

Zytokin/Neurotrophin-Interaktionen in der neuronalen Regeneration

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
des Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

Eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Greta Gölz

aus Berlin

September, 2009

1. Gutachter: Prof. Dr. R. Nitsch

2. Gutachter: Prof. Dr. G. Multhaup

Disputation am 18.05.2010

*What really makes science grow is new ideas,
including false ideas*

Sir Karl Popper, 1963

Inhaltsverzeichnis	I
Zusammenfassung	V
Abkürzungsverzeichnis	IX
1. Einleitung	12
1.1. Nervensystem	12
1.1.1. Neuronale Strukturen der Auswuchsmodelle	13
1.1.1.1. Spinalganglien (SG)	13
1.1.1.2. Entorhinaler Kortex (EC)	15
1.2. Nervenwachstum	16
1.3. Neurotrophe Faktoren	17
1.3.1. Neurotrophine	17
1.3.2. Rezeptoren der Neurotrophine	18
1.4. Trk-Rezeptoren	18
1.4.1. Expression der Trk-Rezeptoren auf neuronalen Zellen	18
1.4.2. Struktur der Trk-Rezeptoren	19
1.4.3. Signaltransduktion durch Trk-Rezeptoren	20
1.5. Regeneration im PNS und ZNS	24
1.5.1. Regeneration	24
1.5.2. Regeneration im PNS	25
1.5.3. Regeneration im ZNS	26
1.6. Immunsystem	27
1.6.1. angeborene und adaptive Immunreaktionen	27
1.6.2. Zytokine	28
1.6.3. Zytokinrezeptoren und Signaltransduktion	29
1.6.3.1. Zytokinrezeptoren Superfamilie	29
1.6.3.2. IL-1R/TLR Superfamilie	31
1.6.3.3. Tumornekrosefaktor-Rezeptor Superfamilie	32
1.7. Wechselwirkungen zwischen Zytokinen und dem Nervensystem	33
1.7.1. Zytokine und Entwicklung des Nervensystems	33
1.7.2. Zytokine bei einer Schädigung des Nervensystems	35
1.8. Ziel der Arbeit	38
2. Materialien	40
2.1. Puffer und Kulturmedien	40
2.2. Chemikalien, Zellkulturmedien, Verbrauchsmaterialien und Seren	43

2.3. Zytokine und neurotrophe Faktoren	43
2.4. Antikörper	44
2.5. Taqman-Primer und -Sonden	45
2.6. Kits	45
2.7. Geräte	46
2.8. Software	46
3. Methoden	47
3.1. Dorsale Spinalganglien (SG) als neuronales Auswuchsmodell	47
3.1.1. Präparation der dorsalen Spinalganglien von embryonalen E13 Mäusen	47
3.1.2. Kultivierung organotypischer dorsaler Spinalganglien	48
3.1.3. Charakterisierung der kultivierten dorsalen Spinalganglien	48
3.1.4. Auswertung der organotypischen dorsalen Spinalganglion Kulturen	49
3.2. Entorhinale Kortex-Explantate als neuronales Auswuchsmodell	50
3.2.1. Präparation entorhinaler Kortex-Explantate	50
3.2.2. Kultivierung entorhinaler Kortex-Explantate	51
3.2.3. Auswertung der organotypischen entorhinalen Kortex-Kulturen	51
3.3. Immunhistochemische Färbungen	52
3.3.1. Färbungen an Kryoschnitten	53
3.3.2. Färbungen im Matrigel	53
3.4. Primäre kortikale Einzelzellpräparation zur Analyse von Signaltransduktionswegen	54
3.4.1. Neuronale Zellkultur	54
3.4.2. Gemischte Zellkultur	55
3.4.3. Probenherstellung für die Analyse der Aktivierung Trk-Signalkaskaden	55
3.5. Bestimmung der Zellzahl	56
3.6. Proteinextraktion und Konzentrationsbestimmung	56
3.7. SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)	56
3.8. Proteinnachweis mittels Western-Blot	57
3.8.1. Proteintransfer vom Gel auf eine PVDF-Membran	57
3.8.2. Darstellung von Proteinen über spezifische Antikörper	58
3.8.3. Wiederverwendung von Western-Blot-Membranen	59
3.8.4. Auswertung der Western-Blot-Signale	59
3.9. Durchflußzytometrie/ FACS (<i>fluorescence associated cell sorting</i>)	60

3.10. Analyse der Neurotrophin-Rezeptor Expressionslevel auf mRNA-Ebene	61
3.10.1. Probengewinnung	61
3.10.2. RNA Isolation und cDNA Synthese	62
3.10.2.1. RNA-Isolation	62
3.10.2.2. DNase-Verdau	62
3.10.2.3. cDNA-Synthese	62
3.10.3. Relative Quantifizierung der cDNA durch <i>Real-Time</i> Taqman PCR	62
3.11. Statistische Auswertung	64
4. Ergebnisse	65
4.1. Organotypische Modelle zum Nachweis neuronalen Wachstums nach mechanischen Läsionen	65
4.1.1. Kultivierung von dorsalen Spinalganglien als neuronales Auswuchsmodell für das periphere Nervensystem	65
4.1.1.1. Einfluss von neurotrophen Faktoren auf das Wachstum der dorsalen Spinalganglien	65
4.1.1.2. Einfluss von Zytokinen auf das Wachstum der dorsalen Spinalganglien	68
4.1.2. Kultivierung von entorhinalen Kortex (EC)-Explantaten als neuronales Auswuchsmodell für das zentrale Nervensystem	73
4.1.2.1. Einfluss von Zytokinen auf das neuronale Wachstum der entorhinalen Kortex-Explantate	74
4.2. Neurotrophin-Rezeptor (Trk)-Expression	75
4.2.1. Trk-Rezeptor-Nachweis im peripheren und zentralen Nervensystem auf Protein- und mRNA-Ebene	75
4.2.1.1. Immunhistochemische Färbungen der Trk-Rezeptoren im SG	75
4.2.1.2. Western-Blot-Nachweis der Trk-Rezeptoren in den dorsalen Spinalganglien und den entorhinalen Kortex-Explantaten	77
4.2.1.3. Trk-Rezeptor-mRNA-Expression in dorsalen Spinalganglien und primären kortikalen Einzelzellen	78
4.2.2. Einfluss von Zytokinen auf die Trk-Rezeptor-Expression im peripheren und zentralen Nervensystem	78
4.2.2.1. Trk-Rezeptor-cDNA-Expression in dorsalen Spinalganglien	78
4.2.2.2. Trk-Rezeptor-Protein-Expression in entorhinalen Kortex-Explantaten	80

4.3. Einfluss von Zytokinen auf die Aktivierung der Trk-Rezeptor-Signalkaskaden im zentralen Nervensystem	81
4.3.1. Analyse der Zelltypen in den primären kortikalen Kulturen	81
4.3.2. Einfluss von Zytokinen auf die Aktivierung der Trk-Signalkaskaden in den primären kortikalen Zellkulturen	83
4.3.2.1. Einfluss von Zytokinen auf die Trk-Signalkaskaden in der gemischten primären kortikalen Zellkultur	84
4.3.2.2. Einfluss von Zytokinen auf die Trk-Signalkaskaden in der neuronalen primären kortikalen Zellkultur	86
5. Diskussion	92
5.1. Neuronale Auswachsassays des peripheren und zentralen Nervensystems	92
5.1.1. Neuronaler Auswachsassay des PNS	92
5.1.2. Neuronaler Auswachsassay des ZNS	94
5.2. Einfluss von Zytokinen auf das neuronale Wachstum	94
5.2.1. Effekt von IL-1 β auf das neuronale Wachstum	94
5.2.2. Effekt von IL-6 auf das neuronale Wachstum	97
5.2.3. Effekt von TNF α auf das neuronale Wachstum	99
5.2.4. Effekt von IFN γ auf das neuronale Wachstum	101
5.2.5. Effekt von IL-4 auf das neuronale Wachstum	103
5.3. Zytokin/Neurotrophin Interaktion	106
5.3.1. Einfluss der Zytokine auf die Trk-Rezeptor-Expression	106
5.3.2. Einfluss der Zytokine auf die Trk-Rezeptor-Signalkaskaden	107
5.4. Ausblick	110
6. Literaturverzeichnis	111
7. Anhang	121
Danksagung	121
Publikationen und Poster	122
Lebenslauf	123
Eidesstattliche Erklärung	124

Zusammenfassung

Die Verletzung des Nervensystems kann schwerwiegende Folgen haben. Nach einer Schädigung des zentralen Nervensystems kommt es nur zu einer sehr geringfügigen, meist nicht funktionellen Regeneration und auch im peripheren Nervensystem führt die zwar deutlich bessere Regeneration nicht immer zur Wiederherstellung des ursprünglichen Zustands. Somit sind die neuronalen Regenerationsprozesse ein wichtiger Bestandteil der medizinischen Forschung und Gegenstand dieser Arbeit. Dabei spielt nicht nur das Überleben der verletzten Nervenzellen eine wichtige Rolle, sondern auch das Wiederauswachsen neuronaler Fortsätze sowie die funktionelle Wiederherstellung der neuronalen Verknüpfungen. Das Auswachsen der neuronalen Fortsätze wird sowohl über Oberflächenmoleküle der nicht-neuronalen Zellen, als auch über verschiedenste sezernierte Faktoren, zu denen die Neurotrophine gehören, gesteuert. Da mit einer Verletzung auch die Entstehung einer Immunantwort einhergeht, stellte sich die Frage, ob auch die Botenstoffe der Immunzellen zu den Faktoren gehören, die das Auswachsen der neuronalen Zellen beeinflussen können. Um dieser Frage nachzugehen, wurde ein neuronales organotypisches Auswachsmo­dell von Spinalganglien etabliert. Hierbei zeigte sich, dass die Neurotrophine NGF, NT3 und NT4 im organotypischen Modell ein ähnliches neuronales Wachstumsmuster induzieren, wie es für diese Faktoren in neuronalen Einzelzell-Kulturen bereits beschrieben wurde. Anschließend wurde das neuronale Wachstum unter dem Einfluss ausgewählter Zytokine (IL-1 β , IL-6, TNF α , IFN γ und IL-4) in Kombination mit NGF, NT3 und NT4 analysiert. Um zu untersuchen, ob die Zytokine den gleichen Effekt auf Neurone des zentralen Nervensystems ausüben, wurde das organotypische entorhinale Kortex Auswachsmo­dell zur Analyse herangezogen. In beiden angewandten Modellen zeigte sich, dass die Zytokine das neurotrophinabhängige Wachstum verändern konnten, im PNS und ZNS jedoch unterschiedliche Wirkungen haben können und auch die Konzentration der Zytokine entscheidend für deren Effekt ist. So konnte IL-1 β nur im ZNS-Modell, IFN γ dagegen nur im PNS-Modell in hoher Dosierung das Wachstum steigern. IL-6 steigerte das Wachstum in beiden Modellen, wobei es diesen Effekt im PNS-Modell nur bei geringer Dosierung, im ZNS-Modell jedoch bei hoher Dosierung hervorrufen konnte. TNF α reduzierte das Wachstum im PNS-Modell sowohl in geringer als auch in hoher Konzentration, wohingegen es im ZNS-Modell das Wachstum nur in geringer Dosierung steigern konnte. Im PNS-Modell wurde das Wachstum durch IL-4

unterschiedlich beeinflusst. In niedriger Dosierung kam es zu einer Reduktion, in hoher Dosierung zu einer Stimulation des neuronalen Auswachsens. Weitergehend wurde der Einfluss der Zytokine auf die Aktivierung von bekannten Neurotrophin-Rezeptor-Signalkaskaden in kortikalen Einzelzell-Kulturen untersucht. Hierzu wurde die NT3-abhängige Aktivierung von PLC γ , Akt und MAPKp42/p44 unter dem Einfluss der Zytokine im Western Blot analysiert. Durch IFN γ wurde weder das neuronale Auswachsen noch die NT3-abhängige Aktivierung der Signalkaskaden verändert. Während IL-1 β und TNF α im organotypischen ZNS-Modell eine Steigerung des Auswachsens bewirkten, führten sie in den Einzelzell-Kulturen zu einer verminderten NT3-abhängigen Aktivierung von Akt bzw. PLC γ . Dies lässt vermuten, dass der wachstumssteigernde Effekt der Zytokine durch andere Zellen bzw. auf anderen Wegen als den hier untersuchten Signalkaskaden hervorgerufen wird. Die durch IL-6 hervorgerufene Wachstumssteigerung scheint unabhängig von der NT3-induzierten Aktivierung von PLC γ und Akt zu sein, könnte aber über die MAPK-Signalkaskade vermittelt werden. Durch IL-4 konnte eine verstärkte NT3-abhängige Aktivierung von MAPK induziert werden, die für die beschriebene Stimulation des neuronalen Wachstums durch IL-4 verantwortlich sein könnte.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die hier untersuchten Zytokine das neurotrophinabhängige Wachstum von geschädigten neuronalen Zellen im organotypischen Modell beeinflussen können. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass diese Effekte sowohl vom Neuronentyp als auch von der Zytokin-Konzentration abhängig sind. Für die kortikalen Einzelzellen konnte gezeigt werden, dass diese Modulationen zum einen durch direkte Interaktionen der Zytokine mit den Neurotrophin-Signalkaskaden in Nervenzellen hervorgerufen werden, und zum anderen auch über einen indirekten Einfluss der Zytokine, z.B. auf nicht-neuronale Zellen, bzw. über andere Signalbegebenheiten erfolgen können. Somit scheint die Immunantwort bei einer Verletzung das Regenerationsverhalten der Neurone mit zu beeinflussen. Um diese Einflüsse auch für therapeutische Maßnahmen einsetzen zu können, müssen die Interaktionen der Zytokine auf das neuronale Wiederauswachsen noch detaillierter untersucht werden.

Summary

The injury of the nervous system can have severe consequences. After damage of the central part (CNS) regeneration occurs only marginally and even in the peripheral nervous system (PNS), where regeneration is more pronounced, complete functional recovery can not always be observed. Therefore, neuronal regeneration processes are an important aspect in clinical research. Not only survival of damaged neurons, but also neurite re-growth and functional recovery are of main interest. Neurite outgrowth is conferred by some surface molecules of surrounding non-neuronal cells, as well as by secreted factors, e.g. like the neurotrophins. Since an injury is accompanied by an immune reaction the question in this work was if secreted factors of immune cells could also influence the neurite outgrowth of damaged neurons and if they have similar effects on neurons of the central and peripheral part of the nervous system. As a model for the PNS an organotypic outgrowth assay of dorsal root ganglia (SG) was established and the influence of the neurotrophins NGF, NT3, and NT4, was analysed. The aforementioned neurotrophins induced the same neurite outgrowth pattern in the organotypic outgrowth model as has been described for single cells. For the CNS neurite outgrowth explants from entorhinal cortex (EC) were analysed. The influence of selected cytokines (IL-1 β , IL-6, TNF α , IFN γ , IL-4) on neurite outgrowth was determined. All tested cytokines somehow modulated the neurotrophin dependent outgrowth. IL-1 β stimulated only neurite outgrowth in the CNS model while IFN γ had the same effect only in the PNS model. IL-6 enhanced the outgrowth in both models; in low doses for the DRG neurons and in high doses for the EC neurons. TNF α reduced neurite growth in the PNS model at both concentrations, stimulation in the CNS model occurred only at low doses. IL-4 modulated neurite outgrowth of DRG neurons differently. At low doses, neurite outgrowth was decreased, while at high concentration neurite outgrowth was increased. Since cytokines modulate neurotrophin dependent outgrowth, their influence on some known neurotrophin receptor signaling cascades in single cell cultures of cortical neurons was examined. The NT3 dependent activation of PLC γ , Akt and MAPK after cytokine treatment of the neurons was determined by Western blot. IFN γ had neither effects on the neurite outgrowth, nor on NT3 dependent activation of the analysed signaling cascade members. Although IL-1 β and TNF α stimulated outgrowth in the organotypic CNS model they reduced NT3 dependent activation of Akt and PLC γ , respectively in single cell cultures. Those findings admit

the presumption that growth stimulating modulation of these cytokines is mediated by other effects. The IL-6 induced outgrowth stimulation seemed to be independent of the NT3 conferred activation of PLC γ and Akt but may be negotiated by the MAPK signalling cascade. Treatment with IL-4 results in enhanced NT3 dependent MAPK activation, most likely leading to the stimulation of neurite outgrowth through IL-4.

