabe einwandernden Zellen angefertigt. Diese zeigen eine polymorphe Kernstruktur und kleine bis mittelgroße Peroxidase-positive Vesikel. Beides deutet darauf hin, daß es sich hier um Neutrophile Granulozyten handelt. Wie in Abbildung 32 gezeigt, haften sich diese Zellen dem Endothel der Hirngefäße an, durchwandern die Gefäßwand und Basalmembran und bilden im Parenchym mittelgroße Aggregate. An diese Aggregate lagern sich zum Teil Lymphozyten und residente Mikroglia an. Zwischen

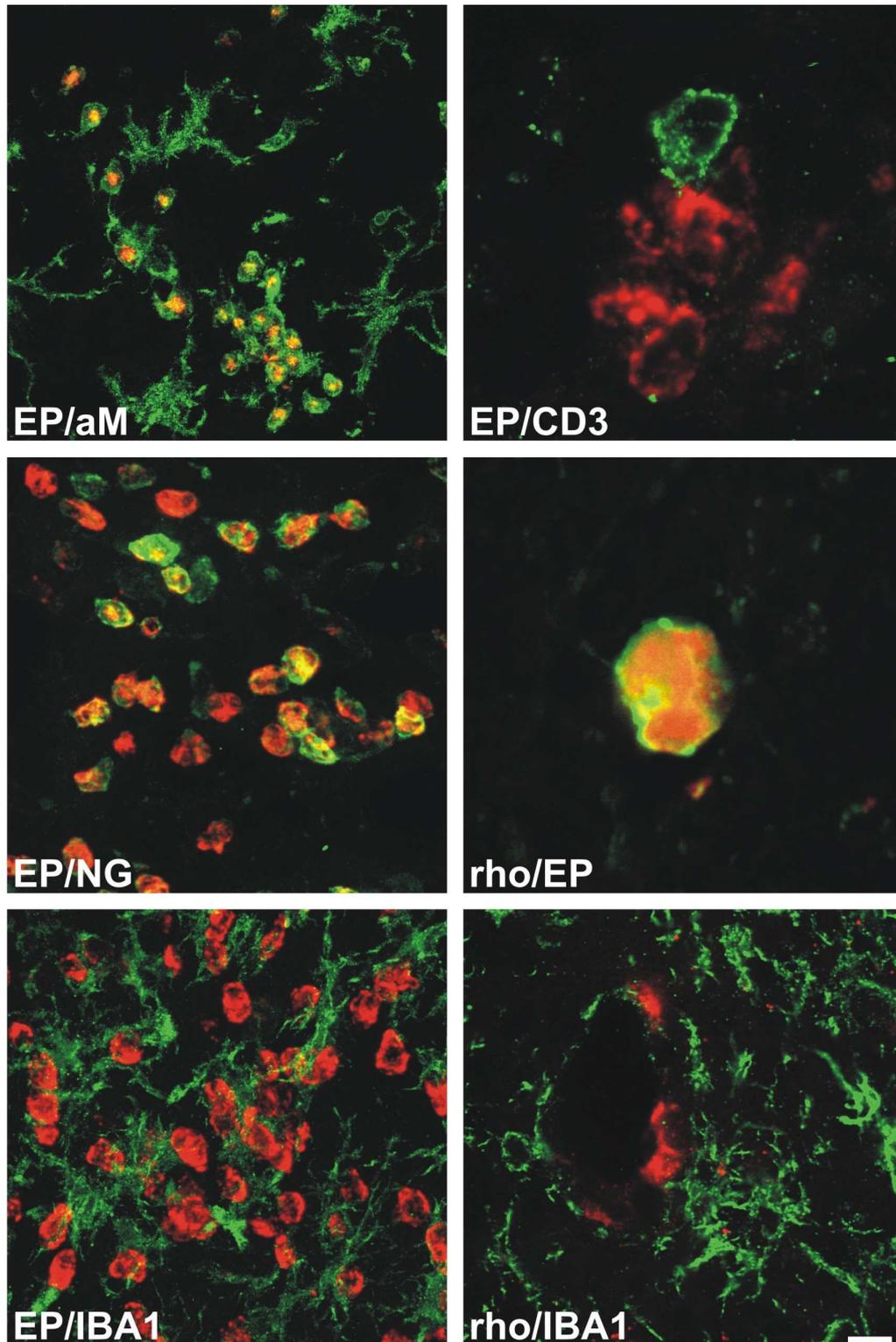


Abbildung 31: Immunfluoreszente Doppelmarkierungen zur Aufklärung der zellulären Identität der einwandernden Peroxidase-positiven Zellen. **Linke Seite & Oben rechts:** Die Endogene Peroxidase (EP) ist Texas Red markiert (rot), grün dargestellt sind die mit FITC visualisierten Primärantikörper gegen alpha M-Integrin (aM), Neutrophile-Granulocyte-Antigen 7/4 (NG), dem Monozyten-Mikroglia Marker IBA1 und Cd3, dem Marker für T-Lymphozyten. Die Kolokalisation von EP und aM bzw. NG erscheint als gelbe Farbe. Es gibt keine Kolokalisation mit CD3 oder IBA1.

Rechte Seite Mitte & Unten: periphere Blutzellen wurden mit Rhodamin-B-isothiocyanat (rot) vor LPS Gabe markiert. Grün dargestellt sind EP und IBA1. Man beachte die Kolokalisation von EP und Rhodamin auf den eingewanderten Zellen. Es zeigt sich hingegen keine Doppelmarkierung mit IBA1.

Die Skalierung entspricht 100 μm im EP/aM, EP/NG, EP/IBA1 und rho/IBA1 Bild bzw. 40 μm im EP/CD3 und 25 μm im rho/EP Bild.

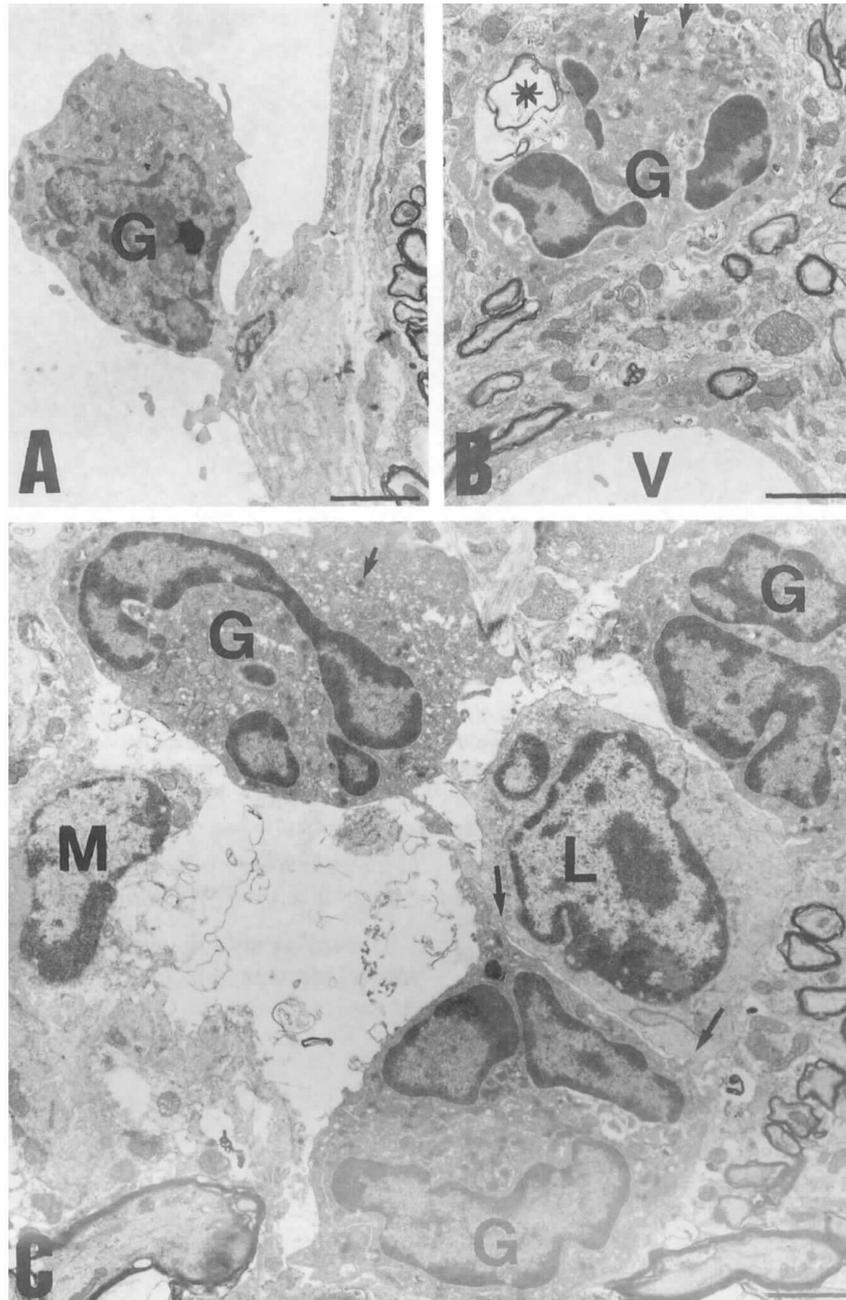


Abbildung 32: Elektronenmikroskopie der Peroxidase-positiven Granulozyten.

Abbildung **A** zeigt einen polymorphkernigen Granulozyten(G), der an der luminalen Seite eines Blutgefäßes adhärirt. Dies ist einer der ersten Schritte bei der Durchwanderung der Gefäßwand. In **B** ist ein einzelner Granulozyt der sich an Myelin-Debris (*) angelagert hat zu sehen. Mit V ist ein naheliegendes Gefäß bezeichnet. Die Pfeile zeigen auf einzelne, etwa 150 - 250 nm große Peroxidase-positive Granula. **C** zeigt ein Aggregat aus drei peroxidase-positiven Granulozyten, einer Mikroglia-Zelle (m) und einem Lymphozyt (L). Man beachte die enge Verzahnung der Granulozyten- und Lymphozytenmembran (lange Pfeile). Die Skalierung entspricht jeweils 1µm.

den Neutrophilen Granulozyten und den Lymphozyten bestand in einzelnen Fällen ausgedehnter Membrankontakt.

3.5.4 Expression von ICAM-1 nach LPS Stimulation

Da LPS ist nicht nur ein Induktor von proinflammatorischen Zytokinen, sondern auch von Zelloberflächenmolekülen ist (Xu et al., 1994; Rieckmann et al., 1995; Essani et al., 1996; Bannerman and Goldblum, 1999; Wagner and Roth, 1999; Jones et al., 2000), stellte sich die Frage ob dies der Mechanismus, der der verstärkten Granulozyteneinwanderung zugrunde liegt, ist. Zur näheren Charakterisierung wurde initial die ICAM-1 Immunreaktivität im axotomierten Fazialiskern nach zusätzlicher LPS-Stimulation untersucht. Wie in Abbildung 33 dargestellt, zeigt sich nach LPS Gabe eine sehr deutliche Zunahme der ICAM-1 Immunreaktivität auf mittleren und kleinen Blutgefäßen. Im axotomierten Kerngebiet kommt es zusätzlich zu einer stärkeren parenchymalen Färbung.

3.5.5 Einfluß von ICAM-1-Defizienz auf LPS-vermittelte Granulozyteninvasion

Um die biologische Relevanz des erhöhten ICAM-1 IR zu überprüfen, wurden jeweils 7 ICAM-1^{-/-} und ICAM-1^{+/+} Geschwistertiere aus heterozygoter Zucht mit LPS behandelt und die Anzahl der einwandernden Granulozyten bestimmt. Sowohl in den Wildtyp- als auch in den transgenen Tieren kam es zu einem Einstrom neutrophiler Granulozyten, wobei der Effekt in beiden Fällen auf der axotomierten Seite deutlicher war (Abbildung 33B; $p < 0,003$ im gepaarten t-Test). Die absoluten Granulozytenzahlen waren aber in den KO-Tieren sowohl auf der operierten als auch der kontralateralen Seite um etwa die Hälfte niedriger. Der Effekt war mit einem $p < 0,01$ im gepaarten t-Test statistisch signifikant.

Tabelle 8: Granulozytenzahlen in ICAM-1- defizienten Tieren

	Anzahl der Tiere	Granulozytenzahl Kontroll – Seite Mittelwert ± SEM	Granulozytenzahl Axotomierte Seite Mittelwert ± SEM
ICAM-1 +/+	7	43,50 ± 4,85	64,43 ± 8,66
ICAM-1 -/-	7	20,64 ± 5,44	31,14 ± 5,50

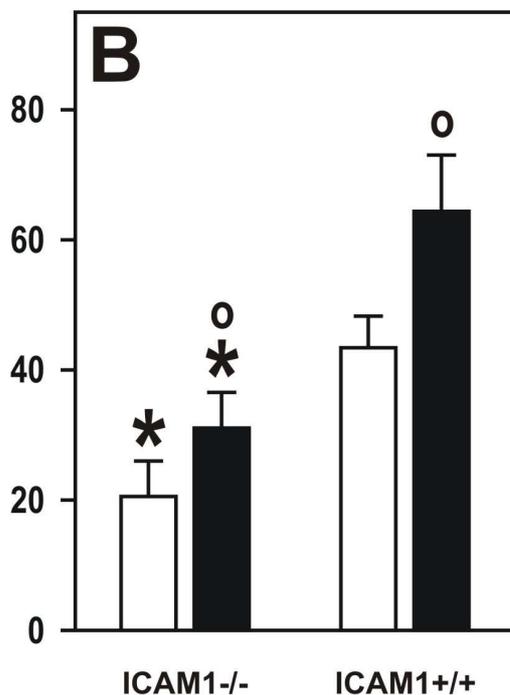
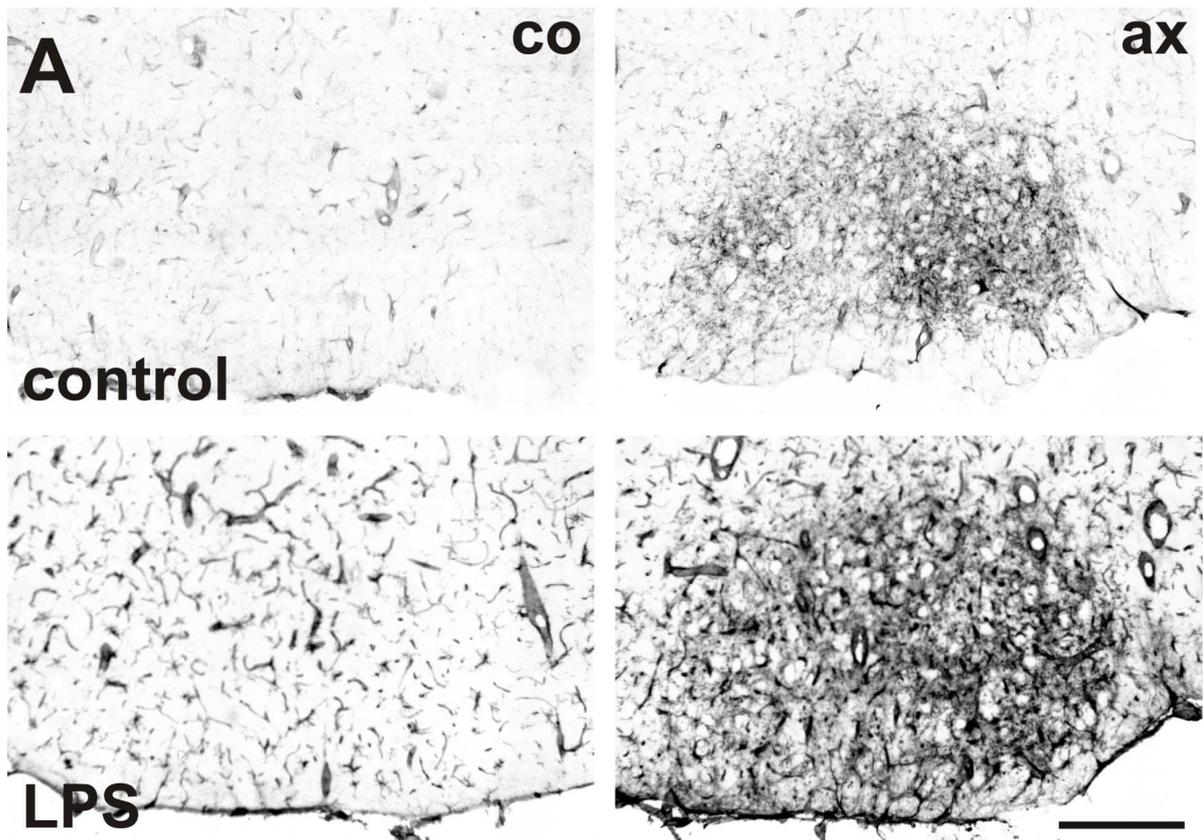


Abbildung 33: (A) ICAM-1 Immunreaktivität 48h nach Injektion von 4x 0,5 mg LPS bzw. Kochsalzlösung (control) im axotomierten (ax) und kontralateralen (co) Fazialiskern 14d nach Transektion. Die Kontrolltiere zeigen mäßige bis mittelgradige IR auf mittleren und großen Gefäßen und moderate parenchymale Färbung auf der verletzten Seite. Die Gabe von LPS führt zu einer deutlichen Zunahme der parenchymalen Färbung auf der axotomierten Seite und einer sehr starken Markierung aller Gefäße im gesamten Hirnstamm. Die Skalierung entspricht 0,2 mm.

(B) Effekt der ICAM-1 Defizienz auf die LPS-vermittelte Rekrutierung EP+ Granulozyten in den axotomierten (schwarz) und normalen (weiß) Ncl. facialis. ICAM1^{-/-} (n=7) und ICAM1^{+/+} (n=7) Geschwistertiere erhielten ab Tag 12 nach der Operation jeweils 4x 0,5 mg LPS. Die Zahlen entsprechen dem Mittelwert +/-SEM der im Fazialisareal gezählten EP+ Zellen. Das Fehlen von ICAM-1 führt sowohl auf der axotomierten, als auch der normalen Seite zu einer um 50% verminderten Granulozyten-Rekrutierung.

“*” indizieren einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den ICAM1^{+/+} und ^{-/-} Tieren (ungepaarter t-Test; p < 0,01). “O” indizieren einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen der axotomierten und normalen Seite (gepaarter t-Test; p < 0,003).

4. Diskussion

4.1 Gründe für die Verwendung Zytokin-Rezeptor defizienter Mäuse

Ziel der vorliegenden Studie war es, die molekularen Mechanismen der um Tag 14 nach peripherer Fazialisaxotomie im ZNS auftretenden späten Entzündungsreaktion näher zu charakterisieren und den Einfluß verschiedener proinflammatorischer Zytokine zu prüfen. Die Ergebnisse basieren vor allem auf immunhistologischen Untersuchungen des Hirngewebes transgener Mäuse und ihrer entsprechenden Wildtyp-Kontrollen.

Abgesehen von den Tieren mit Severe Combined Immunodeficiency (SCID), waren alle anderen eingesetzten Mäuse homozygot defizient für verschiedene entzündungsfördernde Zytokine. Hierzu zählten Null-Mutanten für den Interleukin 1 Rezeptor 1 (IL1R1), Interferon gamma Rezeptor (IFN γ R), Tumor Necrosis Factor alpha Rezeptor 1 (TNFR1), Tumor Necrosis Factor Rezeptor 2 (TNFR2) beziehungsweise kombinierte Defizienz für Tumor Necrosis Factor Rezeptor 1 und Rezeptor 2 (TNFR1&2).

Die Entscheidung, statt Zytokin-defizienter Mäusestämme Tiere zu verwenden, denen die entsprechenden Zytokin-Rezeptoren fehlen, wurde auf Grund des geringeren Potentials für funktionelle Redundanz getroffen. So kann sowohl Interleukin 1 α als auch Interleukin 1 β den Hauptrezeptor für Interleukin 1 aktivieren (Alheim and Bartfai, 1998) (Labow et al., 1997). Im Falle von Zerebraler Ischämie, führt aber nur die kombinierte Ausschaltung von IL1 α und IL1 β zu einem gewebeprotectiven Effekt (Boutin et al., 2001). Ähnlich verhält es sich mit den TNF-Rezeptoren. Sowohl TNF α als auch Lymphotoxin α (LT α) können hier zu einer Rezeptoraktivierung und zum Anstoßen der intrazellulären Signaltransduktionskaskade führen (Ware et al., 1995). In beiden Fällen gibt es also zumindest zwei biologisch verwandte und funktionell sehr ähnlich Zytokine die unabhängig voneinander die gleichen Signalwege initiieren können. Die Gefahr einen biologischen Effekt, der durch einen spezifischen Rezeptor vermittelt wird, auf Grund parallel existierender, redundanter Zytokine zu übersehen ist scheint somit nach Deletion des Rezeptors selbst geringer zu sein.

4.2 Der Einfluß proinflammatorischer Zytokine auf das neuronale Überleben nach Fazialisaxotomie

Wie bereits beschrieben, kommt es nach Verletzungen des Nervensystems zu neuro-glialer Aktivierung, Einwanderung peripherer Blutzellen und Synthese inflammationsassoziiierter Zytokine. Ob diese Ereignisse zur Regeneration beitragen (Bruce et al., 1996; Terrado et al., 2000), oder zusätzlich sekundär neuronalen Zelltod verursachen, ist nicht eindeutig geklärt und variiert zwischen verschiedenen Versuchs-Modellen (Banati et al., 1993; Bethea et al., 1999; Krieglstein et al., 2000; Boutin et al., 2001). Da, im Gegensatz zu vielen anderen Tier-Modellen, im Fall der peripheren Fazialisaxotomie die Blut-Hirn-Schranke intakt bleibt, ist davon auszugehen, daß die den neuronalen Zelluntergang fördernden Faktoren von ortsansässigen Zellen oder den eingewanderten Lymphozyten produziert werden. Das Zytokin-Expressionsmuster neuroglialer Zellen im axotomierten Fazialiskern ist in seinem Zeitverlauf bereits gut charakterisiert (Raivich et al., 1999a) und die vorliegende Studie konzentriert sich darauf den Einfluß der zeitgleich mit dem Maximum an neuronalen Zelltod ansteigenden, entzündungsfördernden Zytokine Interferon gamma, Interleukin 1 und Tumor Necrosis Factor alpha zu charakterisieren.

4.2.1 Reduktion phagozytotischer Knötchen in TNFR1&2 defizienten Tieren

Das Auftreten von zellulärem Debris, der beim Untergang von Motoneuronen in großen Mengen anfällt, führt *in vivo* zum Erscheinen von phagozytotischen Mikroglia-Knötchen. Bei der Umwandlung vom ruhenden zum phagozytierenden Phänotyp, verliert die Mikroglia ihre ramifizierte Morphologie und nimmt eine runde, Makrophagen-ähnliche Form an. Gleichzeitig beginnen die Zellen eine Vielzahl phagozytotischer Marker wie MHC1, B7-2 oder $\alpha\beta 2$ (Bohatschek, 1998; Kloss et al., 1999) zu exprimieren.

In vitro Versuche mit primären mikroglialen Zellkulturen zeigen, daß die Transformation von der ramifizierten in die phagozytierende Form ein relativ langsamer, sich über etwa 24-Stunden erstreckender Prozeß ist (Bohatschek et al.,

2001). Die Umwandlung zurück in ruhende ramifizierte Mikroglia ist ein ebenso träger Vorgang, der zudem nur nach kompletter Entfernung jeglichen Zelldebris möglich ist. Die Langsamkeit der Transformation und die Tatsache, daß der phagozytierende Phänotyp wahrscheinlich erst nach vollständiger Abräumung der toten Neurone verschwindet, ist vermutlich der Grund warum über einen relativ langen Zeitraum zwischen Tag 14 und 21 eine große Zahl mikroglialer Knötchen zu sehen sind.

Im Rahmen der Untersuchung wurde die Zahl $\alpha\text{X}\beta\text{2+}/\text{IBA1}$ -positiver Mikroglia-Knötchen 14 Tage nach Fazialisaxotomie in transgenen Tieren und ihren entsprechenden Kontrollen bestimmt. Dabei zeigte sich in allen Einzel-Rezeptor defizienten Mäusen die zu erwartende Umwandlung in phagozytische Mikroglia und ein Erscheinen der Knötchen. In den TNFR1 $\&2$ -/- Tieren hingegen war die praktisch vollständige Abwesenheit $\alpha\text{X}\beta\text{2+}/\text{IBA1}$ -positiver Mikroglia-Knötchen ins Auge fallend. Dieser Effekt war auch 21 und 29 Tage nach Fazialisaxotomie zu sehen.

Wie sich im folgenden zeigte, korreliert die Anzahl phagozytotischer Knötchen sehr gut mit dem neuronalen Überleben in den entsprechenden Mäusestämmen. Die Bestimmung $\alpha\text{X}\beta\text{2+}/\text{IBA1}$ -positiver Mikroglia-Aggregate kann so als schnelle und reproduzierbare Screening-Methode zur Abschätzung eines Effekts auf neuronales Sterben verwendet werden, ehe man sich an die extrem aufwendige Zählung der überlebenden Motoneurone macht.

4.2.2 Deletion einzelner Zytokin-Rezeptoren hat keinen Einfluß auf neuronales Überleben

Wie sich bereits bei der Färbung mit $\alpha\text{X}\beta\text{2}/\text{IBA1}$ am Tag 14 abzeichnete, hat die Deletion von sowohl IL1R1 als auch IFN γ R1, TNFR1 und TNFR2 keinerlei Effekt auf das neuronale Überleben an Tag 29 nach Axotomie. Dies war überraschend, da alle drei aufgeführten Zytokine verstärkt von aktivierter Mikroglia synthetisiert werden (Buttini and Boddeke, 1995; Hartlage-Rubsamen, Lemke, and Schliebs, 1999) und in anderen Verletzungsmodellen einen Effekt auf neuronales Überleben haben (Rothe et al., 1993; Bruce et al., 1996; Matsuoka et al., 1999; Terrado et al., 2000).

Wenngleich die Ausschaltung einzelner Zytokin-Rezeptoren keinen Einfluß auf den neuronalen Zelltod hatte, so zeigten sich in einzelnen Stämmen jedoch Auswirkungen auf andere zelluläre Reaktion nach Fazialisaxotomie. Wie später im Detail beschrieben, war die Rekrutierung von peripheren Lymphozyten in das

betroffene Kerngebiet in IL1R1^{-/-} und TNFR2^{-/-} Mäusen deutlich vermindert. In TNFR1^{-/-} Tieren war die Bystander-Aktivierung der die mikroglialen Knötchen umgebenden nicht phagozytierenden Mikroglia, signifikant reduziert. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, daß weder die Einwanderung von Lymphozyten, noch die Mikroglia-Aktivierung allein ein ausreichender Stimulus für post-traumatischen neuronalen Zelltod sind.

4.2.3 Deletion von TNFR1&2 wirkt protektiv auf Motoneurone

Ein wesentlicher Befund dieser Studie ist das praktisch vollständige Verschwinden von neuronalem Zelluntergang in den ersten 29 Tagen nach Fazialisaxotomie in Mäusen, die sowohl TNFR1 als auch TNFR2 defizient sind.

Es ist bemerkenswert, daß nur die kombinierte Deletion beider TNF-Rezeptoren einen protektiven Effekt auf axotomierte Motoneurone hat. Die Präsenz von bereits einem der Rezeptoren reicht aus, um die Zelltod-Kaskade in den betroffenen Nervenzellen zu initiieren. Die genauen Mechanismen die letztendlich zum Tod der Neurone führen sind noch nicht vollständig aufgeklärt. Im Fall von TNFR1 wird das Signal aber wahrscheinlich über seine Todesdomäne und subsequente Kaspasenaktivierung vermittelt (Singh, Ni, and Aggarwal, 1998). TNFR2 besitzt jedoch keine solchen Domäne, kann aber wahrscheinlich trotzdem sowohl direkt über Rekrutierung von Adaptormolekülen wie TRAF, als auch indirekt über Ligandenübertragung Apoptose induzieren (Heller et al., 1992; Declercq et al., 1998).

Es ist zu erwähnen, daß in den TNFR1&2^{-/-} Mäusen kein kompensatorisch erhöhter neuronaler Zelltod im Intervall zwischen Tag 29 und 60 zu verzeichnen ist. Dies zeigt, daß Motoneurone die initial durch das Fehlen der TNF-Rezeptoren dem Tod entgehen, kein höheres Risiko haben später auf alternativen Wegen zu sterben.

Auch wenn der Zelltod in den Doppelmutanten nach Fazialisaxotomie drastisch reduziert ist, so kommt es in den ersten 29 Tagen trotzdem zum Absterben einiger Motoneurone. Dies könnte darauf hindeuten, daß nur eine Subpopulation der axotomierten Fazialisneurone TNF-Rezeptor abhängig stirbt und einer auf diese Untergruppe beschränkten Sensitivität für TNF entsprechen. Hierbei ist allerdings zu bedenken, daß hohe TNF α Spiegel im verletzten Nucleus facialis nur kurz um Tag 14 zu detektieren sind (Raivich et al., 1998a). Das Zeitfenster in dem TNF α seine pro-degenerative Wirkung entfalten kann, ist also relativ limitiert und es wäre

denkbar, daß bei einer länger bestehenden hohen TNF-Exposition potenziell mehr Neurone sterben würden. Eine Methode diese Theorie zu testen und sowohl den toxischen Effekt des Zytokins auf verletzte Nervenzellen wie die disparate Empfindlichkeit verschiedener neuronaler Subpopulationen besser zu charakterisieren, wäre die Versuche in TNF-überexprimierenden Mäusen zu wiederholen.

Hinweise darauf, daß verschiedene Nervenzellen verschieden auf TNF reagieren, lassen sich auch durch den Vergleich mit anderen ZNS-Verletzungsmodellen finden. So zeigte Deletion von TNFR1, aber nicht TNFR2 in einem Modell für zerebrale Ischämie einen erhöhten Verlust von kortikalen Neuronen (Gary et al., 1998). Ein ähnlicher pro-degenerativer Effekt von TNFR1 wurde in Untersuchungen an der ischämischen Retina gefunden (Fontaine et al., 2002). Hier hatte TNFR2 jedoch einen protektiven Effekt auf das Überleben der Neurone. Der Divergenz zwischen den in der Literatur beschriebenen und den hier gefundenen Effekten liegt aber wahrscheinlich nicht nur eine unterschiedliche Empfindlichkeit der jeweils betroffenen Neuronenpopulation zugrunde. Da es bei den Ischämie-Modellen zu einer Verletzung der Bluthirnschranke und einer damit verbundenen Einwanderung myelomonocytyärer Zellen kommt, könnten auch sekundär-modulierende Effekte für die abweichenden Ergebnisse verantwortlich sein. Ähnliche widersprüchliche Befunde zwischen Ischämie und Fazialisaxotomie haben sich auch in früheren Untersuchungen zu MCSF, IL6 und IL1 gezeigt. Bei Ischämie haben IL6 und MCSF einen protektiven, IL1 hingegen einen toxischen Effekt, wobei Deletion der genannten Zytokine im verletzten Nucleus facialis keine Wirkung zeigt (Berezovskaya, Maysinger, and Fedoroff, 1995; Matsuda et al., 1996; Allan et al., 2000; Penkowa et al., 2000) (Galiano et al., 2001; Kalla et al., 2001).

4.2.4 TNFR1&2 unabhängiger, verzögerter neuronaler Zellverlust

Neben dem in den ersten 29 Tagen nach Fazialisaxotomie dominierenden TNF-Rezeptor abhängigen neuronalen Zelltod, läßt sich zu späteren Zeitpunkten eine zweite Art der neuronalen Zellreduktion abgrenzen. Dieser Prozess beginnt deutlich langsamer und wird erst im zweiten Monat nach Verletzung sichtbar.

Neue Untersuchungen (Fernandes K.J., 2000) deuten darauf hin, daß es sich dabei um einen atrophischen Zellverlust und nicht um Nervenzelltod per se handelt. In den Untersuchungen von Fernandes zeigte sich, daß eine zweite Axotomie zu einem

plötzlichen Ansteigen der Zellgröße führt und der tatsächliche Verlust an Neuronen nur bei etwa 25% liegt.

Die in unseren Experimenten reduzierten Zellzahlen an Tag 60 könnten also ebenfalls auf einem starken Schrumpfen der Zellen beruhen. Die Morphologie der geschrumpften Nervenzellen unterscheidet sich vom typischen Erscheinungsbild der Motoneurone und es kann so zu Erkennungs-Schwierigkeiten beim Zählen kommen.

Diese Beobachtung wird auch durch die im folgenden beschriebene Quantifizierung MHC1+ Mikroglia-Knötchen unterstützt. Dabei zeigte sich, daß verglichen mit dem Maximum an Tag 14, an Tag 29 nur noch 25% und am Tag 60 weniger als 10% der phagozytischen Knötchen zu sehen war. Dies suggeriert, daß in der späten Phase nach Axotomie nur ein geringer Anteil des Zellverlustes auf den durch Mikroglia-Knötchen gekennzeichneten Zelltod zurückgeht.