In conclusion, that the five analysed cytokines all influence the neurotrophin dependent neurite outgrowth of damaged neurons in organotypic outgrowth assays. The cytokines modulate the re-growth dependent on their concentration and on the neuron type. For the cortical single cells it was shown, that the effects can be mediated by direct interaction of cytokines with the neurotrophin receptor signalling cascades as well as by indirect interactions, most likely with non-neuronal cells, or other signalling events.

Hence, the concomitant immune reaction in injured nervous systems seems to have an impact on neuronal regeneration. In order to apply these functions in therapeutical methods, the interaction of the cytokines with the neurite outgrowth needs to be studied in more detail.

Abkürzungsverzeichnis

Akt	Proteinkinase B
APZ	Antigen-präsentierende Zellen
BDNF	<i>brain derived neurotrophic factor</i>
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cysteincluster
CA ²⁺	Calcium-Ione
cAMP	zyklischen Adenosinmonophosphat
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CdC42	<i>Cell division cycle 42</i>
cDNA	komplementäre DNA
CREB	<i>cAMP response element-binding protein</i>
CT	<i>Cycle threshold</i>
DAG	Diacylglycerol
DD	Zelltod-Domäne
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
EC	entorhinaler Kortex
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglykol-bis(aminoethylether)-N,N'-tetraacetat
FADD	Fas-assoziierte-Todes Domänen Protein
FGF	Fibroblasten-Wachstumsfaktoren
FKS	fötales Kälberserum
GEF	<i>guanin-nucleotide exchange factor</i>
GFAP	<i>Glial fibrillary acidic protein</i>
GSK-3 β	<i>glycogen synthase kinase 3β</i>
HBSS	Hank's-gepufferte Salzlösung
HF	hippokampale Formation
HRP	Meerrettichperoxidase
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IGF	Insulin-ähnliche Wachstumsfaktoren
IL	Interleukin
IL-1R	Interleukin-1 Rezeptor
IP3	Inositoltrisphosphat
IRAK	IL-1R-assoziierten Kinase
JAK	Janus-kinase
LRR	Leucin-reiche Region
LTP	Langzeitpotentierung
MAG	myelinassoziiertes Glykoprotein

MAP	mitogenaktivierte Protein
MAPK	mitogenaktivierte Protein Kinase
MEM	<i>Minimum Essential Medium</i>
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
mRNA	<i>messenger Ribonucleic acid</i>
N.	Nervus
NGF	<i>nerve growth factor</i>
NGS	normales Ziegenserum
NHS	normales Pferdeserum
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
NRS	normales Kaninchenserum
NS	Nervensystem
NT	Neurotrophine
NT3	Neurotrophin-3
NT4	Neurotrophin-4
OMgp	oligodendrozytäres Myelin Glykoprotein
p	postnatal
p75 ^{NTR}	p75-Neurotrophin-Rezeptor
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PC12	pheochromocytoma Zellen
PCR	Polymerasekettenreaktion
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinasen
PKC	Proteinkinase C
PLC γ 1	Phospholipase C γ 1
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PNS	peripheres Nervensystem
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Rac	<i>Ras-related C3 botulinum substrate</i>
RhoA	<i>Ras homologous member</i>
RIP	Rezeptor-interagierende Protein
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
R-PE	R-Phycoerythrin
RT	reverse Transkriptase
SDS	Natriumdodecylsulfat
SG	Spinalganglion
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
Tc-Zellen	zytotoxische T-Zellen
TG	Trigeminganglion
TGF	Transformierende Wachstumsfaktoren
Th-Zellen	T Helfer-Zellen

TLR	<i>Toll-like Receptor</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
TNF-R	Tumornekrosefaktor-Rezeptor
TRAF	TNF-Rezeptor assoziierten Faktoren
Trk	<i>tropomyosin-related kinases</i>
ZNS	zentrales Nervensystem

1. Einleitung

Die komplexen Vorgänge der Regeneration nach einer Verletzung des Nervensystems (NS) sind noch nicht bis ins letzte Detail verstanden. Heutzutage sind viele Faktoren, die das Regenerationsverhalten beeinflussen, wie z.B. die Expression verschiedener extrazellulärer Matrixmoleküle durch die Bindegewebszellen, die Sekretion von Wachstumsfaktoren sowie diverse neuronale Signalkaskaden beschrieben. Durch eine Verletzung kommt es nicht nur zur direkten Schädigung der Zellen, sondern auch zur Aktivierung des Immunsystems. Die ausgelöste Immunreaktion dient primär der Eliminierung von eingedrungenen Fremdkörpern und abgestorbenen Zellen. Hier stellt sich die Frage, ob – und wenn ja, wie – Botenstoffe der Immunzellen auch das Wiederauswachsen von verletzten Nervenzellen modulieren könnten. Im Folgenden sollen deshalb Einblicke in das Nervensystem und Immunsystem sowie in einige bekannte Interaktionen zwischen diesen Systemen gegeben werden.

1.1. Nervensystem

Über das Nervensystem kommt es zur Wahrnehmung von Reizen und zur koordinierten Reaktion auf diese Informationen. In höheren Organismen wird es in das zentrale (ZNS) und periphere (PNS) Nervensystem unterteilt. Zu dem ZNS werden das Gehirn und Rückenmark zusammengefasst, alle neuronalen Bereiche außerhalb des ZNS werden als PNS bezeichnet. Das ZNS gliedert sich in die graue Substanz (Zellkörper der Neurone) und die weiße Substanz (Zellfortsätze der Neuronen). Das PNS besteht zu einem Großteil aus Zellfortsätzen, deren Zellkörper im ZNS liegen. Es sind jedoch auch Zellkörper von Neuronen im peripheren Nervensystem vorhanden, welche in den Spinalganglien und vegetativen Ganglien liegen. Das Nervensystem setzt sich aus Nerven- und Gliazellen zusammen, wobei die Gliazellen als Binde- bzw. Stützgewebe dienen und sich im PNS und ZNS unterscheiden. Im PNS besteht das Stützgewebe hauptsächlich aus Schwann-Zellen, welche die neuronalen Fortsätze ummanteln (Markscheide). Im ZNS setzen sich die Gliazellen aus Astrozyten (Stützfunktion, Austausch von Nährstoffen und Stoffwechselprodukten, Blut-Hirn-Schranke), Oligodendrozyten (Ummantelung der neuronalen Fasern), Mikroglia (Makrophagen) und Ependymzellen (Trennung von Liquor und Hirngewebe) zusammen (Trepel 2008).

Nervenzellen bestehen aus dem Zellkörper (Perikaryon), der den Zellkern enthält und einem oder mehreren Fortsätzen (Neuriten). Die Fortsätze werden in Dendriten und Axone unterteilt. Während die Dendriten für die Aufnahme eines Reizes verantwortlich sind, dient das Axon der schnellen Weiterleitung eines Reizes. Es gibt vier unterschiedliche Neuronentypen. Multipolaren Neurone besitzen ein Axon und mehrere Dendriten, die ihren Ursprung am Zellkörper haben, wohingegen bipolare Neurone ein Axon und einen Dendriten aufweisen. Bei den pseudounipolaren Neuronen entspringt nur ein Fortsatz aus dem Zellkern, der sich in einen dendritischen und axonalen Teil aufspaltet. Unipolaren Neuronen fehlt der Dendrit (Trepel 2008).

1.1.1. Neuronale Strukturen der Auswachsmodele

Im Folgenden werden die Spinalganglien und der entorhinale Kortex, die in dieser Arbeit im Rahmen neuronaler Auswachsmodele untersucht wurden, näher beschrieben.

1.1.1.1. Spinalganglien (SG)

Die Spinalganglien liegen im Zwischenwirbelloch und werden von einer Ausstülpung der Rückenmarkshäute umschlossen. In den Spinalganglien liegen die Zellkörper der sensorischen Nervenzellen (Abb. 1). Es handelt sich hierbei um pseudounipolare Neurone, die aus bipolaren Vorläuferzellen entstehen. Während der weiteren Entwicklung kommt es zur Vermehrung des Zytoplasmas sowie einer exzentrischen Verlagerung des Zellkerns und die beiden Fortsätze rücken näher zusammen. Sie verschmelzen zu einem gemeinsamen Stamm, der sich in einiger Entfernung vom Perikaryon in ein zentrales und peripheres Axon teilt. Beide Fortsätze weisen die Feinstruktur von Axonen auf und besitzen eine Markscheide. Die zentralen Fortsätze bilden im Rückenmark die Hinterwurzel, die peripheren Fortsätze bilden zusammen mit den Fasern der Vorderwurzel (motorische Fasern) den Spinalnerv. Über den peripheren Teil des Neuriten werden Signale aus der Haut, den Eingeweiden sowie der Muskulatur aufgenommen und direkt an den zentralen Teil des Neuriten weitergeleitet. Im ZNS erfolgt die Übertragung des Signals auf sekundäre Neurone, welche das Signal zur weiteren Verarbeitung im ZNS verteilen. In jedem SG sind Neurone vorhanden, welche Haut, Muskeln und Eingeweide innervieren (Kirstein et al. 2002).

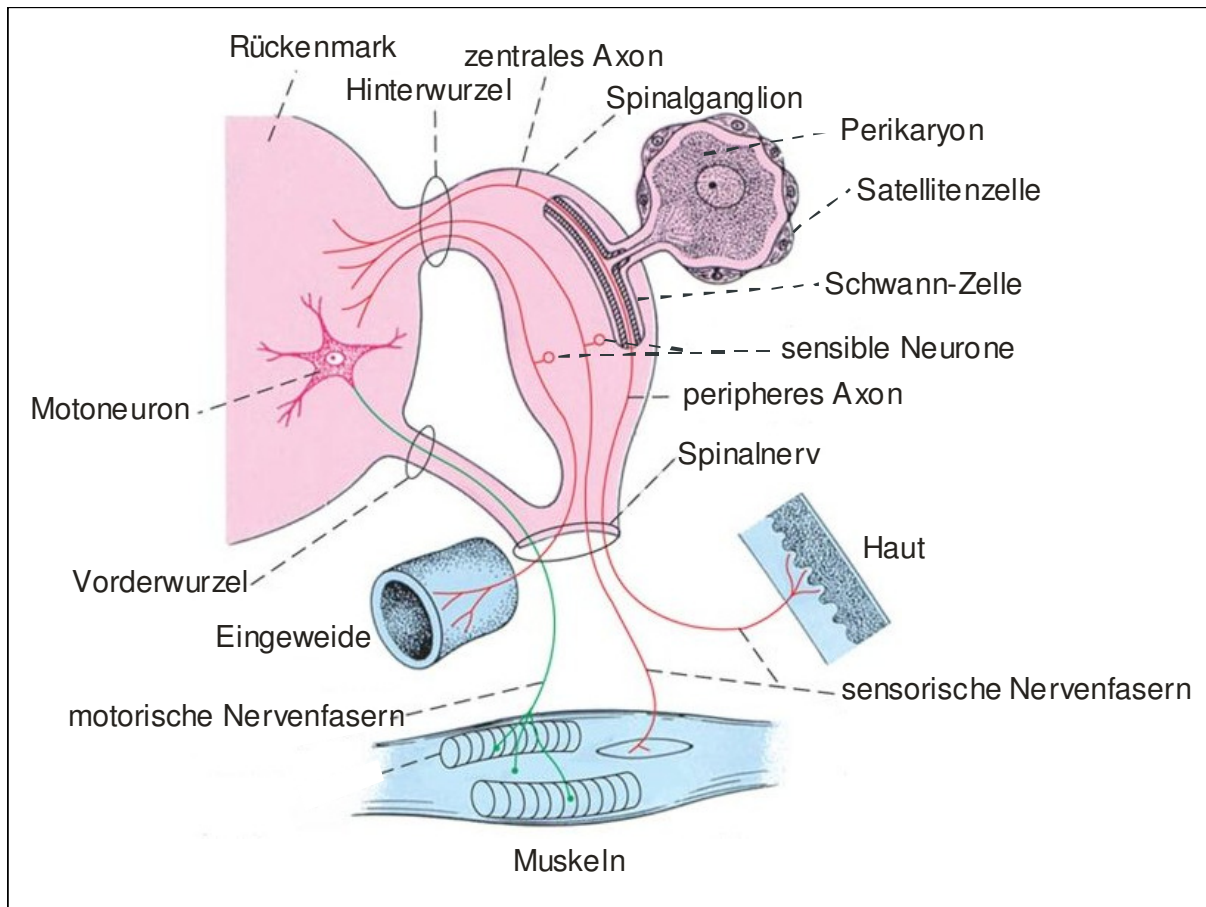


Abb.1: Spinalganglion mit sensiblen und motorischen Nervenfasern (modifiziert nach Waldeyer)

Periphere Sinnesreize aus der Haut, den Eingeweiden und der Muskulatur werden über sensorische Nervenfasern ins ZNS weitergeleitet, dort umgeschaltet und über die motorischen Fasern zurück in die Peripherie transportiert, wo sie in den Zielorganen eine Reaktion hervorrufen.

Über die sensorischen Fasern können verschiedenen Wahrnehmungen erfolgen. Zum einen führen unterschiedliche Rezeptoren in der Haut zur Wahrnehmung von Druck (Mechanorezeptoren), Temperatur (Thermorezeptoren) und Schmerz (Nocizeptoren). Über Propriozeptoren in der Muskulatur, Sehnen etc. kommt es zur Wahrnehmung der Position des Körpers, von Bewegung, tiefem Schmerz und Druck. Zum anderen kommt es über die interozeptiven Rezeptoren in den Eingeweiden und Gefäßwänden zu mechanischen, chemischen und thermischen Wahrnehmungen, die für die Regulierung der Funktionen der inneren Organe und Gefäße von Bedeutung sind (Anatomie Bennighoff 1994). Neurone mit dem größten Zellkörperdurchmesser und stark myelinisierten Axonen sind in der Regel propriozeptiv. Neurone mit den geringsten Durchmesser des Zellkörpers haben meist unmyelinisierte oder nur sehr gering myelinisierte Axone und sind nocizeptiv, wohingegen die Axone von Neuronen

mit mittlerem Zellkörperdurchmesser oftmals stark myelinisiert sind und verschiedene Rezeptoren in der Haut innervieren (Kirstein et al. 2002). Die zentralen Fortsätze der nocizeptiven Neurone wachsen nur über eine kurze Distanz von ein bis zwei Segmenten nach der Eintrittsstelle weiter und enden in der äußeren Schicht der Hinterwurzel. Dagegen wachsen die Fortsätze der propriozeptiven Fasern weiter in das Rückenmark ein oder enden in den tieferen Schichten in der Hinterwurzel (Donnerer et al. 2003).

1.1.1.2. Entorhinaler Kortex (EC)

Das Großhirn lässt sich in zwei Hemisphären gliedern, die sich aus der äußeren Großhirnrinde (Kortex) und den im Marklager befindlichen Kernen (Basalganglien) zusammensetzt. Die Großhirnrinde wird entwicklungsgeschichtlich in drei Kategorien unterteilt, den Paleokortex (Strukturen des Riechhirns), Archikortex (Hippokampus) und Neokortex (alle anderen Kortexareale).

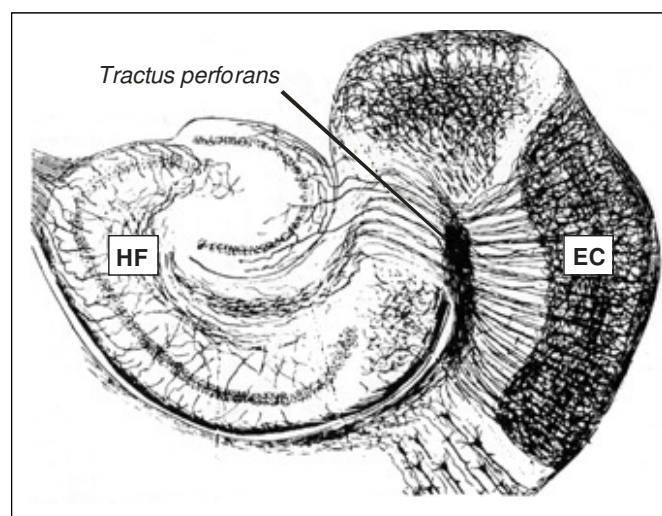


Abb.2: Entorhinale-hippocampale Formation (modifiziert nach Cayal 1901)

Schematische Darstellung des entorhinalen Kortex (EC) mit seinen Afferenzen (*Tractus perforans*) in die hippocampale Formation (HF).