4.3 Antigen-Präsentation und Leukozyten-Rekrutierung nach Fazialisaxotomie

Die Präsentation von Antigen und Interaktion der Antigen-präsentierenden Zellen mit Leukozyten spielt bei der Immunüberwachung von verletztem Gewebe eine Schlüsselrolle. Im ZNS übernehmen mikrogliale Zellen die Rolle von Makrophagen und bilden das zentrale Bindeglied zum peripheren Immunsystem (Kreutzberg, 1996). Wie vorangegangen beschrieben wandelt sich Mikroglia nach Fazialisaxotomie in seine aktivierte Form um und phagozytiert das anfallende neuronale Zelldebris. Es ist jedoch auch von Interesse, welche Faktoren die Expression von MHC1 und ko-stimulatorischen Molekülen auf Mikroglia beeinflussen, und ihr so ermöglichen vollends die Rolle antigenpräsentierender Zellen zu übernehmen. Zum anderen soll die Regulation der Lymphozyten-Einwanderung in das verletzte Gewebe näher charakterisiert werden.

4.3.1 Expression von MHC1 und B7-2 zeigt einen monophasischen Anstieg und ist auf aktivierte Mikroglia beschränkt

Verstärkte Expression von MHC und B7 ist eine weit verbreitete Reaktion auf die verschiedensten ZNS Pathologien und wird sowohl nach Trauma, Ischämie und Infektionen, sowie in Autoimmunerkrankungen oder Tumoren beschrieben (Streit,

Graeber, and Kreutzberg, 1989b; Sobel, Tuohy, and Lees, 1991; Morioka, Kalehua, and Streit, 1992; Finsen et al., 1993; De Simone et al., 1995; Deckert-Schluter et al., 1996; Tran et al., 1998; Wintterle et al., 2003; Rutkowski et al., 2004). Welche der im Zentralen Nervensystem präsenten Zellreihen Expression von MHC1 und B7 zeigen, hängt von der untersuchten Tierart sowie der Art des Stimulus ab.

Im unverletzten murinen Hirnstamm läßt sich keine Immunreaktivität für MHC1 nachweisen und auch die Expression von B7-2 ist äußerst gering und nur durch Quantifizierung mit dem RISC-Algorithmus zu demonstrieren. Nach Fazialisaxotomie kommt es zu einem monophasischen Anstieg der MHC1- und B7-2-Immunreaktivität im verletzten Kerngebiet mit maximaler Expression um Tag 14. Die Immunreaktivität beschränkt sich sowohl für MHC1 als auch B7-2 ausschließlich auf die Zelloberfläche aktivierter Mikroglia. Besonders intensive Färbung findet sich für beide Moleküle auf phagozytotischen Zellen, die sich um neuronalen Zelldebris zu mikroglialen Knötchen zusammengelagern. Die rein mikrogliale Lokalisation wurde durch immun-elektronenmikroskopische Analyse und Fluoreszenz-Doppelmarkierung mit mikroglialen Zellmarkern bestätigt. Dies bekräftigt ähnliche frühere Ergebnisse, bei denen nach peripherer Nervenläsion die Expression von MHC1 ebenfalls nur auf Mikroglia, nicht aber auf Neuronen oder Astrozyten detektiert werden konnte (Streit, Graeber, and Kreutzberg, 1989a). Die Hochregulation von MHC1 auf Gefäßendothel scheint auf floride Immunreaktionen bei ZNS-Infektionen oder Autoimmunerkrankungen beschränkt zu sein (Deckert-Schluter et al., 1999) und wurde in diesem Modell nicht gesehen.

Expression von MHC2 ist im unverletzten Hirnstamm der Maus nur auf perivaskulären Makrophagen zu finden. Nach Fazialisaxotomie nimmt zwar die Zahl MHC2-positiver perivaskuläre Makrophagen zu, aber auf neuro-glialen Zellen ist keine MHC2 Immunreaktivität nachzuweisen (Liu et al., 2005).

Trotz mehrfacher intensiver Versuche mit verschiedenen Antikörpern gelang es in unserem Modell nicht B7-1 Immunreaktivität zu detektieren. Mikrogliale Expression von B7-1 ist bei Infektionen und Autoimmunprozessen beschrieben (Issazadeh et al., 1998; Olson, Girvin, and Miller, 2001). Nach enterohinaler Deafferenzierung des Hippocampus und peripheren Verletzungen spinaler Nerven wird aber, ähnlich wie nach Fazialisaxotomie, nur ein Anstieg von B7-2, jedoch nicht von B7-1 beschrieben (Bechmann et al., 2001; Rutkowski et al., 2004).

4.3.2 MHC1 und B7-2 Expression in Zytokin-Rezeptor defizienten Mäusen

Sowohl für die Immunreaktivität von MHC1 als auch B7-2 nach Fazialisaxotomie, lassen sich zwei distinkte Färbemuster unterscheiden: Zum einen ist eine extrem starke Expression auf phagozytierenden mikroglialen Knötchen zu sehen, zum anderen kommt es zu einem moderaten Anstieg der Immunreaktivität auf aktivierter, aber nicht phagozytierender, Mikroglia. Obwohl der Zeitverlauf beider Phänomene sehr ähnlich ist, deuten die Versuche in Zytokin-Rezeptor defizienten Tieren auf eine unterschiedliche Regulation hin. Ähnliche Abweichungen ergeben sich, trotz gleicher Kinetik und Verteilungsmuster, auch für die Regulation von MHC1 und B7-2.

Ausschaltung von INF γ -Rezeptor führt weder zu einer Reduktion des MHC1- noch des B7-2-Anstiegs an Tag 14 nach peripherer Fazialisaxotomie. Dies ist überraschend, da Interferon γ im axotomierten Fazialiskern hoch exprimiert wird (Raivich et al., 1998a) und *in vivo* und *in vitro* ein starker Stimulator der Antigen-Präsentation ist (Hunt and Wood, 1986; Klar and Hammerling, 1989).

Deletion von ILR1 und TNFR2 hat keinen Effekt auf MHC1 Immunreaktivität, führt jedoch zu einer verminderten der B7-2 Expression auf der verletzten Seite. Hingegen ist in Mäusen die defizient für TNFR1 oder TNFR1&2 sind, sowohl die diffuse MHC1-Immunreaktivität als auch B7-2 Expression statistisch signifikant reduziert.

Im Gegensatz dazu verursacht nur die kombinierte Deletion von TNFR1 und TNFR2 eine deutliche Abnahme von MHC1 und B7-2-positiven mikroglialen Knötchen.

4.3.3 MHC1 und B7-2 Expression auf phagozytierender Mikroglia

Wie unter 4.2 beschrieben ist das Erscheinen phagozytotischer Mikroglia-Knötchen eng mit dem Auftreten von neuronalem Zelltod assoziiert (Torvik and Skjorten, 1971; Serpe, Sanders, and Jones, 2000). Es ist daher zu überlegen, ob das fast vollständige Verschwinden MHC1- und B7-2-positiver Mikroglia-Aggregate in TNFR1&2 defizienten Mäusen Resultat eines primärerem, über die TNF-Rezeptoren vermittelte Effektes, oder sekundäre Folge des in diesen Tieren drastisch reduzierten neuronalem Todes ist.

Viele Indizien sprechen dafür, daß die Reduktion MHC1 und B7-2-positiver Knötchen nicht auf einem fehlenden TNF-Effekt, sondern auf verringerter

Phagozytose beruht. In TNFR1&2-/- Mäusen kommt es aufgrund des besseren Überlebens der Motoneurone zu einem verminderten Auftreten von Zellschrott. Da neuronales Debris die Transformation aktivierter Mikroglia in phagozytotische Zellen und deren Gruppierung um die tote Nervenzelle induziert, kommt es in TNFR1&2 defizienten Mäusen zu einer verminderten Formation von Mikroglia-Knötchen.

Das Verschwinden der MHC1 und B7-2 positiven Strukturen im verletzten Fazialiskern TNFR1&2-/- Tiere beruht also auf einer generellen Reduktion phagozytotischer Knötchen und nicht auf einer verminderten MHC1 bzw. B7-2 Immunreaktivität auf den einzelnen Mikroglia-Aggregaten. Bestätigt wird dieser Befund dadurch, daß sich auch mit anderen mikroglialen Phagozytose-Markern wie $\alpha X\beta 2$ nur vereinzelt Knötchen detektieren lassen und daß die einzelnen erkennbaren phagozytotischen Knötchen normal starke MHC1 und B7-2 Immunreaktivität aufweisen.

Phagozytose veranlasst über eine Aktivierung verschiedener Signalkaskaden die, unter anderem über cAMP, NO, Phosphatidylserin und Kalzium vermittelt werden, also nicht nur die Transformation von ruhender Mikroglia in amöboide Makrophagen, sondern modifiziert auch die Expression Antigen-präsentierender und Ko-stimulatorischer Moleküle (Chang, Barbaro, and Pieper, 2000; Kopec and Carroll, 2000; Chan, Magnus, and Gold, 2001; Kalla et al., 2003). Welche intrazellulären Signalwege die verstärkte MHC1 und B7-2 Immunreaktivität auf phagozytischer Mikroglia vermitteln ist jedoch noch ungeklärt und bedarf weiterer Untersuchungen.

4.3.4 MHC1 und B7-2 Expression im Rahmen der Umgebungsreaktion

Neben der sehr intensiven B7-2- und MHC1-Immunreaktivität auf phagozytierenden Knötchen findet sich um die Aggregate ein Halo moderater MHC1 und B7-2 Induktion. Die Ausbreitung entspricht dem Verteilungsgebiet der „bystander“-Aktivierung, einer etwa 100 μ m weiten Region in der die Mikroglia zwar aktiviert, aber nicht in ihre phagozytotische Form umgewandelt ist. Der Anstieg der diffusen MHC1 und B7-2 Immunreaktivität erreicht, ebenso wie die Zahl phagozytotischer Knötchen, um Tag 14 ihr Maximum. Mit wachsender Distanz zum Zentrum nimmt die Immunreaktivität für MHC1 und B7-2 progredient ab, wobei die Ausdehnung der

Areale mit gesteigerter B7-2 Expression grundsätzlich etwas kleiner ist die für MHC1.

Es gibt mehrere Faktoren die den Anstieg der diffusen MHC1 und B7-2 Immunreaktivität in axotomierten Nucleus facialis beeinflussen könnten. So zeigen die nach dem Trauma in das Kerngebiet einwandernden Lymphozyten nicht nur eine ähnliche Kinetik, sondern auch eine vergleichbare konzentrische Anordnung rings um die Mikroglia-Knötchen. Da aktivierte Lymphozyten eine Plethora proinflammatorischer Faktoren sezernieren, wurde oft darüber spekuliert, ob sie zur Aktivierung der Mikroglia beitragen. Die Tatsache, daß die Formierung phagozytotischer Knötchen wie auch die Umgebungsreaktion und MHC1 Expression, in B- und T-Zell-defizienten SCID Mäusen nach Fazialisaxotomie dem gleichen Muster folgt wie in den Wildtyp-Tieren, spricht allerdings gegen diese These. Das zeitgleiche Auftreten von Lymphozyten und Antigen-präsentierenden Molekülen scheint in unserem Verletzungsmodell ein unidirektionaler Prozeß von Mikroglia Richtung Lymphozyten zu sein.

Alternativ läßt die zentrifugal abnehmende Immunreaktivität für MHC1 und B7-2 an einen löslichen Faktor denken, der vom mikroglialen Knötchen in das umgebende Parenchym abgegeben wird und zu dem Phänomen der Bystander-Aktivierung führt. Ein Hinweis auf den entzündungsfördernden Effekt, den phagozytotische Mikroglia auf die umliegenden mikroglialen Zellen hat, könnte die deutliche Abnahme der diffusen MHC1 und B7-2 Immunreaktivität in TNFR1&2-defizienten Tieren sein. Bereits im normalen Gehirn produziert Mikroglia eine Vielzahl entzündungsassoziierter Zytokine wie IL1 β , IL10, IL12, IL15, TGF β und TNF α . Nach Aktivierung wird deren Herstellung noch gesteigert (Kiefer et al., 1995; Renno et al., 1995; Deckert-Schluter et al., 1999) und maximale Synthese korreliert nach Fazialisaxotomie zeitlich mit neuronalem Zelltod und Phagozytose (Raivich et al., 1999a).

Aufschluß darauf, welche Zytokine für die Regulation der diffusen MHC1 und B7-2 Expression eine Rolle spielen, wurde durch Versuche in Zytokin-Rezeptor defizienten Mäusen gewonnen. Im Modell des axotomierten Fazialiskernes führt, neben der kombinierten Ausschaltung von TNFR1&2, auch die alleinige Deletion von TNFR1 zu einer deutlichen Verringerung der MHC1 und B7-2 Immunreaktivität. Dies deutet auf die Schlüsselrolle von TNFR1 und seiner Liganden TNF α und TNF β bei der Induktion von MHC1- und B7-2-Expression im an die Knötchen grenzenden

Gewebe hin. Da die Abwesenheit von TNFR1 weder einen Effekt auf das neuronale Überleben, die Knötchen-Formation oder die Lymphozyten-Einwanderung hat, ist am ehesten von einem direkten Effekt auszugehen. Diese Hypothese muß aber in weiteren Experimenten wie z.B. durch eine Mikroglia-spezifische Deletion von TNFR1 überprüft werden.

Interessanterweise wird die B7-2 Immunreaktivität neben TNFR1^{-/-} und TNFR1&2^{-/-} auch von weiteren Faktoren beeinflusst. So kommt es ebenso in TNFR2 und IL1R1 defizienten Tieren zu einer Reduktion der Expression, während systemische Applikation von LPS die B7-2 Immunreaktivität erhöht. Die Empfindlichkeit gegenüber einem breiteren Spektrum entzündungsfördernder Moleküle könnte auf die bedeutende Rolle, die B7-2 als Modulator der T-Zell Aktivierung, und somit der Immunreaktion im verletzten ZNS hat, hindeuten.

4.3.5 T-Zell Rekrutierung nach Fazialisaxotomie in Zytokin-Rezeptor defizienten Mäusen

Die Einwanderung peripherer Lymphozyten in den axotomierten Fazialiskern verläuft zeitlich gestaffelt in mehreren Schritten. Bereits an Tag 1 nach Axotomie kommt es unter dem Einfluß der früh-exprimierten Zytokine IL6 und MCSF zu einer ersten Rekrutierung CD3-positiver Zellen (Galiano et al., 2001; Kalla et al., 2001). Um Tag 14, zeitgleich mit dem Höhepunkt neuronalen Zelltods und mikroglialer Aktivierung, erreicht der Einstrom von Lymphozyten sein Maximum. Dieser zweite Anstieg ist auch in IL6 und MCSF-defizienten Mäusen zu beobachten, was eine Beteiligung weiterer Faktoren bei Lymphozyten-Rekrutierung nahelegt.

Der Schwerpunkt dieser Studie lag daher auf dem Einfluß der spät-exprimierten Zytokinen Interleukin 1 β , Tumor Necrosis Factor α und Interferon γ . Während in den IFN γ -Rezeptor defizienten Tieren die Leukozyten Einwanderung unverändert war, zeigt sich in IL1R1^{-/-}, TNFR2^{-/-} und TNFR1&2^{-/-} Mäusen eine deutliche Reduktion der CD3 positiven Zellen im axotomierten Kerngebiet an Tag 14, aber ebenso an Tag 7 und 21. Sowohl IL1 β als auch TNF α scheinen also funktionell für die Extravasation von Lymphozyten von Bedeutung zu sein.

Ob diese Effekte direkt über Veränderungen in den Gefäßwänden oder indirekt vermittelt werden ist nicht sicher. *In vitro* induzieren proinflammatorische Zytokine auf Endothelzellen eine Vielzahl von Zell-Adhäsionsmolekülen wie zum Beispiel ICAM1 und VCAM (Tang et al., 1996). Auch *in vivo* verändert sich nach

Fazialisaxotomie auf neuro-vaskulären Zellen das Integrin-Expressionsmuster, wobei sich an Tag 14 insbesondere ein Anstieg von $\alpha 5\beta 1$ zeigt (Kloss et al., 1999) zeigt. Ob es hier quantitative Unterschiede in den Zytokin-defizienten Mäusen gibt und inwiefern die Expression endothelialer Adhäsionsmoleküle relevant für die Rekrutierung von T-Zellen in diesem Modell ist, muß allerdings noch in weiteren Experimenten untersucht werden.

4.3.6 Interaktion zwischen Lymphozyten, Mikroglia und Neuronen

Die Frage nach der Auswirkung von Lymphozyten-Rekrutierung ins verletzte ZNS wird kontrovers diskutiert. Bei spinalen Traumen, Amyotropher Lateralsklerose und Alzheimer Demenz wurde die Einwanderung von T-Zellen für eine Aggravation sekundärer Schäden verantwortlich gemacht (Itagaki, McGeer, and Akiyama, 1988; Engelhardt, Tajti, and Appel, 1993; Popovich, Stokes, and Whitacre, 1996). Neuere Untersuchungen zeigen allerdings, daß Lymphozyten auch neurotrophe Faktoren synthetisieren und weisen auf deren potentiell protektiven Einfluß hin (Schwartz, 2001). So hat zum Beispiel das vollständige Fehlen von CD3-positiven Zellen in SCID-Mäusen keinen Einfluß auf die späte Mikroglia-Aktivierung oder das Entstehen phagozytotischer Knötchen, führt jedoch zu einer Verstärkung des neuronalen Sterbens (Serpe, Sanders, and Jones, 2000).

Im axotomierten Fazialiskern haben sowohl Lymphozyteneinwanderung, als auch neuronaler Zelltod und späte Mikroglia-Aktivierung um den Tag 14 ihr Maximum. Diese enge zeitliche Korrelation macht das Modell für die Analyse der molekularen Aktivierungskaskade nach ZNS-Verletzungen besonders interessant. Es ist bemerkenswert, daß die drei beschriebenen Phänomene nicht notwendigerweise sequentiell ablaufen oder voneinander abhängig sind. So führt Deletion von IL1R1 und TNFR2 zwar zu einer deutlichen Reduktion der Lymphozyten-Rekrutierung und B7-2 Expression, hat aber keinen Effekt auf MHC1 Expression, mikrogliale Aktivierung und neuronalen Zelltod. In TNFR1 defizienten Mäusen hingegen ist sowohl die MHC1 als auch B7-2 Immunreaktivität vermindert. Sie zeigen jedoch normale Leukozyten-Einwanderung und Nervenzelltod.

Dennoch ist davon auszugehen, daß der Interaktion zwischen Lymphozyten, Mikroglia und Neuronen eine zentrale Rolle zukommt. Die in den verletzten Fazialiskern eingewanderten T-Zellen lagern sich entweder um phagozytotische Mikroglia-Knötchen zu kleinen Aggregaten zusammen oder stehen in engem

Kontakt mit aktivierten mikroglialen Zellen in der Umgebung. In keiner der untersuchten Einzel-Rezeptor Mutanten war die Interaktion zwischen Mikroglia und Lymphozyten gestört. Selbst in TNFR1&2 defizienten Mäusen, die praktisch keine Knötchen aufweisen, ist die Tendenz der T-Zellen sich fokal zu gruppieren erkennbar, wenngleich der Kontakt zwischen mikroglialen Zellen und Lymphozyten weniger eng ist. Dies spricht gegen die Vermittlung der Leukozyten-Migration im Hirnparenchym durch ein einzelnes Zytokin wie TNF α oder IL1, und für die Bedeutung weiterer chemotaktischer Moleküle um die Immunzellen zu den relevanten Orten zu locken.

Aktivierte, und insbesondere phagozytierende, Mikroglia, welche nicht nur eine Reihe von Zytokinen und Chemokinen sondern ebenso Zell-Adäsionsmoleküle exprimiert (Raivich, Bluethmann, and Kreutzberg, 1996; Raivich et al., 1999b), spielt dabei sicherlich eine zentrale Rolle. Die Bedeutung, die phagozytotischer Mikroglia im immunologischen Netzwerk des ZNS zukommt wird durch die starke Expression vom MHC1 und ko-stimulatorischen Faktoren wie B7-2 noch unterstrichen. Phagozytierende mikrogliale Zellen besitzen somit die Molekül-Ausstattung um effektiv Antigen an CD4-Zellen zu präsentieren und eine Immunantwort zu induzieren. Für die Modulation der Immunantwort könnte die Beobachtung, daß aktivierte Mikroglia in der Umgebung phagozytotischer Knötchen zwar ebenfalls MHC1, aber geringere Mengen an ko-stimulatorischen Molekülen wie B7-2 und α X β 2 exprimiert sehr bedeutend sein (Bohatschek, 1998; Werner et al., 1998; Kloss et al., 1999). Das Fehlen Ko-Stimulatorischer Faktoren kann zu Anergie oder sogar Apoptose der interagierenden T-Zellen führen (Bretscher and Cohn, 1970; Robey and Allison, 1995). So könnte eventuell das Ausreten potenziell schädlicher, durch Präsentation von Eigen-Antigen induzierter, autoimmunologischer Phänomene eingedämmt werden.

4.4 Effekte von peripher applizierten Lipopolysacchariden im normalen und verletzten Gehirn

4.4.1 Systemische LPS Applikation führt zu Granulozyten-Einwanderung ins ZNS

Die subkutane Injektion von Lipopolysacchariden (LPS) führte in unserem Maus-Modell zu einem starken Einstrom peroxidase-positiver Zellen ins Hirnparenchym. Der Effekt ist dosisabhängig und 12-24 Stunden nach einmaliger Gabe einer Schwellendosis von 1mg LPS nachweisbar. Nach wiederholter Injektion moderater Mengen LPS (0.5mg), ist die Granulozyten-Einwanderung ausgeprägter als nach einmaliger Administration hoher LPS Dosen (1-3mg). Zusätzliche periphere Läsion des Nervus facialis potenziert diesen Effekt im verletzten Kerngebiet.

Bemerkenswert ist die selektive Einwanderung neutrophiler Granulozyten, die sich von dem gemischt myelo-monozytärem Zellbild, daß bei direktem Trauma (Jones et al., 2000) oder intrazerebraler LPS-Injektion (Andersson, Perry, and Gordon, 1992) (Kitamura et al., 1996) (Hartlage-Rubsamen, Lemke, and Schliebs, 1999) beschrieben wird, unterscheidet. Im unverletzten, ausreichend mit Sauerstoff versorgtem Gehirn scheinen die für eine Monozyten-Einwanderung notwendigen Stimuli nicht vorhanden zu sein. Ein ähnliches, überwiegend granulozytäres Rekrutierungsmuster findet sich auch in einem Tier-Modell für bakterielle Meningitis (Gerber et al., 2001) und spricht für die physiologische Relevanz der hier gezeigten Versuche. Die einwandernden, Leukozyten produzieren eine Vielzahl zytotoxischer Substanzen und Proteasen und spielen bei der Bekämpfung von Infektionen eine Schlüsselrolle (Estabrook et al., 1992; Cioffi, Burleson, and Pruitt, 1993; Tunkel and Scheld, 1993; Fulurija, Ashman, and Papadimitriou, 1996).

Obwohl die absoluten Granulozyten-Zahlen zwischen den einzelnen Experimenten z.T. schwankten, war der Effekt an sich gut reproduzierbar. Für vier von fünf getesteten Maus-Stämmen ergaben sich ähnlich hohe Granulozytenwerte, was auf einen gut konservierten, physiologisch bedeutenden Mechanismus hinweist. Die 10-20-fach niedrigere Rekrutierung in Tieren mit SJL-Hintergrund ist ein immunologisch interessantes Phänomen. Studien zeigen, daß dieser Maus-Stamm Schwierigkeiten hat, eine suffiziente Immunantwort gegen Helminthen und Tumore zu produzieren (Kaminsky, Nakamura, and Cudkowicz, 1983; Hutchings, Varey, and Cooke, 1986). Da in allen untersuchten Tieren ein enger Kontakt zwischen den in das verletzte

ZNS rekrutierten T-Zellen und benachbarten Granulozyten-Aggregaten zu sehen ist, könnte man über einen Zusammenhang zwischen den niedrigen Granulozyten-Zahlen und den beobachteten immunologischen Defiziten in SJL-Mäusen, insbesondere unter inflammatorischen Bedingungen, spekulieren.

4.4.2 Mögliche Mechanismen der Granulozyten-Einwanderung nach LPS Stimulation

Welche Mechanismen der Einwanderung von Granulozyten nach LPS-Administration zugrunde liegen ist nicht eindeutig klar. Neben direkten, von LPS-Rezeptoren übertragenen Auswirkungen sind ebenso sekundär über aktivierte Mikroglia, Veränderungen der Blut-Hirn-Schranke oder Beteiligung der Gehirnparenchyms vermittelte Effekte denkbar.

4.4.2.1 Rolle aktivierter Mikroglia

Mikrogliale Zellen exprimieren viele der bekannten Endotoxin-Rezeptoren wie zum Beispiel CD14, α M β 2- und α X β 2-Integrin (Becher, Fedorowicz, and Antel, 1996; Buttini et al., 1997; Kloss et al., 2001). Sie sind zudem in der Lage nach LPS-Stimulation schnell proinflammatorischer Moleküle wie IL1, IL8, IL12, TNF α und MCP1 zu synthetisieren (Van Dam et al., 1995; Becher, Fedorowicz, and Antel, 1996; Buttini et al., 1997; Gourmala et al., 1999) und scheinen so auf den ersten Blick ein potenziell wichtiger Faktor bei der Granulozyten-Rekrutierung zu sein. Vergleicht man allerdings die Kinetik sowie Dosis-Wirkungsbeziehungen von mikroglialer Aktivierung und Einwanderung von Granulozyten nach LPS Gabe, regen sich Zweifel. Die Aktivierung der Mikroglia erfolgt extrem rasch und hat ihren Gipfel nach etwa 3 – 6 Stunden, während deutlich erhöhte Granulozyten-Zahlen erst nach 24 Stunden zu sehen sind. Es sind außerdem nur geringe LPS-Dosen, die in diesem System etwa 75 μ g entsprechen, zur maximalen mikroglialen Aktivierung nötig (Van Dam et al., 1995; Becher, Fedorowicz, and Antel, 1996; Buttini et al., 1997; Gourmala et al., 1999). Somit sprechen sowohl der zeitliche Verlauf, als auch die für den maximalen Effekt nötigen hohen LPS Spiegel, gegen eine tragende Rolle der Mikroglia.

4.4.2.2 Öffnung der Blut-Hirn-Schranke

Durch die periphere Administration von LPS kommt es dosisabhängig zu einer Öffnung der Blut-Hirn-Schranke. In einer Arbeit über die Integrin-Expression nach

LPS Gabe in Mäusen zeigte sich, daß der Grad der Mikroglia-Aktivierung mit der Intaktheit der Blut-Hirnschranke korreliert (Kloss et al., 2001). In Hirnarealen mit durchlässiger Blut-Hirn-Schranke wie der Area postrema, genügte periphere Injektion von 10µg LPS, in allen anderen Arealen 100µg, um Aktivierung der Mikroglia zu induzieren (Kloss et al., 2001). Dies deutet darauf hin, daß die Blut-Hirn-Schranke ab Gabe von 100µg durchlässig wird. Einwanderung von Granulozyten findet sich, sowohl in der Area postrema als auch dem übrigen Hirnstamm, allerdings erst ab Applikation von 1mg LPS. Die Öffnung der Blut-Hirn-Schranke allein ist also nicht ausreichend, um die Granulozyten-Rekrutierung anzustoßen.

4.4.2.3 Einfluß des verletzten und unverletzten Parenchyms

Betrachtet man die Verteilung der Granulozyten im Hirnstamm, fällt im Vergleich zu den Fasertrakten eine selektive Bevorzugung der Grauen Substanz auf. Dies und die Tatsache daß periphere Axotomie die Granulozyten-Rekrutierung in dem betroffenen Kerngebiet verstärkt, sprechen für einen vom Gehirnparenchym ausgehenden Effekt, der die Extravasation zumindest teilweise moduliert und steigert. Es ist wahrscheinlich, daß die Wirkung über eine Veränderung des Expressionsprofiles endothelialer Adäsionsmoleküle läuft. Nach Axotomie kommt es im Nucleus facialis unter anderem zu einer gesteigerten endothelialen Expression von Adhäsionsmolekülen und Einwanderung von Lymphozyten (Raivich, 2002). Fazialisaxotomie allein ist aber kein ausreichender Stimulus für Granulozyten-Rekrutierung. Nach zusätzlicher Gabe von LPS potenzieren sich allerdings die Effekte von Trauma und Endotoxin.

4.4.3 ICAM1-Defizienz reduziert die Granulozyten-Rekrutierung nach LPS Gabe

Periphere Applikation von LPS führt im gesamten Hirnstamm der Maus zu einer verstärkten Expression von Intercellular Adhesion Molecul 1 (ICAM1) auf neurovaskulärem Endothel. Ein besonders deutlicher Anstieg der ICAM-1-Immunreaktivität ist im axotomierten Fazialiskern zu beobachten. Deletion von ICAM-1 führt zu einer signifikanten Abnahme der Granulozyten-Einwanderung. Dies spricht für die funktionelle Relevanz dieses Zelladhäsionsmoleküls.

Da aber auch auf normalen Gefäßendothel leichte Expression von ICAM1 nachweisbar ist und es in den ICAM1-defizienten Mäusen zu einer mäßigen Granulozyten-Rekrutierung kommt, ist davon auszugehen daß weitere Faktoren die Granulozyten Extravasation steuern. Potenzielle Kandidaten dafür sind VCAM-1, E- und P-Selektin, die alle sowohl in vitro als auch in vivo nach LPS-Gabe induziert werden (Gotsch et al., 1994; Rieckmann et al., 1995; Essani et al., 1996; Bannerman and Goldblum, 1999). Diese Moleküle können zu einer verbesserten Haftung von Granulozyten an der Gefäßwand führen und somit der erste Schritt zu Invasion des Gehirnparenchyms sein. In einem sterilen, IFN γ induziertem Meningitis-Modell wurde die meningeale Granulozyten-Infiltration durch Deletion von E- und P-Selektion komplett inhibiert (Tang et al., 1996). In unserem Modell muß diese These allerdings noch überprüft werden.

4.4.4 Indirekte LPS-Wirkung

Administration von LPS führt zusätzlich zu den direkten Effekten zu Veränderungen des zum jeweiligen Zeitpunkt vorherrschenden Zytokin-Profiles der betroffenen Region. Dabei kommt es zum Beispiel zu einem deutlichen Anstieg von IFN γ (Chung, Norris, and Benveniste, 1991). Dies könnte eventuell die molekulare Basis für den verstärkenden Effekt, den eine vorausgegangene Axotomie auf die ICAM-1 Expression und die Granulozyteneinwanderung hat, bilden. Die Expression von IFN γ ist im verletzten Fazialiskern erhöht und erreicht den Maximalwert um Tag 14 (Raivich et al., 1998a). Interessanterweise wirkt LPS aber nicht auf alle an Tag 14 maximalen Reaktionen in gleicher Weise verstärkend, sondern zeigt eine selektive Modulation der verschiedenen parallel stattfindenden Ereignisse. Während sich bei der Granulozyten und Lymphozyten Rekrutierung ein deutlich additiver Effekt zeigt, wird zum Beispiel die sehr starke Expression von MHC1 am Tag 14 im axotomierten Kerngebiet reduziert.

Tabelle 9: Effekte von Axotomie und peripherer LPS-Gabe

	Axotomie	LPS	Axotomie & LPS	
ICAM-1-IR	↑	↑	↑↑	additiv
Granulozyten	↔	↑	↑↑	additiv
Lymphozyten	↑	↑	↑↑	additiv
IBA1-IR (mikroglial)	↑	↑	↑	nicht - additiv
MHC1-IR (mikroglial)	↑↑	↔	↑	gegen-regulatorisch

Unabhängig davon ob IFN γ oder ein anderes Zytokin das Schlüsselmolekül für die kombinierten Effekte von Trauma und Endotoxin ist, ist das grundsätzliche Prinzip der Wirkungsverstärkung und -abschwächung in einem so eng vernetztem Gewebe wie dem ZNS von großem Interesse. Bakterielle Infektionen und Fieber verschlechtern die Prognose bei Schlaganfällen und ZNS-Traumen (Gourmala et al., 1997; Saper, 1998; Matsuoka et al., 1999). Dies kann eine Reihe pathophysiologischer Mechanismen, einschließlich der Produktion zytotoxischer Moleküle durch Mikroglia, der Zerstörung der BHS oder Effekte der einwandernden Leukozyten, zur Ursache haben. Da sich in dem hier verwendeten Tier-Modell die verschiedenen Dosis-abhängigen Effekte von LPS, von leichter mikroglialer Aktivierung bis hin zur Granulozyten Einwanderung graduiert reproduzieren und jeweils hinsichtlich ihres Effekts auf verletztes Gehirnparenchym näher untersuchen lassen können, ist es für die weitere Aufklärung der Interaktion zwischen Endotoxinen und ZNS Trauma ideal geeignet.

5. Zusammenfassung

Nach Verletzung des zentralen Nervensystems kommt es in dem betroffenen Areal nicht nur zu zellulären und molekularen Veränderungen der Neurone, Mikroglia und Astrozyten, sondern ebenso zu einer Interaktion mit dem peripheren Immunsystem. Für die reibungslose Abfolge dieser in wohl-definierten Stufen fortschreitenden Reaktion, ist eine effiziente Kommunikation zwischen den einzelnen Zellarten essentiell. Während die zellulären Veränderungen nach Hirntrauma detailliert bekannt sind, ist das Wissen hinsichtlich der regulierenden Zytokine noch lückenhaft.