Der Neokortex nimmt beim Menschen fast die gesamte Hemisphärenoberfläche ein und setzt sich aus zwei Haupttypen von Neuronen zusammen, den Pyramidenzellen (Projektionsneurone, ca. 85%) und den Nicht-Pyramidenzellen (Interneurone, ca. 15%). Er weist eine typische sechsschichtige Architektur auf. Die äußerste Schicht (Lamina) I enthält wenig neuronale Zellen aber viele Fortsätze sowie viele Gliazellen. In der Lamina II (äußere Körnerschicht) sind viele kleine Zellen vorhanden (Interneurone und Pyramidenzellen). Die Lamina III (äußere Pyramidenzellschicht)

enthält große Zellen, die sehr locker verteilt sind. In der Lamina IV (innere Körnerzellschicht) sind vorwiegend Interneurone und in der Lamina V (innere Pyramidenzellschicht) vorwiegend große Pyramidenzellen lokalisiert. In der Lamina VI (Spindelzellschicht) befinden sich polymorphe Zellen, viele Interneurone und modifizierte Pyramidenzellen (Trepel 2008). Der entorhinale Kortex (EC) ist eine kleine Region des Neokortex, der im medialen Temporallappen liegt und Teil des limbischen Systems ist, das für zahlreiche emotionale, intellektuelle und triebhafte Leistungen mitverantwortlich ist. Er wird als Knotenpunkt zwischen der hippocampalen Formation und verschiedenen Feldern des Kortex beschrieben (Canto et al. 2008). In der Lamina IV sind im EC keine Zellkörper lokalisiert und sie wird hier auch als Lamina dissecans bezeichnet (Canto et al. 2008). Über den *Tractus perforans* stellen die Axone der Pyramidenzellen aus der Lamina II und III des EC die wichtigsten Innervationen des Hippokampus her (Abb. 2) (Amaral et al. 1989).

1.2. Nervenwachstum

Das Zytoskelett der Nervenzellen setzt sich aus unterschiedlichen Proteinfilamenten zusammen. Actin-Filamente bilden eine flexible Struktur, sind an der Plasmamembran konzentriert und geben der Zelle ihre äußere Gestalt. Die starrereren Mikrotubuli sind für den intrazellulären Transport und die Lokalisierung von membranständigen Organellen verantwortlich, Intermediär-Filamente geben der Zelle ihre mechanische Stabilität (Alberts 2008).

Das Wachstum neuronaler Fortsätze findet in den Wachstumskegeln statt, die sich am Ende eines jeden Fortsatzes befinden. In der Membran der Wachstumskegel befinden sich viele verschiedene Rezeptoren, über die das Wachstum gesteuert werden kann. Zum einen wird das Wachstum von den Oberflächenmolekülen des Substrates, auf dem die Zelle wächst, und zum anderen von vielen löslichen Faktoren in der Umgebung beeinflusst. Die Elongation der Nervenfasern hängt sowohl von der Dynamik und Struktur der Actin-Filamente als auch der Mikrotubuli im Wachstumskegel ab. Über unterschiedliche intrazelluläre Regulatoren kommt es zum Auf- und Abbau der Actin-Filamente (Alberts 2008). Beispielsweise sind die kleinen Rho GTPasen *Ras-related C3 botulinum substrate* (Rac), *Cell division cycle 42* (Cdc42) und *Ras homologous member A* (RhoA) sind an der Bildung des Actin-Zytoskeletts beteiligt (BurrIDGE et al. 2004). Diese GTPasen regulieren lokal

Polymerisation und Depolymerisation des Actin Zytoskeletts, wobei Rac und Cdc42 die Polymerisation und RhoA die Depolymerisation der Actin-Filamente induzieren (Nikolic et al. 2002), indem sie die Aktivierung der Actin-bindenden Proteine ADF/Cofilin regulieren (Meberg 1998). Die Aktivierung von ADF/Cofilin kann jedoch auch unabhängig von den kleinen Rho GTPasen reguliert werden (Meberg 1998).

1.3. Neurotrophe Faktoren

Zu den löslichen Faktoren, die das Wachstum der neuronalen Fortsätze stimulieren können, gehören die neurotrophen Faktoren. Diese beeinflussen nicht nur das Auswachsen der Nervenzellen, sondern auch deren Differenzierung, synaptische Plastizität, Neurotransmission sowie das Überleben der Zellen. Meist können sie nicht nur auf Neurone, sondern auch auf andere Zelltypen einwirken (Lykissas 2007). Zu den neurotrophen Faktoren gehören die Neuropoetische Zytokine, Fibroblasten-Wachstumsfaktoren FGF, Transformierende Wachstumsfaktoren TGF, Insulin-ähnliche Wachstumsfaktoren (IGF) sowie die Neurotrophine (NT) (Lykissas 2007), auf die im Weiteren näher eingegangen wird.

1.3.1. Neurotrophine

Zur Klasse der Neurotrophine in Säugetieren gehören der *nerve growth factor* (NGF), *brain derived neurotrophic factor* (BDNF), Neurotrophin-3 (NT3) und Neurotrophin-4 (NT4) (Huang et al. 2001). Sie weisen eine hohe Homologie in ihren Aminosäuresequenzen auf. Ihr Vorhandensein innerhalb anderer Spezies spricht dafür, dass sie alle aus einem ursprünglichen Vorläufergen entstanden sind (Hallböök 1999). Als erster Faktor wurde NGF als sezerniertes Protein beschrieben, welcher das Überleben und Auswachsen von sympathischen und sensorischen Neuronen steigerte (Levi-Montalcini und Hamburger 1954). Als nächstes wurden BDNF (Barde et al. 1982), NT3 (Hohn et al. 1990) und schließlich NT4 (Ip et al. 1992) beschrieben. Neurotrophe Faktoren werden als Pro-Formen mit ca. 200 Aminosäuren synthetisiert; durch Proteolyse der N-terminalen Pro-Domäne entsteht das ‚reife‘ Protein mit ca. 120 Aminosäuren (Ernfors 2001). Diese Neurotrophin-Proteine bilden über nicht-kovalente Bindungen homodimere Komplexe (Lewin et al. 1996) und werden von der Zelle sezerniert. Neurotrophine werden von verschiedensten Zellen wie z.B. Neuronen, Schwann-Zellen, Astrozyten, Fibroblasten, Mikroglia, Mastzellen, Makrophagen, B- und T-Zellen, enterischen Gliazellen, Haut- und Muskelzellen synthetisiert (Das et al. 2001, Ernfors et al. 2001,

Oren et al. 2004, Hattori et al. 1993, Heese et al. 1998, Leon et al. 1994, Kerschensteiner et al. 1999, Braun et al. 1998, Hendrix et al., in Revision, von Boyen et al. 2006, Bläsing et al. 2005, Sherer et al. 1998). Ihre Expression kann durch diverse Faktoren, wie z.B. Schilddrüsen-Hormone (Koibuchi et al. 1999), Steroide (Toran-Allerand et al. 1999), inflammatorische Zytokine (Lindholm et al. 1987) sowie durch andere Faktoren beispielsweise TGF β (Buchman et al. 1994) reguliert werden.

1.3.2. Rezeptoren der Neurotrophine

Neurotrophe Faktoren aktivieren sowohl die Rezeptoren der *tropomyosin-related kinases* (Trk), die zu den Tyrosinkinasen gehören, als auch den p75-Neurotrophin-Rezeptor (p75^{NTR}; TNF-R2), der zur Klasse der Tumornekrosefaktor-Rezeptor Superfamilie zählt. Der p75^{NTR} ist in der Lage, sowohl die Pro-Formen als auch die ausgereifte Form der Neurotrophine zu binden (Lee et al. 2001). Über den p75^{NTR} Rezeptor werden zum einen Signalwege reguliert, die das Überleben der Zellen steuern, zum anderen kann er die Affinität der Trk-Rezeptoren zu ihren Liganden beeinflussen (Lee et al. 2001). Trk-Rezeptoren können nur über die ausgereiften Formen der Neurotrophine aktiviert werden. NGF bindet als Ligand mit hoher Affinität den TrkA-Rezeptor, BDNF und NT4 stellen hoch-affine Liganden des TrkB-Rezeptors dar, NT3 bindet dagegen mit hoher Affinität den TrkC-Rezeptor sowie mit geringerer Affinität an die TrkA- und TrkB-Rezeptoren (Huang et al. 2003).

1.4. Trk-Rezeptoren

1.4.1. Expression der Trk-Rezeptoren auf neuronalen Zellen

Die drei Trk-Rezeptoren werden auf unterschiedlichen Neuronen exprimiert. So sind die TrkB- und TrkC-Rezeptoren hauptsächlich auf Neuronen exprimiert, die spezifischere dendritische und axonale Felder innervieren und der TrkA-Rezeptor auf Neuronen, die größere, überlappende dendritische Felder mit heterogenen Verbindungen innervieren. Sowohl TrkB- als auch TrkC-Rezeptoren sind nahezu auf allen neuronalen Zellen des ZNS sowie auf den Mechanorezeptoren im Innenohr, den propriozeptiven Neuronen der Spinal- und Trigeminale Ganglien sowie den vestibularen und cochlearen Ganglien exprimiert. TrkA-Rezeptoren sind auf den nocizeptiven Neuronen der Spinalganglien und Trigeminale Ganglien sowie auf den Neuronen der sympathischen Ganglien, den cholinergen Neuronen im basalen Vorderhirn und einigen Neuronen im Hirnstamm exprimiert (Bartheld et al. 2006). In

den genicularen, petrosalen und nodosalen Ganglien sind alle drei Trk-Rezeptoren exprimiert (Bartheld et al. 2006).

Im Laufe der Entwicklung verändern die Neurone der Spinalganglien ihre Trk-Rezeptor-Expressionsmuster. Haben die neuronalen Fortsätze noch keinen Kontakt zu ihrem Innervationsort, so exprimieren fast alle Zellen den TrkC-Rezeptor. Nach Innervation des Zielorgans kommt es in der Mehrzahl der Zellen zu einem Expressionswechsel von TrkC zu TrkA (Molliver et al. 1997, Kirstein et al. 2002). Die kleinen nocizeptiven Neurone exprimieren hauptsächlich den TrkA-Rezeptor, die mittleren taktilen Neurone den TrkB-Rezeptor und die großen propriozeptiven Neurone den TrkC-Rezeptor (Edström et al. 1996).

1.4.2. Struktur der Trk-Rezeptoren

Die spezifischen Neurotrophin-Rezeptoren werden in die drei Formen TrkA, TrkB und TrkC unterteilt, die sich durch die Spezifität des Liganden und leichte strukturelle Abweichungen unterscheiden. Die grundlegende Struktur ist in Abb. 3 dargestellt. In der extrazellulären Domäne befinden sich zwei Cystein-Cluster (C), eine Leucinreiche Region (LRR) und zwei Immunglobulin-ähnliche (Ig) Bereiche (Schneider et al. 1991), gefolgt von einem einzelnen transmembranösen Bereich. Intrazellulär befindet sich eine Tyrosinkinase-Domäne sowie mehrere Tyrosin-haltige Motive (Huang et al. 2003). Sowohl im extra- als auch im intrazellulären Bereich können unterschiedliche Insertionen auftreten. Eine kurze Insertion in den extrazellulären, membranangrenzenden Bereich der TrkA- und TrkB-Rezeptoren führt dazu, dass sie nicht nur über die spezifischen Liganden NGF bzw. BDNF und NT4 aktiviert werden können, sondern darüber hinaus auch durch NT3 (Clary et al. 1994, Strohmaier et al. 1996). Weiterhin gibt es für TrkB- und TrkC-Rezeptoren unterschiedliche Spleißvarianten, wobei in den kurzen Spleißvarianten meist die Tyrosinkinase-Domäne fehlt. Die kurzen Spleißvarianten können unterschiedliche Funktionen haben. Zum einen dienen sie als Inhibitoren der Trk-Signalkaskaden, da sie die Dimerisierung der langen Varianten verhindern (Eide et al. 1996), zum anderen können über sie auch Signalkaskaden aktiviert werden (z.B. über Rac1) (Baxter et al. 1997, Esteban et al. 2006). Die Bindung der neurotrophen Faktoren erfolgt über die zweite Ig-Domäne (Urfer et al. 1995).

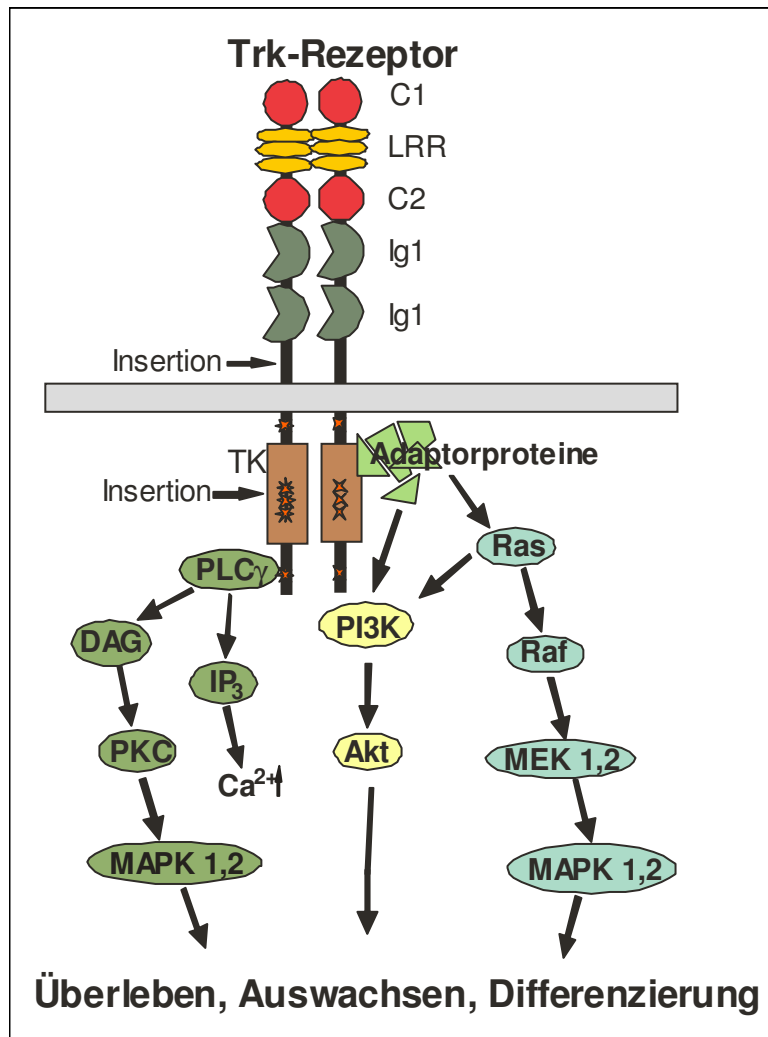


Abb. 3: Schematische Darstellung der Trk-Rezeptoren und ihrer Signalkaskaden.

(Modifiziert nach Huang et al. 2003)

Der extrazelluläre Teil der Trk-Rezeptoren besteht aus Cystein-Clustern (C), Leucin-reichen Regionen (LRR) und Immunglobulin-ähnlichen (Ig) Domänen. Im intrazellulären Teil befindet sich eine Tyrosinkinase-Domäne und weitere Tyrosine, über die verschiedene Signalkaskaden aktiviert werden können, die das neuronale Überleben, Auswachsen und die Differenzierung steuern.

Für die Aktivierung der unterschiedlichen Signalkaskaden ist die Ausbildung von Rezeptordimeren notwendig, die durch die Bindung der Neurotrophine induziert wird. Bei der Dimerenbildung sind alle Bereiche im extrazellulären Teil beteiligt.