Die vorliegende Arbeit untersucht am Modell der peripheren Fazialisaxotomie in der Maus, den Einfluß verschiedener proinflammatorischer Zytokine auf neuronales Überleben, Expression antigen-präsentierender Moleküle durch Mikroglia und Einwanderung peripherer Blutzellen in das ZNS. Dafür wurden immunhistochemische Untersuchungen in Tieren mit deletiertem Interferon gamma Rezeptor Typ 1 (IFN γ R1 $^{-/-}$), Interleukin 1 Rezeptor (IL1R1 $^{-/-}$), Tumor Necrosis Factor Rezeptor Typ 1 (TNFR1 $^{-/-}$), Tumor Necrosis Factor Rezeptor Typ 2 (TNFR2 $^{-/-}$) und Tumor Necrosis Factor Rezeptor Typ 1&2 (TNFR1&2 $^{-/-}$) und den jeweils entsprechenden Wildtypkontrollen durchgeführt.

Nach Durchtrennung der Nervus facialis sterben im betroffenen Kerngebiet etwa 20-30% der Motoneurone. Dieser Untergang von Nervenzellen ist in Mäusen, denen sowohl der Rezeptor Typ 1 als auch Typ 2 für Tumor Necrosis Factor alpha (TNF α) fehlt, fast vollständig aufgehoben. Zudem ist in TNFR1&2 defizienten Tieren kein verzögerter, kompensatorischer Zelluntergang zu späteren Zeitpunkten nachzuweisen. Nach muriner Fazialisaxotomie scheint TNF α ein entscheidender pro-degenerativer Faktor zu sein, wobei protektive Effekte nur nach Ausschaltung beider TNF-Rezeptoren gesehen werden. Interferon gamma (IFN γ) und Interleukin 1 haben keinen Effekt auf neuronales Überleben.

Das nach dem Untergang von Motoneuronen anfallende Debris wird von aktivierten Mikrogliazellen phagozytiert. Die Mikroglia wandelt sich dabei in amöboide Markophagen-ähnliche Zellen um. Während ruhende, ramifizierte Mikroglia praktisch keine antigen-präsentierenden oder ko-stimulatorischen Moleküle exprimiert, kommt es nach Fazialisaxotomie insbesondere um Tag 14 zu einem Anstieg der MHC1 und B7-2 Immunreaktivität. Die Expression ist auf

phagozytotischen Knötchen besonders stark, aber sowohl MHC1 als auch B7-2 sind ebenfalls auf benachbarter, nicht-phagozytotischen Mikroglia nachzuweisen. Deletion von TNFR1&2 und TNFR1 führt zu einer statistisch signifikanten Abnahme der MHC1 und B7-2 Immunreaktivität. In Mäusen, die defizient für TNFR2 und IL1R1 sind, kommt es zu einer Reduktion der B7-2, nicht aber der MHC1, Expression.

Nach indirektem Hirntrauma wandern periphere Lymphozyten durch die intakte Blut-Hirn-Schranke in das verletzte Areal ein und gruppieren sich um phagozytierende oder aktivierte Mikroglia. Maximale Lymphozytenzahlen werden nach Fazialisaxotomie um Tag 14 gesehen. Deletion von TNFR1&2, TNFR2 und IL1R1 führen zu verminderter Rekrutierung peripherer Leukozyten in das betroffene Kerngebiet. Obwohl sowohl neuronaler Zelltod, mikrogliale Aktivierung als auch Einwanderung von Lymphozyten um Tag 14 ihren Höhepunkt erreichen, scheinen sie verschiedenen regulierenden Einflüssen zu unterliegen.

Periphere Applikation von Lipopolysacchariden (LPS) führt zu einer Öffnung der Blut-Hirn-Schranke und Einstrom von neutrophilen Granulozyten in das Zentrale Nervensystem. Bei gleichzeitig bestehendem indirektem Hirntrauma sind additive Effekte auf die Rekrutierung peripherer Leukozyten zu sehen. Die Einwanderung neutrophiler Granulozyten ist zumindest teilweise von der ICAM1-Expression auf neurovaskulärem Endothel abhängig und in Tieren die defizient für Intercellular Adhesion Moleule 1 (ICAM1) sind deutlich reduziert.

Tabelle 10: Zusammenfassung der Effekte in Zytokin-Rezeptor defizienten Mäusen (statistisch signifikante Ergebnisse sind fett gedruckt)

	Neuronaler Zelltod	MHC1	B7-2	Lymphozyten- einwanderung
IFNγR1	\leftrightarrow d29	\leftrightarrow	\leftrightarrow d14	\downarrow d14
IL1R1	\leftrightarrow d29	\leftrightarrow	$\downarrow\downarrow$ d14	$\downarrow\downarrow$ d7 & 14 \downarrow d21
TNFR1	\leftrightarrow d29	$\downarrow\downarrow$ d14	$\downarrow\downarrow$ d14	\leftrightarrow d14
TNFR2	\leftrightarrow d29	\leftrightarrow	$\downarrow\downarrow$ d14	$\downarrow\downarrow$ d7, 14 & 21
TNFR1&2	$\downarrow\downarrow$ d29 & 60	$\downarrow\downarrow$ d14, 21 & 29 Knötchen $\downarrow\downarrow$ d14, 21 & 29	$\downarrow\downarrow$ d14 Knötchen $\downarrow\downarrow$ d14	$\downarrow\downarrow$ d14
SCID		\uparrow d14 Knötchen $\uparrow\uparrow$ d14		
LPS + Ax		$\downarrow\downarrow$ d14	$\uparrow\uparrow$ d14 unverletzte Seite \uparrow d14 verletzter Seite	

6. Abkürzungen und Fremdwörter

%	Prozent
°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
ABC	Vectorstain ABC Kit
AF	Autofluoreszenz
BHS	Blut-Hirn-Schranke
bidest.	bidestilliert
BSA	Rinderalbumin
BT	biotinyliertes Tyramin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CD	Unterscheidungsmerkmal (englisch "cluster of differentiation")
CGRP	Kalzitoningen-verwandtes Protein (englisch "calcitonin gene related peptide")
CR3	Komplement-Rezeptor 3
Da	Dalton
DAB	3,3'-Diaminobenzidin (3,3',4,4'-Tetraaminobiphenyl)
dest.	destilliert
DIFF-RISC	Differenz des Relative Intensity of Stainig Coefficient operiert - normal
DKO	Doppel-knockout Maus
DMSO	Dimethylsulfoxid
EAE	experimentelle Autoimmunenenzephalitis
EZM	extrazelluläre Matrix
FA	Formaldehyd
FI	Färbeintensität
FITC	Fluoreszein-5-Isothiozyanat
FMN	Facial motor nucleus
g	Gramm bzw. Konstante der Erdbeschleunigung
GA	Glutaraldehyd
GFAP	saueres Gliafaserprotein (englisch "glial fibrillary acidic protein")
GMCSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
HEV	hohe, endotheliale Venuolen
HRP	Meerrettichperoxidase (englisch "horse radish peroxidase")
hSA	humanes Serumalbumin
IBA1	ionized Ca-binding adaptor protein 1
ICAM	interzelluläres Adhäsionsmolekül ("intercellular adhesion molecule")
ICC	Immunzytochemie
Ig	Immunglobuline
IgG	Immunglobulin G
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
in vitro	in Kultur
in vivo	im Gewebe
IFN γ	Interferon-gamma
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxids-Synthase
IR	Immunreaktivität
kDa	Kilo-Dalton
KO	knock-out Maus
l	Liter

LPS	Lipopolysaccharide
LT α	Lymphotoxin α
MCSF	Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
MCSFR	Rezeptor für MCSF
MHC	Haupthistokompatibilitätsantigen (englisch "major histocompatibility complex")
μ g	Mikrogramm (= 10^{-6} g)
μ l	Mikroliter (= 10^{-6} l)
μ m	Mirkometer (= 10^{-6} m)
ml	Milliliter (= 10^{-3} l)
MPI	Max-Planck-Institut
MS	Multiple Sklerose
NADPH	reduziertes Nikotinsäureamid-adenin-dinucleotid-phosphat
NK - Zellen	Natürliche Killer Zellen
nm	Nanometer (= 10^{-9} m)
NO	Stickstoffmonoxid
OLW	optischer Lichtwert (englisch "optical luminosity value")
p	Fehler erster Art
PB	Phosphat-Puffer
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PFA	Paraformaldehyd
Pixel	Bildpunkt
RGB	Rot-Grün-Blau (englisch "Red Green Blue")
RISC	relativer Färbefaktor (englisch "relative intensity of staining or contrast factor")
ROI	Auswertungsgebiet (englisch "region of interest")
rpm	Umdrehungen pro Minute (englisch "rounds per minute")
RT	Raumtemperatur
SCID	Severe Comined Immunodeficiency
SEM	Standard Error of Mean
TIFF	englisch "tagged image file format"
TR	TexasRed
Tsp	Thrombospondin
U	Einheiten
V	Volt
VCAM	vaskuläres Zelladhäsionsmolekül (englisch "vascular cell adhesion molecule")
WT	Wildtyp Maus
ZNS	zentrales Nervensystem

7. Zitierte Literatur

- ABERCROMBIE, M. 1946. Estimation of nuclear populations from microtome sections. *Anat. Rec.*: 239-247.
- ACUTO, O. AND CANTRELL, D. 2000. T-cell activation and the cytoskeleton. *Ann Rev Immunol.*: 165-184.
- ADAMS, J. C. 1992. Biotin amplification of biotin and horseradish peroxidase signals in histochemical stains. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*: 1457-1463.
- AKIYAMA, H., AND P. L. MCGEER. 1989. Microglial response to 6-hydroxydopamine-induced substantia nigra lesions. *Brain Res* 489: 247-253.
- ALHEIM, K., AND T. BARTFAI. 1998. The interleukin-1 system: receptors, ligands, and ICE in the brain and their involvement in the fever response. *Ann N Y Acad Sci* 840: 51-58.
- ALLAN, S. M., L. C. PARKER, B. COLLINS, R. DAVIES, G. N. LUHESHI, AND N. J. ROTHWELL. 2000. Cortical cell death induced by IL-1 is mediated via actions in the hypothalamus of the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 5580-5585.
- ANDERSSON, P. B., V. H. PERRY, AND S. GORDON. 1992. The acute inflammatory response to lipopolysaccharide in CNS parenchyma differs from that in other body tissues. *Neuroscience* 48: 169-186.
- ANGELOV, D. N., A. GUNKEL, E. STENNERT, AND W. F. NEISS. 1995. Phagocytic microglia during delayed neuronal loss in the facial nucleus of the rat: time course of the neuronofugal migration of brain macrophages. *Glia* 13: 113-129.
- BANATI, R. B., J. GEHRMANN, P. SCHUBERT, AND G. W. KREUTZBERG. 1993. Cytotoxicity of microglia. *Glia* 7: 111-118.
- BANNERMAN, D. D., AND S. E. GOLDBLUM. 1999. Direct effects of endotoxin on the endothelium: barrier function and injury. *Lab Invest* 79: 1181-1199.
- BARRON, K. D. 1983. Comparative observations on the cytologic reactions of central and peripheral nerve cells to axotomy. *Kao CC, Bunge RP und Reier PJ (eds): Spinal Cord Reconstruction: 7-40.*
- BARSIG, J., S. KUSTERS, K. VOGT, H. D. VOLK, G. TIEGS, AND A. WENDEL. 1995. Lipopolysaccharide-induced interleukin-10 in mice: role of endogenous tumor necrosis factor- α . *Eur J Immunol* 25: 2888-2893.
- BAUMGARTNER, B. J., AND H. D. SHINE. 1998. Permanent rescue of lesioned neonatal motoneurons and enhanced axonal regeneration by adenovirus-mediated expression of glial cell-line-derived neurotrophic factor. *J Neurosci Res* 54: 766-777.
- BECHER, B., V. FEDOROWICZ, AND J. P. ANTEL. 1996. Regulation of CD14 expression on human adult central nervous system-derived microglia. *J Neurosci Res* 45: 375-381.
- BECHMANN, I., S. PETER, M. BEYER, U. GIMSA, AND R. NITSCH. 2001. Presence of B7-2 (CD86) and lack of B7-1 (CD80) on myelin phagocytosing MHC-II-positive rat microglia is associated with nondestructive immunity in vivo. *Faseb J* 15: 1086-1088.
- BENOWITZ, L. I., AND A. ROUTTENBERG. 1997. GAP-43: an intrinsic determinant of neuronal development and plasticity. *Trends Neurosci* 20: 84-91.
- BEREZOVSKAYA, O., D. MAYSINGER, AND S. FEDOROFF. 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* 13: 285-299.
- BETHEA, J. R., H. NAGASHIMA, M. C. ACOSTA, C. BRICENO, F. GOMEZ, A. E. MARCILLO, K. LOOR, J. GREEN, AND W. D. DIETRICH. 1999. Systemically administered interleukin-10 reduces tumor necrosis factor- α production and significantly improves functional recovery following traumatic spinal cord injury in rats. *J Neurotrauma* 16: 851-863.
- BILLIAU, A., H. HEREMANS, K. VERMEIRE, AND P. MATTHYS. 1997. Immunomodulatory Properties of Interferon- γ . *Ann N Y Acad Sci*: 22-32.
- BLINZINGER, K., AND G. KREUTZBERG. 1968. Displacement of synaptic terminals from regenerating motoneurons by microglial cells. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 85: 145-157.
- BOHATSCHKEK, M., C. U. KLOSS, R. KALLA, AND G. RAIVICH. 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 Res* 64: 508-522.
- BOHATSCHKEK, M., JONES L.L., KREUTZBERG G.W., RAIVICH G. 1998. Expression of immunoregulatory molecules MHC1, MHC2 and B7-2 in the axotomized mouse facial motor nucleus. *Clin. Neuropathol.*: 286.

- BOUTIN, H., R. A. LEFEUVRE, R. HORAI, M. ASANO, Y. IWAKURA, AND N. J. ROTHWELL. 2001. Role of IL-1alpha and IL-1beta in ischemic brain damage. *J Neurosci* 21: 5528-5534.
- BRETSCHER, P., AND M. COHN. 1970. A theory of self-nonself discrimination. *Science* 169: 1042-1049.
- BRIGHTMAN, M. W., I. KLATZO, Y. OLSSON, AND T. S. REESE. 1970. The blood-brain barrier to proteins under normal and pathological conditions. *J Neurol Sci* 10: 215-239.
- BROADWELL, R. D., AND M. V. SOFRONIEW. 1993. Serum proteins bypass the blood-brain fluid barriers for extracellular entry to the central nervous system. *Exp Neurol* 120: 245-263.
- BROCKER, T., M. RIEDINGER, AND K. KARJALAINEN. 1997. Targeted expression of major histocompatibility complex (MHC) class II molecules demonstrates that dendritic cells can induce negative but not positive selection of thymocytes in vivo. *J Exp Med* 185: 541-550.
- BRUCE, A. J., W. BOLING, M. S. KINDY, J. PESCHON, P. J. KRAEMER, M. K. CARPENTER, F. W. HOLTSBERG, AND M. P. MATTON. 1996. Altered neuronal and microglial responses to excitotoxic and ischemic brain injury in mice lacking TNF receptors. *Nat Med* 2: 788-794.
- BUTTINI, M., AND H. BODDEKE. 1995. Peripheral lipopolysaccharide stimulation induces interleukin-1 beta messenger RNA in rat brain microglial cells. *Neuroscience* 65: 523-530.
- BUTTINI, M., A. MIR, K. APPEL, K. H. WIEDERHOLD, S. LIMONTA, P. J. GEBICKE-HAERTER, AND H. W. BODDEKE. 1997. Lipopolysaccharide induces expression of tumour necrosis factor alpha in rat brain: inhibition by methylprednisolone and by rolipram. *Br J Pharmacol* 122: 1483-1489.
- CHAN, A., T. MAGNUS, AND R. GOLD. 2001. Phagocytosis of apoptotic inflammatory cells by microglia and modulation by different cytokines: mechanism for removal of apoptotic cells in the inflamed nervous system. *Glia* 33: 87-95.
- CHANG, G. H., N. M. BARBARO, AND R. O. PIEPER. 2000. Phosphatidylserine-dependent phagocytosis of apoptotic glioma cells by normal human microglia, astrocytes, and glioma cells. *Neuro-oncol* 2: 174-183.
- CHOW, C. W., S. GRINSTEIN, AND O. D. ROTSTEIN. 1995. Signaling events in monocytes and macrophages. *New Horiz* 3: 342-351.
- CHUNG, I. Y., J. G. NORRIS, AND E. N. BENVENISTE. 1991. Differential tumor necrosis factor alpha expression by astrocytes from experimental allergic encephalomyelitis-susceptible and -resistant rat strains. *J Exp Med* 173: 801-811.
- CIOFFI, W. G., D. G. BURLERSON, AND B. A. PRUITT, JR. 1993. Leukocyte responses to injury. *Arch Surg* 128: 1260-1267.
- COMPSTON, A., J. ZAJICEK, J. SUSSMAN, A. WEBB, G. HALL, D. MUIR, C. SHAW, A. WOOD, AND N. SCOLDING. 1997. Glial lineages and myelination in the central nervous system. *J Anat* 190 (Pt 2): 161-200.
- DE SIMONE, R., A. GIAMPAOLO, B. GIOMETTO, P. GALLO, G. LEVI, C. PESCHLE, AND F. ALOISI. 1995. The costimulatory molecule B7 is expressed on human microglia in culture and in multiple sclerosis acute lesions. *J Neuropathol Exp Neurol* 54: 175-187.
- DECKERT-SCHLUTER, M., H. BLUETHMANN, N. KAEFER, A. RANG, AND D. SCHLUTER. 1999. Interferon-gamma receptor-mediated but not tumor necrosis factor receptor type 1- or type 2-mediated signaling is crucial for the activation of cerebral blood vessel endothelial cells and microglia in murine Toxoplasma encephalitis. *Am J Pathol* 154: 1549-1561.
- DECKERT-SCHLUTER, M., A. RANG, D. WEINER, S. HUANG, O. D. WIESTLER, H. HOF, AND D. SCHLUTER. 1996. Interferon-gamma receptor-deficiency renders mice highly susceptible to toxoplasmosis by decreased macrophage activation. *Lab Invest* 75: 827-841.
- DECLERCQ, W., G. DENECKER, W. FIERS, AND P. VANDENABEELE. 1998. Cooperation of both TNF receptors in inducing apoptosis: involvement of the TNF receptor-associated factor binding domain of the TNF receptor p75. *J Immunol* 161: 390-399.
- DOUNI, E., AND G. KOLLIAS. 1998. A critical role of the p75 tumor necrosis factor receptor (p75TNF-R) in organ inflammation independent of TNF, lymphotoxin alpha or the p55 TNF-R. *J Exp Med* 188: 1343-1352.
- DUMOULIN, F. L., G. RAIVICH, C. A. HAAS, P. LAZAR, M. REDDINGTON, W. J. STREIT, AND G. W. KREUTZBERG. 1992. Calcitonin gene-related peptide and peripheral nerve regeneration. *Ann N Y Acad Sci* 657: 351-360.
- EDDLESTON, M., AND L. MUCKE. 1993. Molecular profile of reactive astrocytes--implications for their role in neurologic disease. *Neuroscience* 54: 15-36.
- ENGELHARDT, J. I., J. TAJTI, AND S. H. APPEL. 1993. Lymphocytic infiltrates in the spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. *Arch Neurol* 50: 30-36.
- ERIKSSON, C., B. WINBLAD, AND M. SCHULTZBERG. 1998. Kainic acid induced expression of interleukin-1 receptor antagonist mRNA in the rat brain. *Mol. Brain. Res.* 58: 195-208.
- ESKAY, R. L., M. GRINO, AND H. T. CHEN. 1990. Interleukins, signal transduction, and the immune system-mediated stress response. *Adv Exp Med Biol* 274: 331-343.

- ESSANI, N. A., G. M. MCGUIRE, A. M. MANNING, AND H. JAESCHKE. 1996. Endotoxin-induced activation of the nuclear transcription factor kappa B and expression of E-selectin messenger RNA in hepatocytes, Kupffer cells, and endothelial cells in vivo. *J Immunol* 156: 2956-2963.
- ESTABROOK, M. M., N. C. CHRISTOPHER, J. M. GRIFFISS, C. J. BAKER, AND R. E. MANDRELL. 1992. Sialylation and human neutrophil killing of group C *Neisseria meningitidis*. *J Infect Dis* 166: 1079-1088.
- FAWCETT, J. P., S. X. BAMJI, C. G. CAUSING, R. ALOYZ, A. R. ASE, T. A. READER, J. H. MCLEAN, AND F. D. MILLER. 1998. Functional evidence that BDNF is an anterograde neuronal trophic factor in the CNS. *J Neurosci* 18: 2808-2821.
- FERNANDES K.J., V. J. L., TETZLAFF W. 2000. Stimulation of regenerative cell body responses in chronically axotomized motoneurons by a second axon injury: Evidence for positive injury signals. *Soc Neurosci Abs* 26: 14.
- FINSEN, B. R., M. B. JORGENSEN, N. H. DIEMER, AND J. ZIMMER. 1993. Microglial MHC antigen expression after ischemic and kainic acid lesions of the adult rat hippocampus. *Glia* 7: 41-49.
- FISHMAN, P. S., AND J. M. SAVITT. 1989. Selective localization by neuroglia of immunoglobulin G in normal mice. *J Neuropathol Exp Neurol* 48: 212-220.
- FONTAINE, V., S. MOHAND-SAID, N. HANOTEAU, C. FUCHS, K. PFIZENMAIER, AND U. EISEL. 2002. Neurodegenerative and neuroprotective effects of tumor Necrosis factor (TNF) in retinal ischemia: opposite roles of TNF receptor 1 and TNF receptor 2. *J Neurosci* 22: RC216.
- FULURIJA, A., R. B. ASHMAN, AND J. M. PAPADIMITRIOU. 1996. Neutrophil depletion increases susceptibility to systemic and vaginal candidiasis in mice, and reveals differences between brain and kidney in mechanisms of host resistance. *Microbiology* 142 (Pt 12): 3487-3496.
- GALIANO, M., Z. Q. LIU, R. KALLA, M. BOHATSCHKE, A. KOPPIUS, A. GSCHWENDTNER, S. XU, A. WERNER, C. U. KLOSS, L. L. JONES, H. BLUETHMANN, AND G. RAIVICH. 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.
- GARCION, E., L. SINDJI, C. MONTERO-MENEI, C. ANDRE, P. BRACHET, AND F. DARCY. 1998. Expression of inducible nitric oxide synthase during rat brain inflammation: regulation by 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Glia* 22: 282-294.
- GARY, D. S., A. J. BRUCE-KELLER, M. S. KINDY, AND M. P. MATTSON. 1998. Ischemic and excitotoxic brain injury is enhanced in mice lacking the p55 tumor necrosis factor receptor. *J Cereb Blood Flow Metab* 18: 1283-1287.
- GERBER, J., G. RAIVICH, A. WELLMER, C. NOESKE, T. KUNST, A. WERNER, W. BRUCK, AND R. NAU. 2001. A mouse model of *Streptococcus pneumoniae* meningitis mimicking several features of human disease. *Acta Neuropathol (Berl)* 101: 499-508.
- GOTSCH, U., U. JAGER, M. DOMINIS, AND D. VESTWEBER. 1994. Expression of P-selectin on endothelial cells is upregulated by LPS and TNF-alpha in vivo. *Cell Adhes Commun* 2: 7-14.
- GOURMALA, N. G., M. BUTTINI, S. LIMONTA, A. SAUTER, AND H. W. BODDEKE. 1997. Differential and time-dependent expression of monocyte chemoattractant protein-1 mRNA by astrocytes and macrophages in rat brain: effects of ischemia and peripheral lipopolysaccharide administration. *J Neuroimmunol* 74: 35-44.
- GOURMALA, N. G., S. LIMONTA, D. BOCHELEN, A. SAUTER, AND H. W. BODDEKE. 1999. Localization of macrophage inflammatory protein: macrophage inflammatory protein-1 expression in rat brain after peripheral administration of lipopolysaccharide and focal cerebral ischemia. *Neuroscience* 88: 1255-1266.
- GRAEBER, M. B., AND G. W. KREUTZBERG. 1988. Delayed astrocyte reaction following facial nerve axotomy. *J Neurocytol* 17: 209-220.
- GRAEBER, M. B., G. RAIVICH, AND G. W. KREUTZBERG. 1989. Increase of transferrin receptors and iron uptake in regenerating motor neurons. *J Neurosci Res* 23: 342-345.
- GRAHAM, R. C., AND M. J. KARNOVSKY. 1965. The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney: ultrastructural cytochemistry by a new technique. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*: 291.
- GRAU, V., B. HERBST, P. H. VAN DER MEIDE, AND B. STEINIGER. 1997. Activation of microglial and endothelial cells in the rat brain after treatment with interferon-gamma in vivo. *Glia* 19: 181-189.
- HARTLAGE-RUBSAMEN, M., R. LEMKE, AND R. SCHLIEBS. 1999. Interleukin-1beta, inducible nitric oxide synthase, and nuclear factor-kappaB are induced in morphologically distinct microglia after rat hippocampal lipopolysaccharide/interferon-gamma injection. *J Neurosci Res* 57: 388-398.
- HELLER, R. A., K. SONG, N. FAN, AND D. J. CHANG. 1992. The p75 tumor-necrosis-factor receptor mediates cytotoxicity. *Cell* 70: 47-56.
- HICKEY, W. F., AND H. KIMURA. 1988. Perivascular microglial cells of the CNS are bone marrow-derived and present antigen in vivo. *Science* 239: 290-292.

- HICKEY, W. F., B. L. HSU, AND H. KIMURA. 1991. T-lymphocyte entry into the central nervous system. *J Neurosci Res* 28: 254-260.
- HOOPER, D. C., K. MORIMOTO, M. BETTE, E. WEIHE, H. KOPROWSKI, AND B. DIETZSCHOLD. 1998. Collaboration of antibody and inflammation in clearance of rabies virus from the central nervous system. *J Virol* 72: 3711-3719.
- HSU, S. M., AND E. SOBAN. 1982. Color modification of diaminobenzidine (DAB) precipitation by metallic ions and its application for double immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem* 30: 1079-1082.
- HUNT, J. S., AND G. W. WOOD. 1986. Interferon-gamma induces class I HLA and beta 2-microglobulin expression by human amnion cells. *J Immunol* 136: 364-367.
- HUTCHINGS, P. R., A. M. VAREY, AND A. COOKE. 1986. Immunological defects in SJL mice. *Immunology* 59: 445-450.
- HYNES, R. O. 1992. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 69: 11-25.
- IDRISS, H. T., AND J. H. NAISMITH. 2000. TNF α and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s). *Micros. Res. Tech* 50: 184-195.
- IMAI, Y., I. IBATA, D. ITO, K. OHSAWA, AND S. KOHSAKA. 1996. A novel gene iba1 in the major histocompatibility complex class III region encoding an EF hand protein expressed in a monocytic lineage. *Biochem Biophys Res Commun* 224: 855-862.
- INGALLS, R. R., B. G. MONKS, R. SAVEDRA, JR., W. J. CHRIST, R. L. DELUDE, A. E. MEDVEDEV, T. ESPEVIK, AND D. T. GOLENBOCK. 1998. CD11/CD18 and CD14 share a common lipid A signaling pathway. *J Immunol* 161: 5413-5420.
- ISSAZADEH, S., V. NAVIKAS, M. SCHAUB, M. SAYEGH, AND S. KHOURY. 1998. Kinetics of expression of costimulatory molecules and their ligands in murine relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis in vivo. *J Immunol* 161: 1104-1112.
- ITAGAKI, S., P. L. MCGEER, AND H. AKIYAMA. 1988. Presence of T-cytotoxic suppressor and leucocyte common antigen positive cells in Alzheimer's disease brain tissue. *Neurosci Lett* 91: 259-264.
- ITO, D., Y. IMAI, K. OHSAWA, K. NAKAJIMA, Y. FUKUUCHI, AND S. KOHSAKA. 1998. Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1. *Brain Res Mol Brain Res* 57: 1-9.
- JAMES, P. E., K. J. LIU, AND H. M. SWARTZ. 1998. Direct detection of tissue nitric oxide in septic mice. *Adv Exp Med Biol* 454: 181-187.
- JANZER, R. C., AND M. C. RAFF. 1987. Astrocytes induce blood-brain barrier properties in endothelial cells. *Nature* 325: 253-257.
- JESSELL, T. M. 1991. Reactions of Neurons to Injury. *Kandel ER, Schwarz JH, und Jessell TM: Principles of Neural Science: 258-269.*
- JINDAL, N., S. M. HOLLENBERG, AND R. P. DELLINGER. 2000. Pharmacologic issues in the management of septic shock. *Crit Care Clin* 16: 233-249.
- JONES, L. L., G. W. KREUTZBERG, AND G. RAVICH. 1997. Regulation of CD44 in the regenerating mouse facial motor nucleus. *Eur J Neurosci* 9: 1854-1863.
- JONES, L. L., Z. LIU, J. SHEN, A. WERNER, G. W. KREUTZBERG, AND G. RAVICH. 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., M. BOHATSCHKEK, C. U. KLOSS, J. KROL, X. VON MALTZAN, AND G. RAVICH. 2003. Loss of microglial ramification in microglia-astrocyte cocultures: involvement of adenylate cyclase, calcium, phosphatase, and Gi-protein systems. *Glia* 41: 50-63.
- KALLA, R., Z. LIU, S. XU, A. KOPPIUS, Y. IMAI, C. U. KLOSS, S. KOHSAKA, A. GSCHWENDTNER, J. C. MOLLER, A. WERNER, AND G. RAVICH. 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.
- KAMINSKY, S. G., I. NAKAMURA, AND G. CUDKOWICZ. 1983. Selective defect of natural killer and killer cell activity against lymphomas in SJL mice: low responsiveness to interferon inducers. *J Immunol* 130: 1980-1984.
- KIEFER, R., W. J. STREIT, K. V. TOYKA, G. W. KREUTZBERG, AND H. P. HARTUNG. 1995. Transforming growth factor-beta 1: a lesion-associated cytokine of the nervous system. *Int J Dev Neurosci* 13: 331-339.
- KITAMURA, Y., H. TAKAHASHI, Y. MATSUOKA, I. TOOYAMA, H. KIMURA, Y. NOMURA, AND T. TANIGUCHI. 1996. In vivo induction of inducible nitric oxide synthase by microinjection with interferon-gamma and lipopolysaccharide in rat hippocampus. *Glia* 18: 233-243.
- KLAR, D., AND G. J. HAMMERLING. 1989. Induction of assembly of MHC class I heavy chains with beta 2microglobulin by interferon-gamma. *Embo J* 8: 475-481.