1.4.3. Signaltransduktion durch Trk-Rezeptoren

Als Signaltransduktion wird die Umwandlung eines extrazellulären Signals in intrazelluläre biochemische Prozesse bezeichnet. Dies kann durch membranständige Rezeptorproteine erfolgen, die durch die Bindung eines extrazellulären Liganden aktiviert werden und dieses Signal über verschiedenste Kaskaden in die Zelle weiterleiten, wo es als Reaktion zur veränderter Genexpression und Proteinsynthese,

sowie zu Veränderungen des Zytoskeletts kommen kann (Janeway 2008). Im Folgenden werden einige Signalkaskaden beschrieben, die durch die Bindung von neurotrophen Faktoren an den Trk-Rezeptor ausgelöst werden. Es handelt sich hierbei um Signalkaskaden, die auch durch andere Rezeptor/Liganden-Interaktionen ausgelöst werden können.

Die Dimerisierung des Trk-Rezeptors führt zur Autophosphorylierung verschiedener Tyrosine im intrazellulären Bereich und resultiert in der Phosphorylierung und Aktivierung verschiedener zytoplasmatischer Signalmoleküle, die durch Ras, Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K) und die Phospholipase $C\gamma 1$ ($PLC\gamma 1$) gesteuert werden. Über verschiedenste Adaptorproteine kann Ras (gehört zur Familie der kleinen G-Proteine) aktiviert werden, welches wiederum die MAP (mitogenaktivierte Protein) Kinasen-Kaskade aktivieren kann (Abb. 3). MAP-Kinasen sind kleine Proteine (42-56 kDa), die an einem Tyrosin- und Threoninrest phosphoryliert werden (Pearson et al. 2001). Am Anfang der MAP-Kaskade wird die MAP3K (z.B. Raf) aktiviert, welche wiederum die MAP2K (z.B. MEK) aktiviert und schließlich die Aktivierung der MAPK (z.B. MAPKp42/p44) zur Folge hat (English et al. 1999). Über die MAP-Kinasen können weitere Proteinkinasen wie z.B. Rsk1/2, Mnk1/2, die Phospholipase A_2 und Transkriptionsfaktoren wie z.B. CREB, c-Jun, c-FOS und STAT aktiviert werden. Die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren erfolgt nach der Translokation der MAP Kinasen in den Zellkern (Pearson et al. 2001). Diese Signalkaskaden sind am neuronalen Auswachsen von PC12-Zellen (Cowley et al. 1994), sympathischen Neuronen (Atwal et al. 2000), SG-Neuronen (Markus et al. 2002a) und kortikalen Neuronen (Hao et al. 2004), sowie an der Regulierung der Differenzierung und an der Steuerung des Überlebens beteiligt (Huang et al. 2001). Die Aktivierung der PI3K kann sowohl Ras-abhängig (Vaillant et al. 1999) als auch Ras-unabhängig (Yamada et al. 1997, Holgado-Madruga 1997) über verschiedene Adaptorproteine erfolgen (Abb. 3). Unter anderem führt die Aktivierung der PI3K zur Bildung von phosphoryliertem Inositoltrisphosphat (PIP_3), welches die Proteinkinase B (Akt) aktiviert, die wiederum die *glycogen synthase kinase 3 β* (GSK-3 β) inhibiert und somit zur Axon-Elongation beiträgt (Cosker et al. 2007). Die Aktivierung von Akt ist notwendig, um das Auswachsen in der Tumorzelllinie PC12 (Kim et al. 2004), sympathischen Neuronen (Atwal et al. 2000), SG-Neuronen (Zhou et al. 2004) und hippokampalen Neuronen (Cosker et al. 2008) zu steuern. Des Weiteren ist Akt ein wichtiges Molekül in den Signalkaskaden, die für das Überleben der Zellen

verantwortlich sind (Reichardt et al. 2006). PLC γ 1 wird direkt über den Trk-Rezeptor aktiviert (Abb. 3) und führt zur Bildung der *second messenger* Inositoltrisphosphat (IP $_3$) und Diacylglycerol (DAG). Über IP $_3$ wird die Freisetzung von zytoplasmatisch gespeicherten Calcium-Ionen (Ca $^{2+}$) reguliert, was zu einer erhöhten Sensibilität gegenüber mechanischen und temperaturabhängigen Reizen führt. Weiterhin können IP $_3$ und DAG verschiedene Ca $^{2+}$ -abhängige Enzyme wie z.B. Proteinkinase C (PKC)-Isoformen aktivieren, die zu einer Ras-unabhängigen Aktivierung von MEK1/2 und MAPKp42/p44 führen können (Corbit et al. 1999). PLC γ 1 ist an der Regulierung des Auswachsens von PC12-Zellen (Kiss et al. 2006, Nishimura et al. 2008) beteiligt.

Je nach Zelltyp können alle Signalkaskaden das Überleben, Auswachsen und die Differenzierung der neuronalen Zellen beeinflussen (Patapoutian et al. 2001, Huang et al. 2003, Reichardt et al. 2006). Über diese Signalkaskaden wird auch die Aktivität von verschiedenen G-Proteinen bzw. deren Austausch-Faktoren (*guanin-nucleotide exchange factors*, GEFs) gesteuert, die ebenfalls neuronales Wachstum regulieren (Liu et al. 2001). So kann Rac über PLC γ , PKC und PI3K aktiviert werden (Burrige et al. 2004), was wiederum zur Polymerisation der Actin-Filamente führt und zum anderen kann MAPK auch ohne die kleinen Rho GTPasen auf ADF/Cofilin wirken (Meberg et al. 1998).

Im Gegensatz zu vielen anderen Tyrosinkinase-Rezeptoren können die Trk-Rezeptoren nach der Internalisierung auch retrograd transportiert werden (Ginty et al. 2002). Für das Neurotrophin-gesteuerte axonale Wachstum wird sowohl der retrograden Transport der Signale in den Zellkern benötigt, um die notwendigen Veränderungen der Genexpression zu steuern, als auch die lokale Aktivierung der Signalkaskaden, die den Zusammenbau des Zytoskeletts steuern (Markus et al. 2002). Die Internalisierung des NGF/TrkA-Komplexes führt in SG-Neuronen, sympathischen Neuronen und PC12-Zellen zur Aktivierung der MAP-Kinase Erk (York et al. 2000, Howe et al. 2001, McInnis et al. 2002, Zheng et al. 2008), in TrkA-transfizierten kortikalen Neuronen hingegen zur Aktivierung von Akt (Zheng et al. 2008). Auch die Internalisierung des BDNF/TrkB-Komplexes führt in den kortikalen Neuronen zur Aktivierung von Akt (Zheng et al. 2008). Dies zeigt, dass durch die Internalisierung des Trk-Rezeptors in den Neuronen des peripheren Nervensystems die Aktivierung von Erk und in den Neuronen des zentralen Nervensystems die Aktivierung von Akt erfolgen kann.

Die oben beschriebenen Signalkaskaden werden von allen drei Trk-Rezeptoren aktiviert. Wie kann es nun dazu kommen, dass manche Zellen unterschiedlich auf den gleichen Stimulus reagieren? Die Ergebnisse von Zheng et al. (2008) sprechen dafür, dass nicht nur der exprimierte Trk-Rezeptor ausschlaggebend für die Aktivierung der unterschiedlichen Signalkaskaden ist, sondern noch andere Moleküle in der Zelle die Aktivierung der Signalkaskaden steuern. Eine Regulation, zu welchem Zeitpunkt eine Signalkaskade aktiviert wird, und welche Folgen dies für die Zelle hat, kann durch die unterschiedlichen Adaptorproteine beeinflusst werden. Mittlerweile sind über 20 verschiedene Adaptorproteine beschrieben worden, die an den Trk-Signalkaskaden beteiligt sein können (Arevalo et al. 2006). Da in den unterschiedlichen Zelltypen verschiedenen Adaptormoleküle vorhanden sind, kommt es zur differenzierten Regulation der NT/Trk Interaktion in jeder Zelle (Huang et al. 2003). Die Adaptorproteine können sich nicht nur in den verschiedenen Zellen unterscheiden, sondern sind überdies innerhalb einer Zelle an unterschiedlichen Stellen lokalisiert. So kann z.B. eine kurzfristige Aktivierung von Erk durch die Ras-Raf-Mek-Kaskade durch das Adaptorprotein Shc (Nimnual et al. 1998) und eine langanhaltende Aktivierung durch die Rap-Raf-Mek-Kaskade durch das Adaptorprotein FRS-2 erfolgen (Kao et al. 2001). Die Aktivierung von Ras durch Shc erfolgt an der Zellmembran, wohingegen die Aktivierung von Rap durch FRS-2 in den Endosomen erfolgt und somit die Internalisierung des NT/Trk-Komplexes erforderlich ist (York et al. 2000). FRS-2 ist hauptsächlich in *lipid rafts* in der Membran lokalisiert, der Transport des NT/Trk-Komplexes dorthin benötigt einige Zeit. Kommt es zur schnellen Internalisierung der NT/Trk-Komplexes, kann die Interaktion mit FRS-2 nicht stattfinden, und nur der Shc Weg wird aktiviert. Dies zeigt, dass sowohl durch die Internalisierung als auch durch den Transfer der Trk-Rezeptoren in unterschiedliche Membrankompartimente die Effektivität und Dauer der Trk-induzierten Signalkaskaden gesteuert werden kann.

Die Vernetzung der unterschiedlichen Signalkaskaden, die durch die Trk-Rezeptoren aktiviert werden können, und die verschiedenen Reaktionen, die sie in den Zellen hervorrufen, sind jedoch noch weitaus komplexer als hier dargestellt und bislang noch nicht bis ins letzte Detail verstanden.

1.5. Regeneration im PNS und ZNS

1.5.1. Regeneration

Die Schädigung des Nervensystems führt zur Degeneration des Gewebes, die mit dem Zelltod der geschädigten Zellen und der anschließenden Regeneration des Gewebes einhergeht. Kommt es auf Grund einer Verletzung des Nervensystems zur Unterbrechung der Reizleitungen, können dauerhafte Schäden entstehen. Schäden des ZNS können nur sehr rudimentär behoben werden, wohingegen das Regenerationsverhalten im PNS deutlich höher ist. Aber auch hier kommt es nach Verletzungen oftmals nicht zur korrekten Re-Innervation. Die Regeneration von verletzten Nervenbahnen kann durch verschiedene Mechanismen erfolgen. Zum einen können Axone von intakten Neuronen in das denervierte Gebiet einwachsen und zum anderen kann regeneratives Auswachsen der verletzten Neuronen erfolgen (Cui et al. 2006). Ob eine verletzte Nervenzelle erfolgreich regenerieren kann, hängt jedoch von verschiedenen Faktoren ab. So muss die geschädigte Zelle überleben, der durchtrennte Fortsatz wieder auswachsen und eine funktionelle Re-Innervation an seinem ursprünglichen Ziel erfolgen. Dies ist wiederum von der Art der Nervenzelle, ihrem Alter, der Art der Verletzung und der Entfernung der Verletzung vom Zellsoma abhängig (Fansa et al. 2003). Erfolgt die Verletzung der Nervenzellen direkt am Zellkörper, so stirbt die Zelle ab. Kommt es in einiger Entfernung des Zellkörpers zur Verletzung des Neurons, so wird der distale Bereich des Fortsatzes sowie die umliegende Myelinscheide abgebaut, eine sogenannte Wallersche Degeneration, und der proximale Bereich kann wieder auswachsen (Stoll et al. 2002). Nach Verletzung des Fortsatzes einer differenzierten neuronalen Zelle kommt es zu einer „Umprogrammierung“, bei der ihre Funktion der sensorischen Wahrnehmung, motorischen Kontrolle oder der autonomen Regulation abgeschaltet und ein Wachstumsprogramm angeschaltet wird (Snider et al. 2002). Dies wird hauptsächlich durch die Unterbrechung des retrograden Transports von Signalen nach einer Verletzung, dem erhöhten Ca^{2+} -Einstrom und anderen Signalen aus der verletzten Umgebung eingeleitet (Makwana et al. 2005). Nach axonaler Regeneration und Re-Innervation des Zielgebietes kommt es zur erneuten Axonreifung (Donnerer et al. 2003). Nicht nur intrinsische Veränderungen, sondern auch das umliegende Gewebe bestimmen das Ausmaß der Regeneration (Donnerer et al. 2003).

1.5.2. Regeneration im PNS

Die meisten Untersuchungen zur Regeneration im peripheren Nervensystem wurden an Spinalganglien vorgenommen. Hier zeigte sich, dass eine Verletzung des zentralen Axons nicht zu einer Regeneration führte, die Verletzung der peripheren Axone hingegen schon. Im Weiteren werden die Prozesse nach einer Verletzung des peripheren Axons dargestellt. Das Regenerationsvermögen peripherer Nervenfasern ist relativ hoch. Dies liegt zum einen an der Fähigkeit der Neurone, sich auch nach der Differenzierung wieder in eine auswachsende Zelle zu verwandeln, und zum anderen an der wachstumsfördernden Umgebung nach einer Verletzung. So werden die wachstums-inhibierenden Myelin-Reste, die bei der Wallerschen Degeneration entstehen, umgehend von den umliegenden Schwann-Zellen und den einwandernden Makrophagen abtransportiert (Schafer et al. 1996). Es erfolgt eine Veränderung in der Funktion der Schwann-Zellen, sie werden von myelinisierenden zu wachstumsfördernden Zellen. Hierbei kommt es zur Dedifferenzierung der Schwann-Zellen und zur verminderten Expression der Myelin-Proteine (Chen et al. 2007). Die Schwann-Zellen proliferieren, bilden die sogenannten „Büngnerschen Bänder“ aus, die als Leitschiene für die regenerierenden Nervenfasern dienen, und produzieren Wachstumsfaktoren (Fansa et al. 2003). Des Weiteren werden wachstumsfördernde Moleküle der extrazellulären Matrix, wie z.B. Laminin und deren Rezeptoren, nach einer Verletzung verstärkt von Nervenzellen und Schwann-Zellen exprimiert (Chen et al. 2002, Hammarberg et al. 2000). Darüber hinaus werden verstärkt weitere wachstums-fördernde Substanzen wie z.B. Neurotrophine und Zytokine synthetisiert (Chen et al. 2007). Ein wichtiger Bestandteil der intrinsischen neuronalen Veränderungen ist die Erhöhung des zyklischen Adenosinmonophosphat (cAMP)-Levels, welches zu den *second messengers* gehört. Über cAMP werden verschiedene Signalkaskaden reguliert, die am axonalen Wachstum beteiligt sind (Chen et al. 2007). Wird der cAMP-Level in den Spinalganglien erhöht, so kommt es auch zur Regeneration der zentralen Axone nach einer Verletzung (Qui et al. 2002). Die oben beschriebenen Faktoren führen zur Aktivierung verschiedener Signalkaskaden, die direkt am distalen Ende des Fortsatzes oder über retrograden Transport im Zellkörper ihre Wirkung entfalten können. Die Aktivierung verschiedenster Transkriptionsfaktoren im Zellkern führt zur Synthese von regenerationsunterstützenden Proteinen und Bestandteilen für den Wiederaufbau des neuronalen Fortsatzes. Diese Bausteine werden zum Ende des Fortsatzes

transportiert, und über die lokalen Signalkaskaden wird das Wachstum reguliert (Snider et al. 2002). *In vivo* Auswachsmodelle zeigten, dass die Regeneration von verletzten Fasern durch die Gabe von neurotrophen Faktoren erhöht werden konnte (Oudega et al. 1996, Bradbury et al. 1999, Ramer et al. 2000, English et al. 2005, Yin et al. 2001, Lee et al. 2003, Fine et al. 2002, Santos et al. 1999).