- KLEIN, M. A., J. C. MOLLER, L. L. JONES, H. BLUETHMANN, G. W. KREUTZBERG, AND G. RAIVICH. 1997. Impaired neuroglial activation in interleukin-6 deficient mice. *Glia* 19: 227-233.
- KLOSS, C. U., G. W. KREUTZBERG, AND G. RAIVICH. 1997. Proliferation of ramified microglia on an astrocyte monolayer: characterization of stimulatory and inhibitory cytokines. *J Neurosci Res* 49: 248-254.
- KLOSS, C. U., M. BOHATSCHKEK, G. W. KREUTZBERG, AND G. RAIVICH. 2001. Effect of lipopolysaccharide on the morphology and integrin immunoreactivity of ramified microglia in the mouse brain and in cell culture. *Exp Neurol* 168: 32-46.
- KLOSS, C. U., A. WERNER, M. A. KLEIN, J. SHEN, K. MENUZ, J. C. PROBST, G. W. KREUTZBERG, AND G. RAIVICH. 1999. 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.
- KOLLER, B. H., P. MARRACK, J. W. KAPPLER, AND O. SMITHIES. 1990. Normal development of mice deficient in beta 2M, MHC class I proteins, and CD8+ T cells. *Science* 248: 1227-1230.
- KOPEC, K. K., AND R. T. CARROLL. 2000. Phagocytosis is regulated by nitric oxide in murine microglia. *Nitric Oxide* 4: 103-111.
- KRAKOWSKI, M., AND T. OWENS. 1996. Interferon-gamma confers resistance to experimental allergic encephalomyelitis. *Eur J Immunol* 26: 1641-1646.
- KREUTZBERG, G. W. 1963. Changes of coenzyme (TPN) diaphorase and TPN-linked dehydrogenase during axonal reaction of the nerve cell. *Nature* 199: 393-394.
- KREUTZBERG, G. W. 1995. Microglia, the first line of defence in brain pathologies. *Arzneimittelforschung* 45: 357-360.
- KREUTZBERG, G. W. 1996. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci* 19: 312-318.
- KREUTZBERG, G. W., AND H. EMMERT. 1980. Glucose utilization of motor nuclei during regeneration: a [¹⁴C]2-deoxyglucose study. *Exp Neurol* 70: 712-716.
- KREUTZBERG, G. W., M. B. GRAEBER, AND W. J. STREIT. 1989. Neuron-glia relationship during regeneration of motoneurons. *Metab Brain Dis* 4: 81-85.
- KRIEGLSTEIN, K., S. RICHTER, L. FARKAS, N. SCHUSTER, N. DUNKER, R. W. OPPENHEIM, AND K. UNSICKER. 2000. Reduction of endogenous transforming growth factors beta prevents ontogenetic neuron death. *Nat Neurosci* 3: 1085-1090.
- LABOW, M., D. SHUSTER, M. ZETTERSTROM, P. NUNES, R. TERRY, E. B. CULLINAN, T. BARTFAI, C. SOLORZANO, L. L. MOLDAWER, R. CHIZZONITE, AND K. W. MCINTYRE. 1997. Absence of IL-1 signaling and reduced inflammatory response in IL-1 type I receptor-deficient mice. *J Immunol* 159: 2452-2461.
- LANDMANN, R., B. MULLER, AND W. ZIMMERLI. 2000. CD14, new aspects of ligand and signal diversity. *Microbes Infect* 2: 295-304.
- LARSSON, M., J. F. FONTENEAU, S. SOMERSAN, C. SANDERS, K. BICKHAM, E. K. THOMAS, K. MAHNKE, AND N. BHARDWAJ. 2001. Efficiency of cross presentation of vaccinia virus-derived antigens by human dendritic cells. *Eur J Immunol* 31: 3432-3442.
- LEE, S. C., W. LIU, D. W. DICKSON, C. F. BROSNAN, AND J. W. BERMAN. 1993. Cytokine production by human fetal microglia and astrocytes. Differential induction by lipopolysaccharide and IL-1 beta. *J Immunol* 150: 2659-2667.
- LEON, L. R., C. A. CONN, M. GLACCUM, AND M. J. KLUGER. 1996. IL1 type 1 receptor mediates acute phase response to turpentine, but not lipopolysaccharide, in mice. *Am J Physiol* 272: R1668-R1675.
- LING, E. A., AND W. C. WONG. 1993. The origin and nature of ramified and amoeboid microglia: a historical review and current concepts. *Glia* 7: 9-18.
- LIU, Z. Q., M. BOHATSCHKEK, K. PFEFFER, H. BLUETHMANN, AND G. RAIVICH. 2005. Major histocompatibility complex (MHC2+) perivascular macrophages in the axotomized facial motor nucleus are regulated by receptors for interferon-gamma (IFNgamma) and tumor necrosis factor (TNF). *Neuroscience* 131: 283-292.
- LODDICK, S. A., M. L. WONG, P. B. BONGIORNO, P. W. GOLD, J. LICINIO, AND N. J. ROTHWELL. 1997. Endogenous interleukin-1 receptor antagonist is neuroprotective. *Biochem Biophys Res Commun* 234: 211-215.
- LUCAS, R., P. JUILLARD, E. DECOSTER, M. REDARD, D. BURGER, Y. DONATI, C. GIROUD, C. MONSO-HINARD, T. DE KESEL, W. A. BUURMAN, M. W. MOORE, J. M. DAYER, W. FIERS, H. BLUETHMANN, AND G. E. GRAU. 1997. Crucial role of tumor necrosis factor (TNF) receptor 2 and membrane-bound TNF in experimental cerebral malaria. *Eur. J. Immunology* 27: 1719-1725.
- LUHESI, G. N. 1998. Cytokines and fever. Mechanisms and sites of action. *Ann N Y Acad Sci* 856: 83-89.

- MA, X. C., L. T. CHEN, J. OLIVER, E. HORVATH, AND C. P. PHELPS. 2000. Cytokine and adrenal axis responses to endotoxin. *Brain Res* 861: 135-142.
- MATSUDA, S., T. C. WEN, F. MORITA, H. OTSUKA, K. IGASE, H. YOSHIMURA, AND M. SAKANAKA. 1996. Interleukin-6 prevents ischemia-induced learning disability and neuronal and synaptic loss in gerbils. *Neurosci Lett* 204: 109-112.
- MATSUOKA, Y., Y. KITAMURA, H. TAKAHASHI, I. TOOYAMA, H. KIMURA, P. J. GEBICKE-HAERTER, Y. NOMURA, AND T. TANIGUCHI. 1999. Interferon-gamma plus lipopolysaccharide induction of delayed neuronal apoptosis in rat hippocampus. *Neurochem Int* 34: 91-99.
- MAYER, A. M. 1998. Therapeutic implications of microglia activation by lipopolysaccharide and reactive oxygen species generation in septic shock and central nervous system pathologies: a review. *Medicina (B Aires)* 58: 377-385.
- MCGEER, P. L., T. KAWAMATA, D. G. WALKER, H. AKIYAMA, I. TOOYAMA, AND E. G. MCGEER. 1993. Microglia in degenerative neurological disease. *Glia* 7: 84-92.
- MCQUARRIE, I. G., B. GRAFSTEIN, C. F. DREYFUS, AND M. D. GERSHON. 1978. Regeneration of adrenergic axons in rat sciatic nerve: effect of a conditioning lesion. *Brain Res* 141: 21-34.
- MEANS, T. K., D. T. GOLENBOCK, AND M. J. FENTON. 2000. The biology of Toll-like receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 11: 219-232.
- MENENDEZ IGLESIAS, B., J. CERASE, C. CERACCHINI, G. LEVI, AND F. ALOISI. 1997. Analysis of B7-1 and B7-2 costimulatory ligands in cultured mouse microglia: upregulation by interferon-gamma and lipopolysaccharide and downregulation by interleukin-10, prostaglandin E2 and cyclic AMP-elevating agents. *J Neuroimmunol* 72: 83-93.
- MOLLER, J. C., M. A. KLEIN, S. HAAS, L. L. JONES, G. W. KREUTZBERG, AND G. RAIVICH. 1996. Regulation of thrombospondin in the regenerating mouse facial motor nucleus. *Glia* 17: 121-132.
- MOORE, R. Y. 1989. Cranial motor neurons contain either galanin- or calcitonin gene-related peptidelike immunoreactivity. *J Comp Neurol* 282: 512-522.
- MORIOKA, T., A. N. KALEHUA, AND W. J. STREIT. 1992. Progressive expression of immunomolecules on microglial cells in rat dorsal hippocampus following transient forebrain ischemia. *Acta Neuropathol (Berl)* 83: 149-157.
- NAKAYAMA, M., T. MIYAKE, Y. GAHARA, O. OHARA, AND T. KITAMURA. 1995. A novel RING-H2 motif protein downregulated by axotomy: its characteristic localization at the postsynaptic density of axosomatic synapse. *J Neurosci* 15: 5238-5248.
- NETEA, M. G., P. N. DEMACKER, B. J. KULLBERG, O. C. BOERMAN, I. VERSCHUEREN, A. F. STALENHOF, AND J. W. VAN DER MEER. 1998. Increased interleukin-1alpha and interleukin-1beta production by macrophages of low-density lipoprotein receptor knock-out mice stimulated with lipopolysaccharide is CD11c/CD18-receptor mediated. *Immunology* 95: 466-472.
- NEUMANN, H., AND H. WEKERLE. 1998. Neuronal control of the immune response in the central nervous system: linking brain immunity to neurodegeneration. *J Neuropathol Exp Neurol* 57: 1-9.
- NISSL, F. 1894. Über eine neue untersuchungsmethode des centralorgans speziell zur feststellung der lokalisation der nervenzellen. *Zentralbl Nervenheilk Psychiatr.* 337-344.
- OLSON, J. K., A. M. GIRVIN, AND S. D. MILLER. 2001. Direct activation of innate and antigen-presenting functions of microglia following infection with Theiler's virus. *J Virol* 75: 9780-9789.
- PENKOWA, M., M. GIRALT, J. CARRASCO, H. HADBERG, AND J. HIDALGO. 2000. Impaired inflammatory response and increased oxidative stress and neurodegeneration after brain injury in interleukin-6-deficient mice. *Glia* 32: 271-285.
- PERESS, N. S., H. B. FLEIT, E. PERILLO, R. KULJIS, AND C. PEZZULLO. 1993. Identification of Fc gamma RI, II and III on normal human brain ramified microglia and on microglia in senile plaques in Alzheimer's disease. *J Neuroimmunol* 48: 71-79.
- PFEFFER, K., T. MATSUYAMA, T. M. KUNDIG, A. WAKEHAM, K. KISHIHARA, A. SHAHINIAN, K. WIEGMANN, P. S. OHASHI, M. KRONKE, AND T. W. MAK. 1993. Mice deficient for the 55 kd tumor necrosis factor receptor are resistant to endotoxic shock, yet succumb to L. monocytogenes infection. *Cell* 73: 457-467.
- POPOVICH, P. G., B. T. STOKES, AND C. C. WHITACRE. 1996. Concept of autoimmunity following spinal cord injury: possible roles for T lymphocytes in the traumatized central nervous system. *J Neurosci Res* 45: 349-363.
- PRUDHOMME, J. G., I. W. SHERMAN, K. M. LAND, A. V. MOSES, S. STENGLEIN, AND J. A. NELSON. 1996. Studies of Plasmodium falciparum cytoadherence using immortalized human brain capillary endothelial cells. *Int J Parasitol* 26: 647-655.
- RAIVICH, G. 2002. Cell Recruitment in the Axotomized Facial Nucleus: Role of Cytokines, Chemokines and Cell Adhesion Molecules. *Universes in Delicate Balance: Chemokines and the Nervous System*: 203-215.

- RAIVICH, G., H. BLUETHMANN, AND G. W. KREUTZBERG. 1996. Signaling molecules and neuroglial activation in the injured central nervous system. *Keio J Med* 45: 239-247.
- RAIVICH, G., M. T. MORENO-FLORES, J. C. MOLLER, AND G. W. KREUTZBERG. 1994a. 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., M. T. MORENO-FLORES, J. C. MULLER, AND G. W. KREUTZBERG. 1994b. Regulation of microglial proliferation: colony-stimulating factors and their receptors. *Neuropathol Appl Neurobiol* 20: 209-211.
- RAIVICH, G., M. REDDINGTON, C. A. HAAS, AND G. W. KREUTZBERG. 1995. Peptides in motoneurons. *Prog Brain Res* 104: 3-20.
- RAIVICH, G., L. L. JONES, C. U. KLOSS, A. WERNER, H. NEUMANN, AND G. W. KREUTZBERG. 1998a. 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., S. HAAS, A. WERNER, M. A. KLEIN, C. KLOSS, AND G. W. KREUTZBERG. 1998b. Regulation of MCSF receptors on microglia in the normal and injured mouse central nervous system: a quantitative immunofluorescence study using confocal laser microscopy. *J Comp Neurol* 395: 342-358.
- RAIVICH, G., L. L. JONES, A. WERNER, H. BLUTHMANN, T. DOETSCHMANN, AND G. W. KREUTZBERG. 1999a. Molecular signals for glial activation: pro- and anti-inflammatory cytokines in the injured brain. *Acta Neurochir Suppl (Wien)* 73: 21-30.
- RAIVICH, G., M. BOHATSCHKEK, C. U. KLOSS, A. WERNER, L. L. JONES, AND G. W. KREUTZBERG. 1999b. Neuroglial activation repertoire in the injured brain: graded response, molecular mechanisms and cues to physiological function. *Brain Res Brain Res Rev* 30: 77-105.
- RAIVICH, G., Z. Q. LIU, C. U. KLOSS, M. LABOW, H. BLUETHMANN, AND M. BOHATSCHKEK. 2002. Cytotoxic potential of proinflammatory cytokines: combined deletion of TNF receptors TNFR1 and TNFR2 prevents motoneuron cell death after facial axotomy in adult mouse. *Exp Neurol* 178: 186-193.
- REID, D. M., V. H. PERRY, P. B. ANDERSSON, AND S. GORDON. 1993. Mitosis and apoptosis of microglia in vivo induced by an anti-CR3 antibody which crosses the blood-brain barrier. *Neuroscience* 56: 529-533.
- REIMANN, J., W. BOHM, AND R. SCHIRMBECK. 1994. Alternative processing pathways for MHC class I-restricted epitope presentation to CD8+ cytotoxic T lymphocytes. *Biol Chem Hoppe Seyler* 375: 731-736.
- RELTON, J. K., AND N. J. ROTHWELL. 1992. Interleukin-1 receptor antagonist inhibits ischaemic and excitotoxic neuronal damage in the rat. *Brain Res Bull.* 29: 243-246.
- RENNO, T., M. KRAKOWSKI, C. PICCIRILLO, J. Y. LIN, AND T. OWENS. 1995. TNF-alpha expression by resident microglia and infiltrating leukocytes in the central nervous system of mice with experimental allergic encephalomyelitis. Regulation by Th1 cytokines. *J Immunol* 154: 944-953.
- RIECKMANN, P., U. MICHEL, M. ALBRECHT, W. BRUCK, L. WOCKEL, AND K. FELGENHAUER. 1995. Cerebral endothelial cells are a major source for soluble intercellular adhesion molecule-1 in the human central nervous system. *Neurosci Lett* 186: 61-64.
- ROBEY, E., AND J. P. ALLISON. 1995. T-cell activation: integration of signals from the antigen receptor and costimulatory molecules. *Immunol Today* 16: 306-310.
- ROTHE, J., W. LESSLAUER, H. LOTSCHER, Y. LANG, P. KOEBEL, F. KONTGEN, A. ALTHAGE, R. ZINKERNAGEL, M. STEINMETZ, AND H. BLUETHMANN. 1993. Mice lacking the tumour necrosis factor receptor 1 are resistant to TNF-mediated toxicity but highly susceptible to infection by *Listeria monocytogenes*. *Nature* 364: 798-802.
- ROVAI, L. E., H. R. HERSCHMAN, AND J. B. SMITH. 1998. The murine neutrophil-chemoattractant chemokines LIX, KC, and MIP-2 have distinct induction kinetics, tissue distributions, and tissue-specific sensitivities to glucocorticoid regulation in endotoxemia. *J Leukoc Biol* 64: 494-502.
- RUDIN, W., N. FAVRE, G. BORDMANN, AND B. RYFFEL. 1997. Interferon-gamma is essential for the development of cerebral malaria. *Eur J Immunol* 27: 810-815.
- RUTKOWSKI, M. D., F. LAMBERT, V. RAGHAVENDRA, AND J. A. DELEO. 2004. Presence of spinal B7.2 (CD86) but not B7.1 (CD80) co-stimulatory molecules following peripheral nerve injury: role of nondestructive immunity in neuropathic pain. *J Neuroimmunol* 146: 94-98.
- SAPER, C. B. 1998. Neurobiological basis of fever. *Ann N Y Acad Sci* 856: 90-94.
- SCHIELKE, G. P., G. Y. YANG, B. D. SHIVERS, AND A. L. BETZ. 1998. Reduced ischemic brain injury in interleukin-1 beta converting enzyme-deficient mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 18: 180-185.
- SCHLUTER, D., N. KAEFER, H. HOF, O. D. WIESTLER, AND M. DECKERT-SCHLUTER. 1997. Expression pattern and cellular origin of cytokines in the normal and *Toxoplasma gondii*-infected murine brain. *Am J Pathol* 150: 1021-1035.

- SCHWARTZ, M. 2001. T cell mediated neuroprotection is a physiological response to central nervous system insults. *J Mol Med* 78: 594-597.
- SEILHEAN, D., K. KOBAYASHI, Y. HE, T. UCHIHARA, O. ROSENBLUM, C. KATLAMA, F. BRICAIRE, C. DUYNCKAERTS, AND J. J. HAUW. 1997. Tumor necrosis factor-alpha, microglia and astrocytes in AIDS dementia complex. *Acta Neuropathol (Berl)* 93: 508-517.
- SERPE, C. J., V. M. SANDERS, AND K. J. JONES. 2000. Kinetics of facial motoneuron loss following facial nerve transection in severe combined immunodeficient mice. *J Neurosci Res* 62: 273-278.
- SHAFER, R. A., AND S. MURPHY. 1997. Activated astrocytes induce nitric oxide synthase-2 in cerebral endothelium via tumor necrosis factor alpha. *Glia* 21: 370-379.
- SINATRA, R. S., AND D. H. FORD. 1979. The effects of acute and chronic morphine treatment on the process of facial nerve regeneration. *Brain Res* 175: 315-325.
- SINGER, P., AND S. MEHLER. 1986. Glucose and leucine uptake in the hypoglossal nucleus after hypoglossal nerve transection with and without prevented regeneration in the Sprague-Dawley rat. *Neurosci Lett* 67: 73-77.
- SINGH, A., J. NI, AND B. B. AGGARWAL. 1998. Death domain receptors and their role in cell demise. *J Interferon Cytokine Res* 18: 439-450.
- SKENE, J. H. 1989. Axonal growth-associated proteins. *Annu Rev Neurosci* 12: 127-156.
- SOBEL, R. A., V. K. TUOHY, AND M. B. LEES. 1991. Parental MHC molecule haplotype expression in (SJL/J x SWR)F1 mice with acute experimental allergic encephalomyelitis induced with two different synthetic peptides of myelin proteolipid protein. *J Immunol* 146: 543-549.
- SOREIDE, A. J. 1981. Variations in the axon reaction after different types of nerve lesion. Light and electron microscopic studies on the facial nucleus of the rat. *Acta Anat (Basel)* 110: 173-188.
- STERNBERGER, L. A. 1986. *Immunocytochemistry* New York: John Wiley & Sons.
- STREIT, W. J., M. B. GRAEBER, AND G. W. KREUTZBERG. 1989a. Expression of Ia antigen on perivascular and microglial cells after sublethal and lethal motor neuron injury. *Exp Neurol* 105: 115-126.
- STREIT, W. J., M. B. GRAEBER, AND G. W. KREUTZBERG. 1989b. Peripheral nerve lesion produces increased levels of major histocompatibility complex antigens in the central nervous system. *J Neuroimmunol* 21: 117-123.
- STREIT, W. J., S. L. SEMPLE-ROWLAND, S. D. HURLEY, R. C. MILLER, P. G. POPOVICH, AND B. T. STOKES. 1998. Cytokine mRNA profiles in contused spinal cord and axotomized facial nucleus suggest a beneficial role for inflammation and gliosis. *Exp Neurol* 152: 74-87.
- SUFFREDINI, A. F., G. FANTUZZI, R. BADOLATO, J. J. OPPENHEIM, AND N. P. O'GRADY. 1999. New insights into the biology of the acute phase response. *J Clin Immunol* 19: 203-214.
- SUZUMURA, A., S. G. E. METZITIS, N. K. GONATAS, AND D. H. SILBERBERG. 1987. MHC antigen expression on bulk isolated macrophage-microglia from newborn mouse brain: induction of Ia antigen expression by g-Interferon. *J Neuroimmunol* 15: 263-278.
- TANG, T., P. S. FRENETTE, R. O. HYNES, D. D. WAGNER, AND T. N. MAYADAS. 1996. Cytokine-induced meningitis is dramatically attenuated in mice deficient in endothelial selectins. *J Clin Invest* 97: 2485-2490.
- TERRADO, J., D. MONNIER, D. PERRELET, D. VESIN, S. JEMELIN, W. A. BUURMAN, L. MATTENBERGER, B. KING, A. C. KATO, AND I. GARCIA. 2000. Soluble TNF receptors partially protect injured motoneurons in the postnatal CNS. *Eur J Neurosci* 12: 3443-3447.
- TORVIK, A., AND F. SKJORTEN. 1971. Electron microscopic observations on nerve cell regeneration and degeneration after axon lesions. II. Changes in the glial cells. *Acta Neuropathol (Berl)* 17: 265-282.
- TOULMOND, S., AND N. J. ROTHWELL. 1995. Interleukin-1 receptor antagonist inhibits neuronal damage caused by fluid percussion injury in the rat. *Brain Res* 671: 261-266.
- TRACEY, K. J., Y. FONG, D. G. HESSE, K. R. MANOGUE, A. T. LEE, G. C. KUO, S. F. LOWRY, AND A. CERAMI. 1987. Anti-cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia. *Nature* 330: 662-664.
- TRAN, C. T., P. WOLZ, R. EGENSEPGER, S. KOSEL, Y. IMAI, K. BISE, S. KOHSAKA, P. MEHRAEIN, AND M. B. GRAEBER. 1998. Differential expression of MHC class II molecules by microglia and neoplastic astroglia: relevance for the escape of astrocytoma cells from immune surveillance. *Neuropathol Appl Neurobiol* 24: 293-301.
- TROOST, D., J. J. VAN DEN OORD, J. M. DE JONG, AND D. F. SWAAB. 1989. Lymphocytic infiltration in the spinal cord of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Clin Neuropathol* 8: 289-294.
- TUNKEL, A. R., AND W. M. SCHELD. 1993. Pathogenesis and pathophysiology of bacterial meningitis. *Clin Microbiol Rev* 6: 118-136.

- UNO, H., T. MATSUYAMA, H. AKITA, H. NISHIMURA, AND M. SUGITA. 1997. Induction of tumor necrosis factor-alpha in the mouse hippocampus following transient forebrain ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 17: 491-499.
- VAN DAM, A. M., J. BAUER, F. J. TILDERS, AND F. BERKENBOSCH. 1995. Endotoxin-induced appearance of immunoreactive interleukin-1 beta in ramified microglia in rat brain: a light and electron microscopic study. *Neuroscience* 65: 815-826.
- VASS, K., H. LASSMANN, H. WEKERLE, AND H. M. WISNIEWSKI. 1986. The distribution of Ia antigen in the lesions of rat acute experimental allergic encephalomyelitis. *Acta Neuropathol* 70: 149-160.
- VAUGHAN, D. W. 1990. Effects of advancing age on the central response of rat facial neurons to axotomy: light microscope morphometry. *Anat Rec* 228: 211-219.
- WAGNER, J. G., AND R. A. ROTH. 1999. Neutrophil migration during endotoxemia. *J Leukoc Biol* 66: 10-24.
- WAKABAYASHI, G., J. A. GELFAND, J. F. BURKE, R. C. THOMPSON, AND C. A. DINARELLO. 1991. A specific receptor antagonist for interleukin 1 prevents Escherichia coli-induced shock in rabbits. *Faseb J* 5: 338-343.
- WALL, D. A., S. D. HAMBERG, S. J. BURAKOFF, D. S. REYNOLDS, A. K. ABBAS, AND L. M. FERRARA. 1988. Immunodeficiency in graft-versus-host disease. I. Mechanism of immune suppression. *J Immunol* 140: 2970-2976.
- WANG, H., O. BLOOM, M. ZHANG, J. M. VISHNUBHAKAT, M. OMBRELLINO, J. CHE, A. FRAZIER, H. YANG, S. IVANOVA, L. BOROVIKOVA, K. R. MANOGUE, E. FAIST, E. ABRAHAM, J. ANDERSSON, U. ANDERSSON, P. E. MOLINA, N. N. ABUMRAD, A. SAMA, AND K. J. TRACEY. 1999. HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science* 285: 248-251.
- WANG, X., F. C. BARONE, N. V. AIYAR, AND G. Z. FEUERSTEIN. 1997. Interleukin-1 receptor and receptor antagonist gene expression after focal stroke in rats. *Stroke* 28: 155-161.
- WARE, C. F., T. L. VANARSDALE, P. D. CROWE, AND J. L. BROWNING. 1995. The ligands and receptors of the lymphotoxin system. *Curr Top Microbiol Immunol* 198: 175-218.
- WERNER, A., C. U. KLOSS, J. WALTER, G. W. KREUTZBERG, AND G. RAIVICH. 1998. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in the mouse facial motor nucleus after axonal injury and during regeneration. *J Neurocytol* 27: 219-232.
- WILLENBORG, D. O., S. FORDHAM, C. C. BERNARD, W. B. COWDEN, AND I. A. RAMSHAW. 1996. IFN-gamma plays a critical down-regulatory role in the induction and effector phase of myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 157.
- WINTERLE, S., B. SCHREINER, M. MITSDOERFFER, D. SCHNEIDER, L. CHEN, R. MEYERMANN, M. WELLER, AND H. WIENDL. 2003. Expression of the B7-related molecule B7-H1 by glioma cells: a potential mechanism of immune paralysis. *Cancer Res* 63: 7462-7467.
- WOLBURG, H., J. NEUHAUS, U. KNIESEL, B. KRAUSS, E. M. SCHMID, M. OCALAN, C. FARRELL, AND W. RISAU. 1994. Modulation of tight junction structure in blood-brain barrier endothelial cells. Effects of tissue culture, second messengers and cocultured astrocytes. *J Cell Sci* 107 (Pt 5): 1347-1357.
- WONG, G. H., P. F. BARTLETT, I. CLARK-LEWIS, F. BATTYE, AND J. W. SCHRADER. 1984. Inducible expression of H-2 and Ia antigens on brain cells. *Nature* 310: 688-691.
- XU, H., J. A. GONZALO, Y. ST PIERRE, I. R. WILLIAMS, T. S. KUPPER, R. S. COTRAN, T. A. SPRINGER, AND J. C. GUTIERREZ-RAMOS. 1994. Leukocytosis and resistance to septic shock in intercellular adhesion molecule 1-deficient mice. *J Exp Med* 180: 95-109.
- YANG, G. Y., C. GONG, Z. QIN, W. YE, Y. MAO, AND A. L. BETZ. 1998a. Inhibition of TNFalpha attenuates infarct volume and ICAM-1 expression in ischemic mouse brain. *Neuroreport* 9: 2131-2134.
- YANG, G. Y., X. H. LIU, C. KADOYA, Y. J. ZHAO, Y. MAO, AND B. L. DAVIDSON. 1998b. Attenuation of ischemic inflammatory response in mouse brain using an adenoviral vector to induce overexpression of interleukin-1 receptor antagonist. *J Cereb Blood Flow Metab* 18: 840-847.
- YU, W. H. 1989. Survival of motoneurons following axotomy is enhanced by lactation or by progesterone treatment. *Brain Res* 491: 379-382.
- ZHANG, R., M. CHOPP, A. GOUSSEV, AND C. POWERS. 1998. Cerebral vessels express interleukin 1-beta after focal cerebral ischemia. *Brain Res* 784: 210-217.

8. Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

Name	Marion Bohatschek
Geburtstag	22. November 1974
Staatsangehörigkeit	Deutsch

SCHULBILDUNG

1981 – 1985	Grundschule an der Münchener Straße, Moosburg a.d. Isar
1985 – 1994	Karl-Ritter-von-Frisch Gymnasium, Moosburg a.d. Isar
1994	Allgemeine Hochschulreife

STUDIUM

1994 – 2001	Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
19.11.2001	Drittes Staatsexamen

BERUFSERFAHRUNG

Jan 2001 – Jun 2001	Research Fellow; Department of Obstetrics & Gynaecology, University College London (London, UK)
Jun 2001 – Dez 2003	Ärztin im Praktikum; Abteilung für Molekulare Neuroonkologie, Hertie Institut für Klinische Hirnforschung, Universität Tübingen (Tübingen)
Jan 2004 – Feb 2005	Research Fellow; Perinatal Brain Protection Centre, University College London (London, UK)
Feb 2005 – Feb 2006	Senior House Officer in General Paediatrics & Neonatal Intensive Care, University Hospital Lewisham (London, UK)
Feb 2006 – Aug 2006	Senior House Officer in Neonatal Intensive Care, King`s College Hospital (London, UK)
Aug 2006 – Feb 2007	Senior House Officer in Paediatric Hepatology & Paediatric Intensive Care, King`s College Hospital (London, UK)
Feb 2007 – Aug 2007	Staff Grade in Paediatric Neurorehabilitation & Neurodisability, Chailey Heritage Clinical Services, University of Brighton (Chailey, UK)
Aug 2007 – Aug 2008	Specialty Registrar 2 in General Paediatrics & Neonatal Intensive Care, Norfolk & Norwich University Hospital (Norwich, UK)
Seit Sep 2008	Specialty Registrar 3 in General Paediatrics & Neonatal Intensive Care, Watford General Hospital (Watford, UK)

PUBLIKATIONEN

Originalarbeiten

Makwana M, Jones LL, Cuthill D, Heuer H, **Bohatschek M**, Hristova M, Friedrichsen S, Ormsby I, Bueringer D, Koppius A, Bauer K, Doetschman T, Raivich G.
Endogenous transforming growth factor beta 1 suppresses inflammation and promotes survival in adult CNS.
J Neurosci. 2007 Oct 17;27(42):11201-13.

Liu ZQ, **Bohatschek M**, Pfeffer K, Bluethmann H, Raivich G.
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. 2005;131(2):283-92

Bohatschek M, Kloss CUA, Pfeffer K, Bluethmann H, Raivich G
B7.2 on activated and phagocytotic microglia in the facial axotomy model: Regulation by interleukin-1 receptor type 1, tumour necrosis factor receptors 1 and 2 and endotoxin
J Neuroimmunol, 2004 Nov;156(1-2):132-45

G Raivich, **M Bohatschek**, C DaCosta, O Iwata, M Galiano, M Hristova, AS Nateri, M Makwana, L Riera-Sans, DP Wolfer, HP Lipp, A Aguzzi, EF Wagner, A Behrens
The AP-1 transcription factor c-Jun is required for efficient axonal regeneration
Neuron, 2004 Jul 8; 43(1):57-67

Bohatschek M, Kloss CU, Hristova M, Pfeffer K, Raivich G.
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 2004 Mar 15;470(4):382-99

Gschwendtner A, Liu Z, Hucho T, **Bohatschek M**, Kalla R, Dechant G, Raivich G.
Regulation, cellular localization, and function of the p75 neurotrophin receptor (p75NTR) during the regeneration of facial motoneurons.
Mol Cell Neurosci. 24(2):307-22.

G. Raivich, **M. Bohatschek**, A. Werner, L.L. Jones, M. Galiano, C.U.A. Kloss, X. Zhu, K. Pfeffer, Z. Q. Liu
Lymphocyte Infiltration in the Injured Brain: Role of Proinflammatory Cytokines.
J of Neurosci Res 72(6):726-33.

Kalla, R., **M. Bohatschek**, C. U. Kloss, J. Krol, X. Von Maltzan and G. Raivich
Loss of microglial ramification in microglia-astrocyte cocultures: involvement of adenylate cyclase, calcium, phosphatase, and Gi-protein systems.
Glia 41(1): 50-63.

Raivich, G., Z. Q. Liu, C. U. Kloss, M. Labow, H. Bluethmann and **M. Bohatschek**
Cytotoxic potential of proinflammatory cytokines: combined deletion of TNF receptors TNFR1 and TNFR2 prevents motoneuron cell death after facial axotomy in adult mouse.
Exp Neurol 178(2): 186-93.

Marion Bohatschek, Alexander Werner, Gennadij Raivich
Systemic LPS injection leads to granulocyte influx into normal and injured brain: Effects of ICAM-1 deficiency.
Exp Neurol 172(1): 137-52

Marion Bohatschek, Christian UA Kloss, Roger Kalla and Gennadij Raivich
In vitro model of microglial deramification: Ramified microglia transform into amoeboid phagocytes following addition of brain cell membranes to microglia-astrocyte cocultures
J Neurosci Res. 64(5):508-22.

Galiano M, Liu ZQ, Kalla R, **Bohatschek M**, Koppius A, Gschwendtner A, Xu S, Werner A, Kloss CU, Jones LL, Bluethmann H, Raivich G.
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(2):327-341.

Kloss CUA. **Bohatschek M**. Kreutzberg GW. Raivich G.
Effect of lipopolysaccharide on the morphology and integrin immunoreactivity of ramified microglia in the mouse brain and in cell culture.
Exp Neurol. 168(1):32-46

Übersichtsarbeit

Raivich G, **Bohatschek M**, Kloss CUA, Werner A, Jones LL, Kreutzberg GW
Neuroglial activation repertoire in the injured brain: graded response, molecular mechanisms and cues to physiological function.
Brain Res Brain Res Rev 30(1) 77-105

9. Danksagung

Zum Schluß möchte ich Herrn Professor Kreuzberg sehr herzlich dafür danken, daß er mir durch seine großzügige Unterstützung und langjährige Förderung die Durchführung dieser Arbeit in seiner Abteilung ermöglicht hat.

Meine besondere Verbundenheit gilt meinem Betreuer, Herrn Professor Raivich, der mir, über die Doktorarbeit hinaus, bei allen wissenschaftlichen Fragen mit Enthusiasmus, enzyklopädischem Wissen und kreativen Ratschlägen zur Seite steht.

Darüber hinaus danke ich meinen ehemaligen Mitdoktoranden, insbesondere Alexander Werner, Leonard Jones und Christian Kloss, die mich mit großer Geduld und Hilfsbereitschaft in die Grundlagen der Arbeitstechniken und Computeranalysen eingeweiht haben. Ihnen, sowie Matthias Galiano und den anderen Mitarbeitern der ehemaligen Abteilung für Neuromorphologie bin ich für die zahllosen freundschaftlichen Diskussionen und das heitere, doch produktive Arbeitsklima dankbar.

Ohne die Hilfe der technischen Assistentinnen Andrea Koppius, Helma Tyrlas, Monika Falkenberg, Dietmute Büringer und Karin Brückner, die mir unzählige praktische Tips gegeben haben, wäre die Arbeit schwer durchführbar gewesen.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinen Eltern, meiner Schwester Sonja und meiner Tante Maria bedanken, die mich all die Jahre vorbehaltlos unterstützt haben.