1.5.3. Regeneration im ZNS

Im Gegensatz zum PNS kommt es nach einer Verletzung im ZNS nicht zu einer robusten Regeneration. Sowohl das Umfeld im ZNS als auch die Neurone selbst tragen dazu bei, denn die neuronalen Zellen des ZNS verlieren während der Differenzierung die Fähigkeit, wieder komplett auf einen Wachstumsmodus umgepolt werden zu können (Goldberg et al. 2002a). Auch das Umfeld im ausgereiften ZNS führt zu einem verminderten Regenerationsverhalten. Die Blut-Hirn-Schranke verhindert den massiven Einstrom von Immunzellen nach einer Verletzung in das zentrale Nervensystem. Somit kann der Prozess des Abbaus von Zelltrümmern nur durch die residenten Makrophagen (Mikroglia) erfolgen und ist damit deutlich langsamer als im PNS (Correale und Villa 2004). Der Wundverschluss im ZNS erfolgt durch die Ausbildung der Glianarbe, die zu einem Großteil aus Astrozyten besteht. Diese Glianarbe (Gliose) stellt eine physikalische und biochemische Barriere dar, die von den Nervenfasern nicht bzw. nur gering durchwachsen werden kann. Weiterhin kommt es zur Expression von verschiedensten wachstums-inhibierenden myelinassoziierten Molekülen wie Nogo-A, myelinassoziiertes Glykoprotein (MAG) und oligodendrozytäres Myelin Glykoprotein (OMgp) entlang der Wachstumsroute der Nervenfasern (Cui et al. 2006). Im Gegensatz zum PNS kommt es im ZNS nicht zur verletzungsbedingten verstärkten Expression von wachstumsfördernden Faktoren und deren Rezeptoren (Jones et al. 2001). *In vivo* Untersuchungen konnten jedoch zeigen, dass auch die Regeneration von neuronalen Zellen des ZNS durch die Gabe von neurotrophen Faktoren gesteigert werden konnte (Bregman et al. 1997, Liu et al. 1999, Jakeman et al. 1998, Schnell et al. 1994, Grill et al. 1997, Blesch et al. 1999).

1.6. Immunsystem

Das Immunsystem dient der Abwehr des Organismus gegenüber eingedrungenen Pathogenen und der Behebung des Gewebeschadens nach einer Verletzung. Alle Zellen des Immunsystems gehören zu den weißen Blutzellen (Leukozyten). Nach einer Verletzung, Infektion oder lokalen Immunreaktion wird durch das Immunsystem eine Entzündungsreaktion (Inflammation) hervorgerufen, bei der es zur lokalen Ansammlung von Flüssigkeit, Plasmaproteinen und weißen Blutzellen kommt (Walport et al. 2008).

1.6.1. angeborene und adaptive Immunreaktionen

Nach einer Infektion können zwei unterschiedliche Wege der Abwehr auftreten. Einerseits kommt es zur unspezifischen (angeborenen) und andererseits zur spezifischen (erworbenen bzw. adaptiven) Abwehr. Die angeborene Immunität dient der ersten und schnellen Abwehr und ist Erreger-unspezifisch. Hier kommt es zur Phagozytose und Vernichtung des eingedrungenen Erregers sowie zur Sekretion von Botenstoffen durch Makrophagen, Granulozyten und natürliche Killer (NK) -Zellen. Nicht alle Erreger können jedoch über die angeborenen Abwehrsysteme erkannt oder vollständig eliminiert werden. Über die sezernierten Botenstoffe und eine antigen-spezifische Aktivierung können Zellen der adaptiven Immunreaktion, die Lymphozyten, rekrutiert und aktiviert werden. Die Lymphozyten unterteilen sich in B- und T-Lymphozyten. Die B-Lymphozyten stellen den humoralen Teil der Immunantwort dar und können Antigene auch außerhalb von Körperzellen erkennen. Sie tragen als antigen-erkennende Moleküle die Immunglobuline (Ig) auf der Zelloberfläche. Nach der spezifischen Aktivierung der B-Zellen differenzieren diese in Plasmazellen und produzieren in großen Mengen Antikörper (sezernierte Ig). Diese Antikörper können sich an ihre Antigene anlagern (Opsonisierung) und können dadurch die Zerstörung eines Erregers durch andere Komponenten des Immunsystems (z.B. durch Phagozytose oder Aktivierung des Komplementsystems) sowie die Neutralisierung von Toxinen und Viren ermöglichen. Die T-Zellen werden in die CD4⁺- und CD8⁺-Lymphozyten untergliedert und stellen den zellulären Arm der adaptiven Immunantwort dar. Beide Zellarten erkennen Antigene über den spezifischen T-Zell-Rezeptor auf der Zelloberfläche. Hierfür müssen die Antigene jedoch von anderen Zellen prozessiert über den Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) präsentiert werden. Die CD4⁺-Lymphozyten (T-Helfer-Zellen) können

ausschließlich durch Antigene aktiviert werden, die von professionellen Antigen-präsentierende Zellen (APZ), zu denen die dendritischen Zellen, Makrophagen und B-Lymphozyten gehören, über den MHCII-Komplex präsentiert werden. Sie differenzieren anschließend zu Th1- oder Th2-Effektorzellen und unterstützen durch ein spezifisches Zytokinexpressionsmuster die humorale oder zellvermittelte Immunantwort. Die Aktivierung der CD8⁺-Lymphozyten erfolgt über die Antigenpräsentation durch den MHCI-Komplex, der von allen Zellen exprimiert werden kann. Nach der Aktivierung kommt es zur Differenzierung in Richtung zytotoxischer T(Tc)-Zellen. Einige dieser B- und T-Zellen durchlaufen eine Differenzierung zur Gedächtniszelle und können nach erneutem Kontakt mit demselben Antigen zu einer schnelleren Immunreaktion führen.

1.6.2. Zytokine

Die komplexen Interaktionen einer Immunantwort werden über sezernierte Faktoren gesteuert, die als Zytokine bezeichnet werden. Sie sind an der Regulation von verschiedenen Prozessen wie Differenzierung, Proliferation, Reifung und dem Überleben von Zellen beteiligt (Voßhenrich et al. 2002). Zytokine sind kurzlebige, niedermolekulare Proteine die in den extrazellulären Raum sezerniert oder an der Zelloberfläche exprimiert werden. Sie sind Signalmoleküle, die über spezifische Rezeptoren wirken, wobei ein Zytokin meist auf viele Zellen wirken kann (pleiotrop) und verschiedene Zytokine gleiche Reaktionen in einer Zielzelle auslösen können (Arai et al. 1990). Zu den Zytokinen gehören verschiedene Gruppen wie die Hämatoopoetin-Familie (Wachstumshormone, zahlreiche Interleukine (IL) mit Funktionen in der angeborenen und erworbenen Immunität (z.B. IL-4, IL-6), die Tumornekrosefaktor-Familie (adaptive und angeborenen Immunität; z.B. TNF α) und die Interferone (Aktivierung von Makrophagen, z.B. IFN γ) (Walport et al. 2008). Im Weiteren soll auf die Funktion jener fünf Zytokine eingegangen werden, deren Einfluss auf die neuronale Regeneration in dieser Arbeit untersucht wurde.

Die Zytokine IL-6, TNF α und IL-1 β werden hauptsächlich von Makrophagen sezerniert und sind somit die ersten Zytokine, die bei einer Entzündungsreaktion auftreten. IL-6 führt zur Lymphozytenaktivierung, zur Produktion von Akute-Phase-Proteinen und Fieber. TNF α aktiviert Makrophagen und Endothelzellen, induziert Fieber und verstärkt die lokale Entzündungsreaktion. Über IL-1 β werden sowohl Makrophagen als auch T-Zellen aktiviert, das umliegende Gewebe zerstört und

Fieber induziert. Die bei der Entzündungsreaktion aktivierten Makrophagen können über die Sekretion von Chemokinen zur Rekrutierung von anderen Zellen des Immunsystems wie z.B. den Neutrophilen und Lymphozyten führen. $\text{IFN}\gamma$ ist ein Markerzytokin der Th1-Zellen und führt zur Aktivierung von Makrophagen, zur Hochregulation von MHC I/II Molekülen und hemmt die Th2-Zellen. Da es zur Induktion der Expression der MHC-Komplexe beiträgt, spielt es eine wichtige Rolle bei der Bekämpfung von intrazellulären Erregern. IL-4, ein Markerzytokin der Th2-Zellen, wirkt im Gegensatz zu den anderen beschriebenen Zytokinen anti-inflammatorisch. Es aktiviert B-Zellen, erhöht die Expression der MHC II Moleküle und hemmt Th1-Zellen (Walport et al. 2008).

1.6.3. Zytokinrezeptoren und Signaltransduktion

Die Rezeptoren der hier untersuchten Zytokine können drei verschiedenen Superfamilien zugeteilt werden. Sowohl ihre Struktur als auch die von ihnen aktivierten Signalkaskaden sollen hier kurz erläutert werden.

1.6.3.1. Zytokinrezeptoren Superfamilie

Die Rezeptoren der Interleukine und Interferone werden zwei Familien zugeordnet, der Familie der Zytokinrezeptoren sowie der IL-1R/TLR Superfamilie. Bei den Zytokinrezeptoren handelt es sich um transmembrane Rezeptorproteine, mit vier konservierten Cysteinen im extrazellulären Bereich und Konsensus-Motiven im intrazellulären Bereich. Über die Konsensus-Motive wird die Signaltransduktion ausgelöst. Je nachdem, ob im extrazellulären Bereich das WSXWS-Motiv vorhanden ist, werden die Rezeptoren in Typ I (+) und Typ II (-) unterteilt. Die Rezeptoren setzen sich aus verschiedenen Ketten zusammen. Identische Ketten treten zum Teil in unterschiedlichen Kombinationen auf und dienen somit verschiedenen Zytokinen als Rezeptoren. So setzt sich der IL-6-Rezeptor aus dem gp130-Molekül in Kombination mit der $\text{IL-6R}\alpha$ -Kette, der IL-4-Rezeptor aus der $\text{IL-4R}\alpha$ und γ_c -Kette bzw. der $\text{IL-13R}\alpha$ -Kette und der $\text{IFN}\gamma$ -Rezeptor aus der $\text{IFN}\gamma\text{R}\alpha$ - und $\text{IFN}\gamma\text{R}\beta$ -Kette zusammen. Die Signaltransduktion der Zytokinrezeptoren kann über verschiedene Wege erfolgen (Abb. 4). So kann es über die Rekrutierung von verschiedenen Adaptorproteinen zur Aktivierung der MAPK-Kaskade und PI3K-Kaskade kommen. Zum anderen kann aber auch der JAK/STAT Weg aktiviert werden, der spezifisch für die Zytokinrezeptoren ist. Hierbei kommt es durch die Dimerisierung der

Rezeptoruntereinheiten zur Zusammenführung der rezeptorgebundenen Janus-Kinasen (JAK) und deren Phosphorylierung.

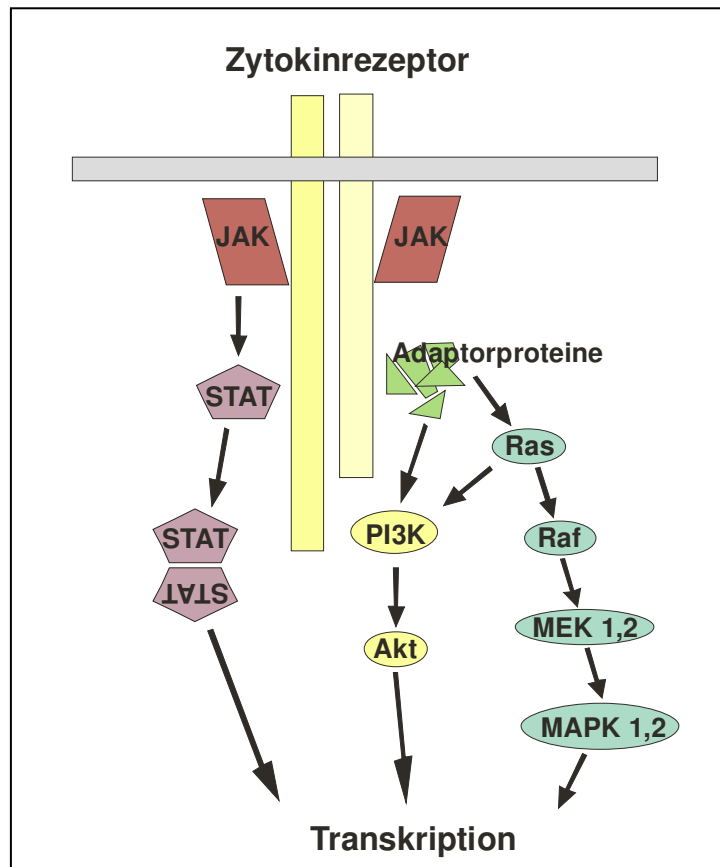


Abb. 4: Schematische Darstellung der Zytokinrezeptoren und ihrer Signalkaskaden (modifiziert nach Vosshenrich et al. 2002)

Die Zytokinrezeptoren setzen sich aus zwei verschiedenen Untereinheiten zusammen. Nach der Bindung des Liganden kommt es über den Rezeptor zur Aktivierung der JAK/STAT, PI3K/Akt oder MAP3K Signalkaskaden.

Nachfolgend können Transkriptionsfaktoren (*signal transducer and activator of transcription*, STAT) an den Rezeptor binden und es kommt zur Autophosphorylierung der STATs. Aktivierte STATs bilden Dimere, die in den Zellkern transportiert werden und dort eine veränderten Genexpression hervorrufen (Vosshenrich et al. 2002).

1.6.3.2. IL-1R/TLR Superfamilie

Die *Toll-like*-Rezeptoren (TLR) und Interleukin-1-Rezeptoren (IL-1R) werden auf Grund einer homologen intrazellulären Domäne, der sogenannten TIR-Domäne, zur IL-1R/TLR Superfamilie zusammengefasst. Die IL-1R-Proteine besitzen drei extrazelluläre Ig-ähnliche Domänen während die *Toll-like* Rezeptoren Leucin-reiche Regionen im extrazellulären Abschnitt aufweisen (Martin et al. 2002).

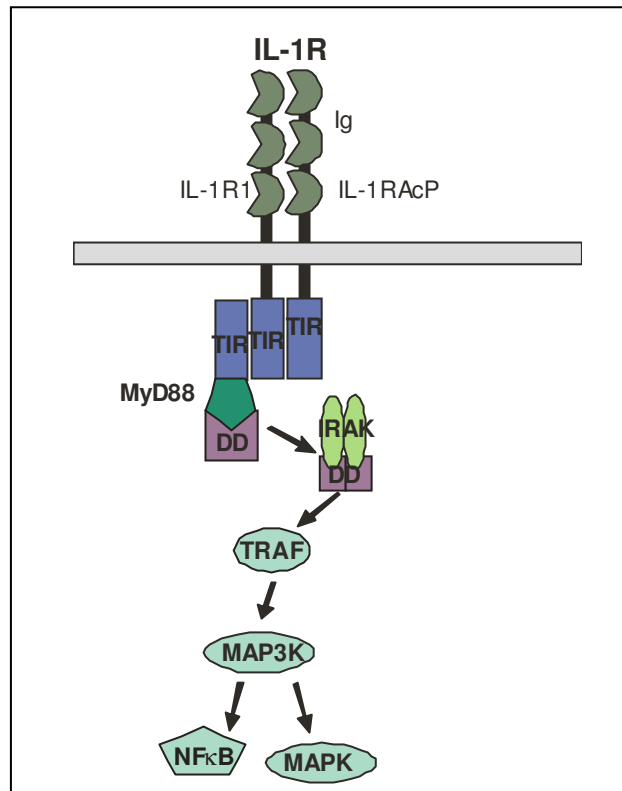


Abb. 5: Schematische Darstellung der IL-1R/TLR-Rezeptoren und ihrer Signalkaskaden (modifiziert nach Vosshenrich et al. 2002)

Der IL-1-Rezeptor setzt sich aus den zwei Untereinheiten IL-1R1 und IL-1RAcP zusammen. Nach der Bindung des Liganden kommt es über den Rezeptor zur Aktivierung verschiedener MAP3K Signalkaskaden.

Der IL-1-Rezeptor setzt sich aus den Komponenten IL-1R1 bzw. IL-1R2 und IL-1RAcP zusammen (Abb. 5). Nach der Ligandenbindung und Rezeptordimerisierung kommt es zur Anlagerung und Aktivierung des Adaptormoleküls MyD88. Dieses führt zur Aktivierung der IL-1R-assoziierten Kinase (IRAK), welche über Kinase-Kaskaden den Transkriptionsfaktor NFκB sowie die MAP Kinasen JNK und p38 aktivieren kann (Vosshenrich et al. 2002).

1.6.3.3. Tumornekrosefaktor-Rezeptor Superfamilie

Die Rezeptoren von TNF zählen zu der Superfamilie der Tumornekrosefaktor-Rezeptoren (TNF-R). Es handelt sich hierbei um Typ I transmembrane Rezeptoren, die ein bis fünf Cystein-reiche Regionen im extrazellulären Bereich und eine Zelltod-Domäne (DD) im intrazellulären Bereich aufweisen. TNF α dient als Ligand für die Rezeptoren TNF-R1 und TNF-R2, die sich darin unterscheiden, dass dem TNF-R2 die DD-Sequenz fehlt (Gupta et al. 2002). Die meisten Prozesse, welche die Aktivierung von Proliferation, Inflammation und Apoptose beeinflussen, werden über den TNF-R1 gesteuert. Prozesse der Angiogenese und der Reparatur von verletztem Gewebe werden hingegen über TNF-R2 reguliert (Wertz et al. 2008).

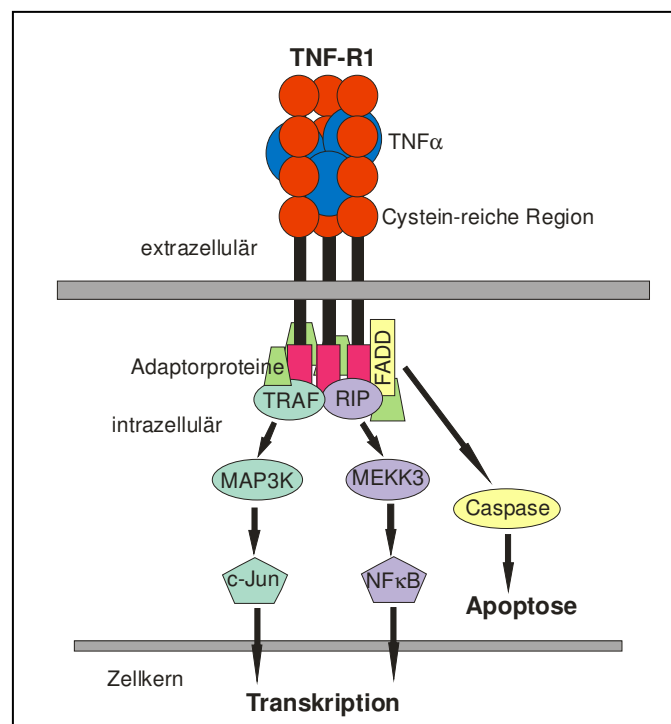


Abb. 6: Schematische Darstellung des TNF-R1 und die durch ihn gesteuerten Signalkaskaden (modifiziert nach Chen et al. 2002)

TNF-R1 und TNF-R2 setzen sich aus drei Untereinheiten zusammen. Nach der Aktivierung des Rezeptors kommt es zur Anlagerung eines Protein-Komplexes, welcher diverse Adaptorproteine enthält. Hierüber kommt es zur Aktivierung verschiedener Signalkaskaden, die entweder die Apoptose oder transkriptionelle Veränderungen im Zellkern auslösen.

TNF α bindet mit hoher Affinität den TNF-R1 und nur mit geringer Affinität den TNF-R2 (Jupp et al. 2001). Nach der Bindung von TNF α an den TNF-R1-Komplex kommt es zur Anlagerung eines Proteinkomplexes an den Rezeptor, der diverse Adaptorproteine enthält (Abb. 6). Zu ihnen gehören das Fas-assoziierte-Todes-

Domänen-Protein (FADD), das Rezeptor-interagierende Protein (RIP) und die TNF-Rezeptor-assoziierten Faktoren 1 und 2 (TRAF1 und TRAF2). FADD führt zur Aktivierung der Caspase-Kaskade, die den Zelltod durch Apoptose herbeiführt. Über TRAF kommt es zur Aktivierung von MAPK-Kaskaden und darüber zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors c-Jun. Durch RIP wird die Aktivierung von MEKK3 ausgelöst, was zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B führt (Chen et al. 2002). Durch die Aktivierung von TNF-R2 kommt es ebenfalls zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF κ B und c-Jun aber nicht zur direkten Aktivierung der Caspase-Kaskade. Es konnte aber gezeigt werden, dass TNF-R2 die apoptotische Funktion des TNF-R1 regulieren kann (Gupta et al. 2002).

1.7. Wechselwirkungen zwischen Zytokinen und dem Nervensystem

Das Immunsystem wird nicht nur nach dem Eindringen von Pathogenen aktiviert sondern auch nach mechanischen Gewebeverletzungen. Des Weiteren spielen Zytokine nicht nur in pathologischen Reaktionen eine Rolle, sondern sind überdies auch während der Entwicklung des Nervensystems an der Modulation bestimmter Funktionen im gesunden neuronalen Gewebe beteiligt. So werden IL-1 β und TNF α konstitutiv in geringen Mengen im Gehirn produziert und regulieren wahrscheinlich das Schlafverhalten (Krueger et al. 2008, Vitkovic et al. 2000). Weiterhin sind IL-1 β und IL-4 an der Modulation der Gedächtnisbildung und bei Lernprozessen beteiligt (Schultzberg et al. 2007, Nolan et al. 2005). Auch IL-6 und IFN γ wurde eine Beteiligung bei Lernprozessen und der Gedächtnisbildung zugeschrieben (McAfoose et al. 2008). Im Folgenden werden einige Wechselwirkungen der fünf oben beschriebenen Zytokine bei der Entwicklung des Nervensystems und ihr Einfluss nach einer Verletzung beschrieben.

1.7.1. Zytokine und Entwicklung des Nervensystems

Da einige inflammatorische Zytokine auch während der embryonalen Entwicklung oder im unverletzten Nervensystem exprimiert werden, kann man sie auch als Neuromodulatoren betrachten. Sie können zum einen die Differenzierung von Vorläuferzellen bestimmen, zum anderen das Wachstum von neuronalen Zellen oder deren Überleben beeinflussen. IL-1 β wird während der prä- und postnatalen Entwicklung im ZNS exprimiert (Wang et al. 2007) und kann auch in einigen Zellen

im adulten Gehirn nachgewiesen werden (Vitkovic et al. 2000, Nolan et al. 2005). IL-1 β stimuliert die Differenzierung und das Wachstum von Astrozyten und Mikroglia während der Entwicklung (Araujo et al. 1995) und kann das Überleben von einigen ZNS Neuronen fördern (Mehler et al. 1997). Im Laufe des Alterungsprozesses wird IL-1 β im Gehirn immer stärker exprimiert und trägt so zur Reduktion der Langzeit-Potenzierung (LTP) bei (Nolan et al. 2005). Ein Anstieg der IL-6 mRNA Expression konnte im Verlauf der Entwicklung von dem postnatal-Stadium (p) p2 bis p70 in den Spinalganglien gezeigt werden (Gadient et al. 1995), wobei der größte Anteil in den neuronalen Zellkörpern und ein geringerer Teil in den Schwann-Zellen entlang der Axone detektiert werden konnte. Auch im adulten Gehirn konnte IL-6 mRNA nachgewiesen werden (Gadient et al. 1994). IL-6 kann das Überleben von einigen ZNS-Neuronen fördern (Mehler et al. 1997) und reguliert die IL-1 β -abhängige LTP (Balschun et al. 2004). TNF α wird kontinuierlich im peripheren und zentralen Nervensystem produziert (Shamash et al. 2002, Vitkovic et al. 2000). Im ZNS wird es hauptsächlich von Astrozyten und Mikroglia und nur zu einem geringen Teil von Neuronen produziert (Saliba et al. 2001). TNF α induziert die Proliferation von Astrozyten sowie die von neuronalen Vorläuferzellen und deren Differenzierung (Saliba et al. 2001). Neumann et al. (1997) konnten die Produktion von IFN γ in einigen Subpopulationen der Spinalganglien-Neuronen feststellen. Jedoch konnte keine IFN γ -Synthese im Gehirn nachgewiesen werden (Lovett-Racke et al. 2000). Andererseits konnte gezeigt werden, dass IFN γ die Differenzierung neuronaler Zellen aus kultivierten kortikalen und hippokampalen Neuroblasten steigern konnte (Barish et al. 1991). Im Nervensystem wird IL-4 hauptsächlich von Gliazellen produziert (Sholl-Franco et al. 2002). Nur im Gehirn von neonatalen nicht aber von adulten Mäusen konnte IL-4 mRNA detektiert werden (Lovett-Racke et al. 2000). IL-4 ist für das Überleben von oligodendrozytären Vorläuferzellen und retinalen Ganglion Zellen mitverantwortlich (Mehler et al. 1997, Sholl-Franco et al. 2001), kontrolliert die Proliferation von Gliazellen (Brodie et al. 1996 und 1998), hemmt die Proliferation von retinalen Vorläuferzellen und fördert deren Differenzierung in Photorezeptorzellen (da Silva et al. 2008). Weiterhin kann es die LTP im Gehirn erhöhen (Nolan et al. 2005).

1.7.2. Zytokine bei einer Schädigung des Nervensystems

Nach einer Verletzung von neuronalem Gewebe kommt es zu einer inflammatorischen Reaktion an der Läsionsstelle und um die Zellkörper der verletzten Neurone (Raivich et al. 2007). Sowohl bei der Degeneration als auch bei der Regeneration von geschädigtem Nervengewebe spielt das Immunsystem eine wichtige Rolle. Bei degenerativen Prozessen nach mechanischer Verletzung neuronalen Gewebes unterscheidet man zwischen dem Primärschaden und dem Sekundärschaden. Der Primärschaden ist die direkte Zerstörung des Gewebes durch einen äußeren Einfluss, die darauf folgende Entzündungsreaktion mit ihren Folgen auf vorher unverletztes Gewebe wird als Sekundärschaden bezeichnet (Profyris et al. 2004). So kommt es z.B. durch die Ausschüttung von zytotoxischen Stoffen auch zur Zerstörung von umliegenden Zellen (Beattie et al. 2000; Casha et al. 2001). Andererseits ist die Entfernung von Zelltrümmern durch die Zellen des Immunsystems ein wichtiger Bestandteil der regenerativen Prozesse nach einer Verletzung.

Nach einer mechanischen Verletzung des ZNS kommt es hauptsächlich zur Aktivierung der angeborenen Immunreaktionen und nur zu einem geringeren Teil zur adaptiven Immunantwort (Schroeter et al. 2005). Da es aber nach einer Axotomie des *Nervus faciales* in Lymphozyten-defizienten Mäusen zu einer erhöhten Neurodegeneration und verzögerten Regeneration kommt (Serpe et al. 1999, Byram et al. 2004), scheint auch die adaptive Immunantwort an den Prozessen nach mechanischer Verletzung des Nervensystems beteiligt zu sein. Im Folgenden werden einige Einflüsse der Zytokine auf die neurodegenerativen und -regenerativen Prozesse nach einer Verletzung beschrieben. Die pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 β , IL-6 und TNF α lösen alle die Induktion von Fieber und die Aktivierung der Akute-Phase-Reaktion aus.

Innerhalb kürzester Zeit nach einer Verletzung steigt die IL-1-Produktion an. IL-1 kann sowohl zur erhöhten Erregbarkeit der Neurone führen sowie zur Induktion der Sekretion von neurotoxischen Molekülen durch aktivierte Mikroglia, Astrozyten, Oligodendrozyten und Epithelzellen sowie den vermehrten Einstrom von Leukozyten. Diese Reaktionen tragen zur Degeneration bei. Andererseits kann IL-1 die Sekretion von wachstumsfördernden Molekülen durch Astrozyten stimulieren und ist an der Induktion von Remyelinisierungsprozessen beteiligt, was zur Regeneration beiträgt (Allen et al. 2005). So führte die kontinuierliche Gabe von IL-1 β nach einer

Ischiasläsion *in vivo* zu einer stärkeren funktionellen Regeneration der sensorischen Fasern (Temporin et al. 2008a).

Nach Aktivierung der Entzündungsreaktion kommt es zur IL-6-Produktion in Mikroglia, Makrophagen, Endothelzellen, Astrozyten und T-Zellen (Benveniste et al. 1998). Die erhöhte IL-6-Expression führt zur verstärkten Rekrutierung von Neutrophilen, zur Aktivierung von Makrophagen, Mikroglia und Astrozyten und induziert somit eine verstärkte reaktive Gliose (Lacroix et al. 2002, Streit et al. 2000). Die Auswirkungen der erhöhten IL-6-Produktion werden in der Literatur unterschiedlich diskutiert. So zeigten Streit et al. (2000), dass IL-6 die Regeneration der *N. facialis*-Motoneurone nach einer Axotomie in adulten Ratten förderte. In einem anderen Läsionsmodell, der Rückenmarksverletzung, wurde die neuronale Regeneration durch die Expression von Hyper-IL-6 (ein Fusionsprotein aus IL-6 und dem löslichen IL-6-Rezeptor) allerdings gehemmt (Lacroix et al. 2002). In neonatalen Ratten konnte nach der Axotomie des *Nervus facialis* keine erhöhte IL-6 mRNA Produktion und verstärkte reaktive Gliose nachgewiesen werden, es kam hier auch nicht zur Regeneration sondern vielmehr zur verstärkten neuronalen Apoptose (Streit et al. 2000). Andererseits konnte in IL-6-defizienten adulten Mäusen kein vermehrter Zelltod nach dieser Läsion festgestellt werden und es traten vermehrt axonale Verzweigungen auf (Galiano et al. 2001). Okada et al. (2004) konnten zeigen, dass die kurzfristige IL-6-Rezeptor Blockade zu einer verminderten Astroglie und einer verbesserten funktionellen Regeneration nach einer Rückenmarksverletzung führte. Dies lässt vermuten, dass die durch IL-6 induzierte Astroglie zwar hemmend auf die Regeneration der verletzten Fortsätze wirkt, IL-6 aber auch die Regeneration fördern kann. Weiterhin ist IL-6 für die Regeneration des umliegenden verletzten Gewebes förderlich (Swartz et al. 2001, Penkowa et al. 2003).

TNF α lockert die extrazelluläre Matrix, stimuliert die Rekrutierung der Leukozyten, aktiviert Gliazellen und führt zu einer Verstärkung des Sekundärschadens (Shohami et al. 1999). Die Inhibition von TNF α nach einer Rückenmarksverletzung reduzierte den neuronalen Zelltod im Rückenmark (Yune et al. 2003) sowie den Zelltod von hippokampalen Neuronen nach einem geschlossenen Hirntrauma (Shohami et al. 1996). Andererseits konnte gezeigt werden, dass TNF α geschädigte Zellen vor dem Zelltod bewahren kann (Scherbel et al. 1999). Die Präinkubation mit rekombinantem TNF α konnte die funktionelle Regeneration von verletzten Ischiasnerven im Vergleich zu unbehandelten Mäusen verstärken (Chen et al. 1996). TNF α -defiziente

Mäuse zeigen in der akuten Phase eine geringere motorische Störung nach einer kontrollierten kortikalen Läsion als Wildtyp-Mäuse. Während Wildtyp-Mäuse nach 2-4 Wochen eine gute Regeneration der motorischen Funktionen aufzeigen, bleibt die Regeneration bei den TNF α -defizienten Mäusen aus (Scherbel et al. 1999). In TNF α -defizienten Mäusen kommt es zur verzögerten Demyelinisierung (Arnett et al. 2001), die über den TNF-R1 vermittelt wird. Über den TNF-R2 wird die Remyelinisierung und Regeneration oligodendrozytärer Vorläuferzellen gesteuert (Arnett et al. 2001, Fontaine et al. 2002). TNF α induziert die Synthese von Stickoxiden (NO) und induziert damit den Zelltod von T-Zellen (Correale and Villa 2004). Es hat überdies eine toxische Wirkung auf proliferierende adulte Stammzellen (Wong et al. 2004)

IFN γ wird hauptsächlich von Th1- und NK-Zellen produziert. Nach Verletzungen im PNS führt es zur Hochregulation der MHC I-Moleküle und dadurch zum vermehrten Zelltod durch die Tc-Zellen (Neumann et al. 1997). Weiterhin verhindert es die Differenzierung von Schwann-Zellen (Lisak et al. 2001). Nach einer Verletzung des ZNS kommt es durch IFN γ zur verstärkten MHC II Expression auf Astrozyten und Oligodendrozyten (Munoz-Fernandez et al. 1998). IFN γ induziert den Zelltod von oligodendrozytären Vorläuferzellen (Horiuchi et al. 2006) und inhibiert die Proliferation von Astrozyten nach einer traumatischen Gehirnverletzung (Pawlinski et al. 1997). In adulten Stammzellkulturen konnte gezeigt werden, dass IFN γ die Differenzierung in Astrozyten reduziert, in neuronale Zellen stimuliert, und die Anzahl an auswachsenden Neuriten und deren Länge pro Nervenzelle erhöht (Wong et al. 2004). Weiterhin kann IFN γ den Zelltod sympathischer Neuronen vermindern (Chang et al. 1990) und das Überleben von embryonalen aber nicht adulten Neuronen fördern (Wong et al. 2004). Auch Deboy et al. (2006) konnten zeigen, dass nach einer Axotomie des *N. fasciales* in IFN γ -defizienten Mäusen die Überlebensrate der verletzten Motoneurone im Verhältnis zu den Wildtyp Mäusen unverändert blieb. Weiterhin ist IFN γ ein wichtiger Mediator bei Autoimmunerkrankungen (Corealle und Villa. 2004).

IL-4 wirkt nach einer Gehirnverletzung neuroprotektiv (Sholl-Franco et al. 2002). So kommt es in IL-4-defizienten Mäusen nach einer Axotomie des *N. fasciales* zu einem vermehrten Absterben der verletzten Motoneurone im Vergleich zu den Wildtyp Mäusen (Deboy et al. 2006). Dies könnte auf die anti-inflammatorische Wirkung von IL-4 zurückzuführen sein. Zum einen hemmt es die Aktivierung der Astrozyten und

deren Antigen-präsentierende Funktion (Brodie et al. 1998, Morga et al. 1996), zum anderen leitet es die Ramifizierung der Mikroglia ein und reduziert somit deren phagozytische und Antigen-präsentierende Funktionen sowie die Freisetzung von neurotoxischen Molekülen (Wirjatijasa et al. 2002, Chao et al. 1993, Zhao et al. 2006). Weiterhin kann durch IL-4 das Absterben von aktivierter Mikroglia induziert werden (Park et al. 2005). Andererseits kann IL-4 die NGF-Produktion in Astrozyten induzieren (Brodie et al. 1998).

Es zeigt sich, dass alle hier beschriebenen Zytokine sowohl neurodegenerative als auch -regenerative Funktionen nach Verletzungen haben können. Vermutlich ist sowohl ihre Konzentration als auch ihr zeitliches Auftreten sowie die Interaktion mit anderen Faktoren dafür verantwortlich, welche Reaktion durch das jeweilige Zytokin hervorgerufen wird.

1.8. Ziel der Arbeit

Wie bereits dargelegt, kommt es nach einer Verletzung des NS zur Rekrutierung von immunkompetenten Zellen und der Ausbildung einer Immunreaktion um die Läsionsstelle. Die Prozesse der Immunreaktion spielen auch bei der Degeneration bzw. Regeneration der Zellen des Nervensystems eine bedeutende Rolle. In der vorliegenden Arbeit sollte deshalb der Einfluss von verschiedenen Zytokinen auf einen wichtigen Aspekt der Regeneration, das Wiederauswachsen der verletzten Neurone, genauer untersucht werden. Ein spezielles Augenmerk wurde dabei auf die möglichen Interaktionen zwischen Neurotrophinen und Zytokinen gelegt. Vergleichend wurde der Einfluss der Zytokine auf das Auswachsen von peripheren und zentralen Neuronen in organotypischen Auswachsmodellen untersucht. Um diesen Fragestellungen nachzugehen, wurde für das periphere Nervensystem ein organotypisches Auswachsmodell embryonaler Spinalganglien etabliert. Als Modell für das zentrale Nervensystem dienten entorhinale Kortex-Explantate. Aus der Vielzahl der Zytokine wurden drei wichtige Faktoren der unspezifischen Immunantwort, nämlich IL-1 β , IL-6 und TNF α , ausgewählt. Weiterhin wurden IFN γ und IL-4, als wichtige Zytokine der spezifischen Immunantwort durch Th-Lymphozyten, ausgewählt. Für die Spinalganglien konnte gezeigt werden, dass die Zytokine das neurotrophininduzierte Auswachsen der Neurone beeinflussen konnten. Da sich die Signalkaskaden der Neurotrophine und Zytokine zum Teil überschneiden,

lag es nahe, eine Interaktion auf dieser Ebene zu untersuchen. Folgende Fragestellungen wurden dabei näher betrachtet:

1. Welchen Einfluss haben die neurotrophen Faktoren NT3, NT4 und NGF auf das Auswachsen von organotypischen Spinalganglien?
2. Beeinflussen die Zytokine IL-1 β , IL-6, TNF α , IFN γ und IL-4 das Auswachsen von organotypischen Spinalganglien in Kombination mit den neurotrophen Faktoren NT3, NT4 und NGF?
3. Haben die Zytokine IFN γ und TNF α einen Einfluss auf die Trk-Rezeptor-mRNA-Expression in organotypischen Spinalganglien-Explantaten?
4. Beeinflussen die Zytokine IL-1 β , IL-6, TNF α und IFN γ das Auswachsen von organotypischen entorhinalen Kortex-Explantaten?
5. Beeinflussen die Zytokine IL-1 β , IL-6, TNF α , IFN γ und IL-4 die NT3-induzierte Aktivierung der Trk-Rezeptor-Signalkaskaden in primären kortikalen Zellen?

2. Materialien

2.1. Puffer und Kulturmedien

Anodenpuffer I pH 10.4:

300 mM Trisbase
10 % Methanol

Anodenpuffer II pH 10.4:

25 mM Trisbase
10 % Methanol

Elektrophoresepuffer:

25 mM Trisbase
192 mM Glycin
1 % SDS

FACS-Puffer:

1 % FKS
PBS

Kathodenpuffer pH 9.4:

25 mM Trisbase
40 mM Glycin
10 % Methanol

Paraformaldehyd:

100 mM PB-Puffer
4 % Paraformaldehyd

PB-Puffer pH 7.4 :

100 mM Dinatriumhydrogenphosphat
100 mM Natriumdihydrogenphosphat

PBS-Puffer pH 7.4:

140 mM Natriumchlorid
2,7 mM Kaliumchlorid
10 mM Dinatriumhydrogenphosphat Heptahydrat
1,8 mM Kaliumdihydrogenphosphat

Probenpuffer pH 6.8:

100 mM Tris
10 % Glycin
4 % SDS
4 % beta-Mercaptoethanol
Brilliantblau

Saccharosepuffer pH 6.9:

70 mM Dinatriumhydrogenphosphat
30 mM Natriumdihydrogenphosphat
30 % Saccharose
0,01 % Natriumazid

Sammelgelpuffer pH 6.8:

500 mM Trisbase

SDS-Lysepuffer pH 7.5:

20 mM Trisbase
150 mM Natriumchlorid
1 mM EDTA
1 mM EGTA
2,5 mM Natriumpyrophosphat
1 mM Natriumorthovanadat
1 mM Glycerolphosphat
1 µg/ml Leupeptin
3 µg/ml Aprotinin
1 % Triton
1% SDS
1mM PMSF

TBS pH 7.4:

50 mM Trisbase
150 mM Natriumchlorid

Trenngelpuffer pH 8.8:

1,5 M Trisbase

SG-Kulturmedium:

- Neurobasalmedium
- 5 % FKS
- 2 % B-27
- 1 % Penicillin-Streptomycin-Lösung 100x

Präparationsmedium für entorhinale Kortex Explantate pH 7,4:

- 16 g/l MEM
- 2 mM L-Glutamin
- 0,8 mM Trisbase

Inkubationsmedium für entorhinale Kortex Explantate pH 7,4:

- 25 % HBSS Medium
- 8 g/l MEM
- 25 % NHS
- 4 mg/ml Insulin
- 0,8 mg/ml Vitamin C
- 5 mM Trisbase
- 4 mM L-Glutamin
- 0,58 % Natriumhydrogencarbonat-Lösung 7,5%
- 1 % Penicillin-Streptomycin-Lösung 100x
- 1,2 % Glukose-20 (B.Braun, Melsungen, D)

Kollagenlösung pH 7,4

- 1 ml Kollagenlösung (2 mg/ml)
- 50 µl DMEM
- 100 µl Rekonstituierungspuffer

Rekonstituierungspuffer

- 0,8 M Natriumhydroxid
- 2,2 % Natriumhydrogencarbonat

Kulturmedium für kortikale neuronale Einzelzellen:

- Neurobasalmedium
- 1 % Glutamin
- 2 % B-27
- 1 % Penicillin-Streptomycin-Lösung 100x

Kulturmedium für kortikale gemischte Einzelzellen:

- DMEM+ Glukose+ Pyrovat
- 10 % FKS
- 1 % Penicillin-Streptomycin-Lösung 100x

2.2. Chemikalien, Zellkulturmedien, Verbrauchsmaterialien und Seren

Die eingesetzten Chemikalien wurden, soweit nicht anders vermerkt, von den Firmen Fluka (Neu-Ulm, D), Merck (Darmstadt, D), Serva (Heidelberg, D), Sigma (München, D), Invitrogen (Karlsruhe, D), Roth (Karlsruhe, D) und Stratagene (Heidelberg, D) in analytischer Qualität bezogen. Die Zellkulturmedien Neurobasalmedium, HBSS, MEM und DMEM wurden von der Firma Invitrogen (Karlsruhe, D) bezogen. Die verwendeten Verbrauchsmaterialien wurden von den Firmen Nunc (Wiesbaden, D), Sarstedt (Nürnbrecht, D), Eppendorf (Hamburg, D), Greiner (Solingen, D), BioRad (München, D), Applied Biosystems (Foster City, CA), Millipore (Schwalbach, D), VWR (Darmstadt, D) und Amersham (Uppsala, SW) bezogen.

Die eingesetzten Seren wurden von folgenden Firmen bezogen:

Serum	Firma	Kat.Nr.
Fötales Kälberserum (FKS)	Biochrom, Berlin, D	
Normales Pferdeserum (NHS)	Invitrogen, Karlsruhe, D	
Normales Ziegenserum (NGS)	Invitrogen, Karlsruhe, D	
Normales Kaninchenserum (NRS)	Vector Laboratories	603422

2.3. Zytokine und neurotrophe Faktoren

Protein	Firma	Kat.Nr.
murines NGF	Sigma, München, D	N0513
rekombinantes humanes NT3	PeproTech Inc., Hamburg, D	C-45003
rekombinantes humanes NT4	PeproTech Inc., Hamburg, D	C-45004
rekombinantes murines INF γ	BD Pharmingen, Heidelberg, D	554587
Rekombinantes murines IL-4	PeproTech Inc., Hamburg, D	214-14
rekombinantes murines IL-6	Pierce, Rockford, IL	RMIL6I
rekombinantes murines IL-1 β	PeproTech Inc., Hamburg, D	211-11
rekombinantes murines TNF α	PeproTech Inc., Hamburg, D	315-01

2.4. Antikörper

Primärantikörper	Firma	Kat.Nr.
Kaninchen-anti-Maus Akt	NEB, Frankfurt, D	9272
Maus-anti-Maus phospho-Akt	NEB, Frankfurt, D	4051
Maus-anti-Ratte β IIIITubulin	Millipore, Schwalbach, D	MAB5544
Ratte-anti-Maus CD11b	BD Pharmingen, Heidelberg, D	557397
Maus-anti-Schwein GFAP	Sigma, München, D	G 3893
Kaninchen-anti-Ratte MAPKp44/42	NEB, Frankfurt, D	9102
Maus-anti-Human phospho-MAPKp44/42	NEB, Frankfurt, D	9106
Kaninchen-anti-Human PLC γ 1	NEB, Frankfurt, D	2822
Kaninchen-anti-Human phospho-PLC γ 1	NEB, Frankfurt, D	2821
Kaninchen-anti-Rind S100 β	Swant, Bellinzona, CH	37A
Maus-anti-Rind S100 β	Sigma, München, D	S 2532
Kaninchen-anti-Ratte TrkA	Prof. Reichardt	
Ziege-anti-Maus TrkB	R&D, Wiesbaden-Nordenstadt, D	1494-TB
Ziege-anti-Maus TrkC	R&D, Wiesbaden-Nordenstadt, D	1404-TC
Maus-anti-Maus β -Actin	Sigma, München, D	A 5441
Sekundärantikörper	Firma	Kat.Nr.
Kaninchen-anti-Ziege HRP	Millipore, Schwalbach, D	AP106P
Schaf-anti-Maus HRP	Amersham, Uppsala, SW	NA931
Esel-anti-Kaninchen HRP	Amersham, Uppsala, SW	NA934
Ratte-R-PE	BD Pharmingen, Heidelberg, D	555848
Ziege-anti-Maus Alexa 568	Invitrogen, Karlsruhe, D	A11004
Ziege-anti-Kaninchen Alexa 568	Invitrogen, Karlsruhe, D	A11011
Ziege-anti-Kaninchen Alexa 488	Invitrogen, Karlsruhe, D	A11008
Kaninchen-anti-Ziege Alexa 488	Invitrogen, Karlsruhe, D	A11078

2.5. Taqman-Primer und -Sonden

Für das Haushalts-Gen β -Actin wurden die folgende Sequenzen verwendet:

fw-Primer 5'-GCT TCT TTG CAG CTC CTT CGT T-3'
 rev-Primer 5'-GTT GTC GAC GAC CAG CGC-3'
 Sonde 5'-Hex-CGC CAC CAG TTC GCC ATG GAT-Tamra-3'

Die Taqmanprimer und Sonden für die Trk-Rezeptoren wurden von der Firma Applied Biosystems (Foster City, CA) erstellt. Als Reporter wurde der Farbstoff FAM verwendet.

Gen	Kat.Nr.
TrkA	Mm01219407_m1
TrkB	Mm01341753_m1
TrkC	Mm00456222_m1

2.6. Kits

Kit	Firma	Kat.Nr.
BCA	Pierce, Rockford, IL	23224
DNA-free	Ambion, Darmstadt, D	1906
ECL	Amersham, Uppsala, SW	RPN2106
ECL Plus	Amersham, Uppsala, SW	RPN2132
Fast PCR Master Mix	Applied Biosystems, Foster City, CA	4362070
High capacity cDNA Archive Kit	Applied Biosystems, Foster City, CA	P/N 4322171
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden, D	74104

2.6. Geräte

Gerät	Firma
Binokkular GZ 6	Leica, Bensheim, D
Digitale Kamera Intas	Intas, Göttingen, D
Digitale Kamera Photometric Cool Snap ES	Visitron Systems, Puchheim, D
Synergy™ 2 Multi-Mode Microplate Reader	BioTeK, Bad Friedrichshall, D
FACSCalibur	BD Biosciences, San Jose, CA
Fluoreszenzmikroskop BX50	Olympus, Hamburg, D
Inverses Durchlichtmikroskop IX 70	Olympus, Hamburg, D
MiniProtean III	BioRad, München, D
Power Pac 200	BioRad, München, D
7500 Fast Real-Time PCR System	Applied Biosystems, Foster City, CA
Tissuechopper	Technical Products Int., St. Louis, MO
Trans-Blot SD	BioRad

2.7. Software

Software	Firma
Alphamager	Alpha Innotec, San Leandro, CA
Relative Quantification Study	Applied Biosystems, Foster City, CA
FlowJo	Tree Star, Ashland, OR
MetaMorph	Molecular Devices, Downingtown, PA
Prism	GraphPad, La Jolla, CA

3. Methoden

3.1. Dorsale Spinalganglien (SG) als neuronales Auswachsmodell

Die Spinalganglien wurden als Auswachsmodell für das periphere Nervensystem ausgewählt. Mit Hilfe dieses Versuchsaufbaus wurde das Auswachsverhalten der SG-Neurone nach einer mechanischen Verletzung (mechanisches Durchtrennung der zentralen und peripheren Axone) unter dem Einfluss verschiedener neurotropher Faktoren sowie der Einfluss von pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen im organotypischen Modell untersucht.

3.1.1 Präparation der dorsalen Spinalganglien von embryonalen E13 Mäusen

Die SGs wurden von Mausembryonen am Tag E13 präpariert. Die einzelnen Präparationsschritte erfolgen alle unter sterilen Bedingungen und in Eis gekühltem HBSS mit Magnesium und Kalzium. Hierzu wurden die Embryone dekapitiert, der Torso auf den Rücken gelegt, der Thorax und das Abdomen geöffnet und der Torso entweidet. Um die Haut über der Wirbelsäule abziehen wurde der Schwanz abgetrennt und der Torso auf den Bauch gedreht. Die Wirbelsäule mit den anliegenden SGs wurde vorsichtig herausgeschnitten und das ventrale Mesoderm vom Rückenmark und den SGs abgetrennt. Mit Hilfe von feinen Sonden wurde eine Seite der SG-Rückenmarkverbindung gelöst und die SGs lagen seitlich neben dem Rückenmark (Abb. 7), von wo sie mit einem Skalpell abgetrennt werden konnten und die Fasertrakte entfernt wurden.

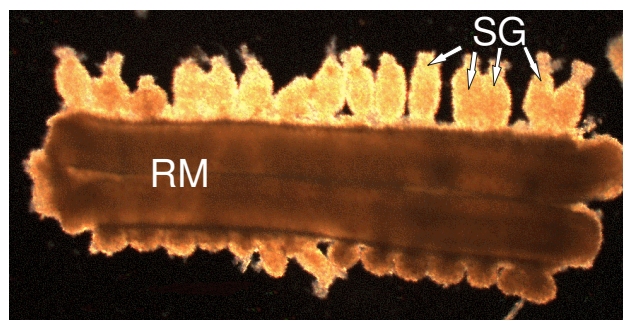


Abb. 7: Lichtmikroskopisches Foto des embryonalen freipräparierten Rückenmarks (RM) mit den seitlich liegenden Spinalganglien (SG).

3.1.2. Kultivierung organotypischer dorsaler Spinalganglien

In einer Zellkulturschale mit 12 mm Durchmesser wurden jeweils drei SGs in einen Tropfen (20 μ l) aus Matrigel (BD Biosciences, Bedford, MA) gebettet. Nach der Polymerisation des Matrigels wurde der Tropfen mit 500 μ l SG-Kulturmedium bedeckt und die Neurone bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Die rekombinanten neurotrophen Faktoren NT3, NT4 und NGF wurden mit 50 ng/ml und die rekombinanten Zytokine IL-1 β , IL-4, IL-6, IFN γ und TNF α mit 50 ng bzw. 500 ng/ml eingesetzt. Um die Neurotrophin-Rezeptoren zu blockieren wurden die SGs mit 10, 100 und 200 nM K252a (Merck, Darmstadt, D) bzw. mit DMSO (Riedel de Haen, Seelze, D), dem Lösungsmittel von K252a, ohne Zugabe von exogenen neurotrophen Faktoren inkubiert. Bei einer Konzentration bis 200nM blockiert K252a spezifisch die Trk-Rezeptoren (Koizumi et al. 1988). Nach 48 h wurden die SGs in 4% Paraformaldehyd (PFA) fixiert und im Phasenkontrastmikroskop mit einer Digitalkamera bei einer Vergrößerung von 1,25x fotografiert.

3.1.3. Charakterisierung der kultivierten dorsalen Spinalganglien

Nach Kultivierung der SGs für 48 h mit neurotrophen Faktoren konnten drei Zonen mit unterschiedlicher Dichte beobachtet werden. Um diese Zonen genauer zu bestimmen, wurde eine immunhistologische Färbung mit dem Neuritenmarker β III-Tubulin und dem Schwann-Zell-Marker S100 β durchgeführt (siehe Methoden 3.3.)

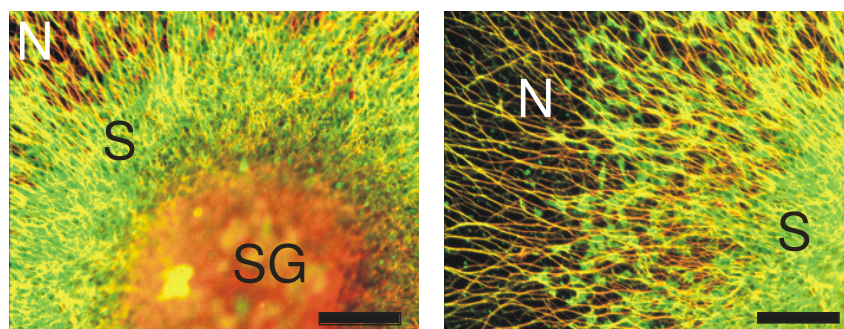


Abb. 8: Organotypisches Auswachsmodell für dorsale Spinalganglien

Die Neurone (N) von kultivierten embryonalen Spinalganglien (SG) lassen sich immunhistochemisch anhand der β III-Tubulin Färbung (rot) und die Schwann-Zellen (S) anhand der S100 β -Färbung (grün) darstellen.

Der Skalierungsbalken entspricht einer Länge von 100 μ m.

Die dichteste Zone im Inneren entspricht dem ursprünglichem SG, welche starke Signale mit dem Neuronenmarker β III-Tubulin und dem Schwann-Zell-Marker S100 β

zeigt (Abb. 8, SG). Die nächste dichte Zone um die SGs herum besteht zu einem großen Teil aus S100 β -positiven Zellen (Schwann-Zellen) (Abb. 8, S). In der äußeren Zone befinden sich hauptsächlich β III-Tubulin positive Fortsätze (Neuriten), die zu einem großen Teil von Schwann-Zellen ummantelt sind (Abb. 8, N).

3.1.4. Auswertung der organotypischen dorsalen Spinalganglion Kulturen

Um das Auswuchsverhalten der kultivierten SGs zu bewerten, wurde die Länge und Dichte der neuronalen Fortsätze sowie die Größe der Schwann-Zell-Zone untersucht. Als repräsentatives Maß für das Längenwachstum wurde die Fläche der Schwann-Zell-Zone und Neuriten-Zone bestimmt.

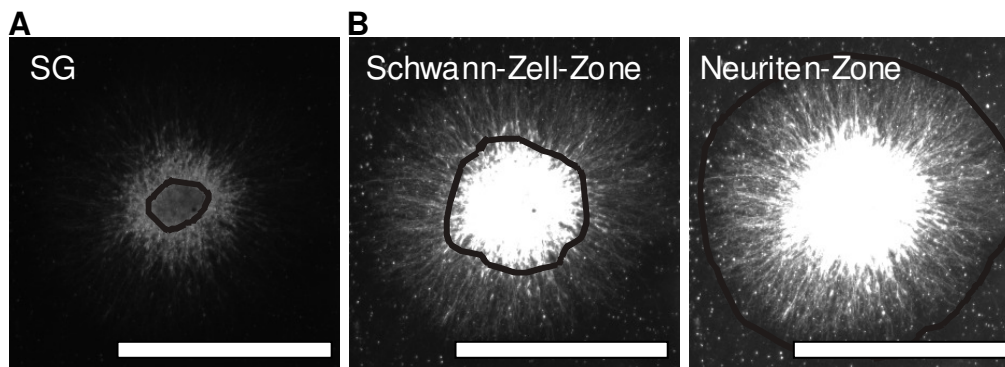


Abb. 9: Lichtmikroskopische Fotos kultivierter Spinalganglien zur Größenbestimmung der drei unterschiedlichen Zonen.

Zur Bestimmung der Größe des SG wurde die Belichtungszeit 444,4 μ s (A), der Schwann-Zell-Zone 241 μ s (B) und der Neuriten-Zone 503 μ s (C) gewählt. Der Skalierungsbalken entspricht einer Länge von 1mm.

Hierzu wurden von jedem SG Fotos mit unterschiedlichen Belichtungen aufgenommen. Für die Darstellung des SGs wurde eine Belichtungszeit von 444,4 μ s, für die Schwann-Zell-Zone 241 μ s und die Neuriten-Zone von 503 ms gewählt. Die Auswertung erfolgte mit der MetaMorph Software. Anhand der Fotos wurde jeweils das Areal markiert das von dem SG (Abb. 9A), den Schwann-Zellen (Abb. 9B) oder den Neuriten (Abb. 9C) eingenommen wurde und die Größe dieser Fläche mit dem Algorithmus *region measurement* bestimmt.

Die Größe der Spinalganglien variiert auf Grund der biologischen Diversität. Um auszuschließen, dass sich die Größe der Schwann-Zell-Zone und Neuriten-Zonen

nur auf Grund der ursprünglichen SG Größe unterscheidet, wurde für die Auswertung die Ratio der Zonen pro SG Größe berechnet.

Die Dichteauswertung der neuronalen Fasern wurde an dem Übergang zwischen der Schwann-Zell-Zone und der Neuriten-Zone bestimmt. Die Auswertung erfolgte an den Fotos mit der höchsten Belichtungszeit (503 μ s). Für die Bestimmung der Neuritendichte wurde eine Skala von 1-4 festgelegt (Abb. 10). Keine sichtbaren Neuriten außerhalb der Schwann-Zell-Zone wurde als Dichtegrad 1, vereinzelte Neuriten als Dichtegrad 2, ein Neuritensaum mit Abständen als Dichtegrad 3 und ein Neuritensaum ohne Abstände als Dichtegrad 4 definiert.

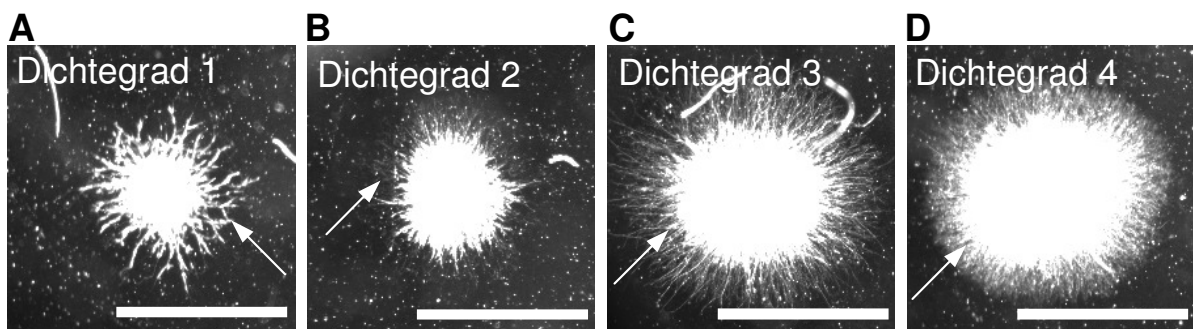


Abb. 10: Lichtmikroskopische Fotos der kultivierten SGs zur Bestimmung der Neuritendichte.

Für die Bestimmung der Neuritendichte wurde eine Skala von 1-4 festgesetzt wobei 1= keine sichtbaren Neuriten außerhalb der Schwann-Zellen (A), 2= einzelne Neuriten (B), 3= Neuritensaum mit Abständen (C) und 4= Neuritensaum ohne Abstände (D) definiert wurde. Der Skalierungsbalken entspricht einer Länge von 1mm.

Die Statistik wurde mit einem „n“ von mindestens 18 Werten berechnet, die sich aus mindestens drei unterschiedlichen Ansätzen zusammensetzten.

3.2. Entorhinale Kortex-Explantate als neuronales Auswachsmodell

Die entorhinalen Kortex-Explantate wurden als Auswachsmodell für das zentrale Nervensystem ausgewählt. Mit Hilfe dieses Versuchsaufbaus wurde das Auswachsverhalten der entorhinalen Kortex Neurone nach einer mechanischen Verletzung (mechanisches Durchtrennung der Axone) unter dem Einfluss verschiedener pro-inflammatorischer Zytokine im organotypischen Modell untersucht.

3.2.1. Präparation entorhinaler Kortex-Explantate

Hierzu wurden die Gehirne von zwei Tage alten (p2) Mäusen entnommen und die beiden Hemisphären von einander getrennt. Die folgenden Präparationsschritte

erfolgten in kaltem Präparationsmedium. Das Areal zwischen dem Neokortex, Hirnstamm und Kleinhirn, welches den Hippokampus und entorhinalen Kortex beinhaltet, wurde freigelegt und der Hippokampus vom EC getrennt. Der EC wurde mit einem Gewebeschneider in 350 µm dicke Explantate geschnitten und die Meningen entfernt.

3.2.2. Kultivierung entorhinaler Kortex-Explantate

Für die Kultivierung wurde jeweils ein Explantat in einer Zellkulturschale mit 12 mm Durchmesser auf ein Deckglässchen gelegt und mit einem Tropfen (30 µl) Kollagen (Fluka, Neu-Ulm, D) überschichtet. Das Kollagen wurde hierzu in 0,1 M Essigsäure gelöst [2mg/ml], mit DMEM-Medium versetzt und durch die Zugabe des Rekonstituierungspuffers neutralisiert. Zur Beschleunigung der Polymerisation des Kollagens wurden die Zellkulturschalen für 15 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Explantate mit 500 µl Inkubationsmedium bedeckt und für 48 h bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Die rekombinanten Zytokine wurden mit 50 bzw. 500 ng/ml zum Inkubationsmedium zugesetzt.

3.2.3. Auswertung der organotypischen entorhinalen Kortex-Kulturen

Als Maß des neuronalen Wachstum wurde die Dichte der auswachsenden Axone an Hand einer Skala (0-3) bestimmt. Waren weniger als drei Axone sichtbar, wurde dem Explantat der Dichtegrad 0 zugewiesen. Bei mehr als drei sichtbaren Axonen mit deutlichem Abstand zwischen ihren Ursprüngen wurde der Dichtegrad 1 (Abb. 11), bei vielen Axonen ohne erkennbaren Abstand zwischen ihren Ursprüngen der Dichtegrad 2 (Abb. 11) und bei vielen Axonen, die gebündelt und parallel zueinander verlaufen der Dichtegrad 3 (Abb. 11) zugewiesen.

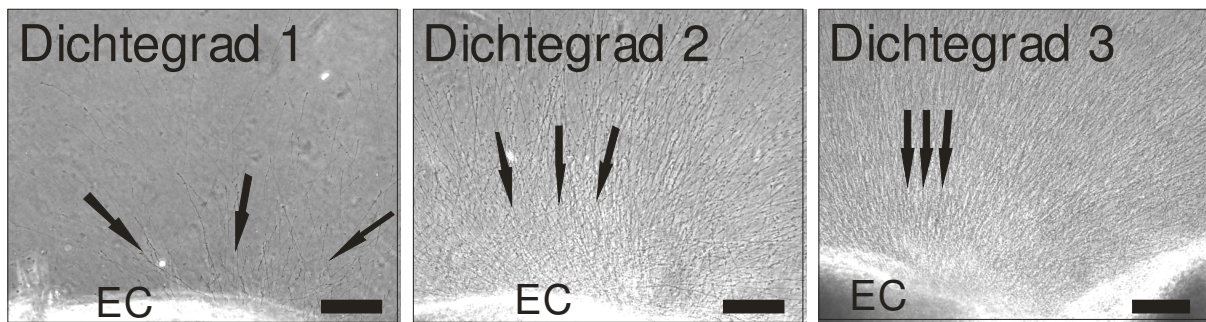


Abb. 11: Lichtmikroskopische Fotos der kultivierten ECs zur Bestimmung der Neuritendichte.

Die EC-Explantate wurden für 48 h in einer dreidimensionalen Kollagenmatrix kultiviert und mittels einer Skala von 0-3 die Dichte der ausgewachsenen Axone bestimmt. Dargestellt sind lichtmikroskopischen Aufnahmen der ECs, die dem Dichtegrad 1, Dichtegrad 2 und Dichtegrad 3 entsprechen. Der Skalierungsbalken entspricht einer Länge von 100 μm .

Die Statistik wurde mit einem „n“ von mindestens 15 Werten berechnet, die sich aus mindestens drei unterschiedlichen Ansätzen zusammensetzten.

3.3. Immunhistochemische Färbungen

Mit dieser Methode werden spezifische Antigene in einem Gewebeverband über eine Antikörperbindung visualisiert. Der Primärantikörper bindet über seine variable Region ein spezifisches Antigen im Gewebe und der Sekundärantikörper bindet an die konstante Region des Primärantikörpers. An die konstante Region des Sekundärantikörpers ist ein Farbstoff gekoppelt, der somit das Antigen visualisierbar macht. Liegt das spezifische Antigen intrazellulär vor werden die Zellen während der Färbung mit Triton-X 100 permeabilisiert. Um möglichst viele unspezifische Bindungsstellen des Sekundärantikörpers zu blockieren wird den Inkubationslösungen Serum zugesetzt, das aus dem gleichen Tier stammt, aus dem der Sekundärantikörper gewonnen wurde. Als Kontrollen für die unspezifische Bindung der Sekundärantikörper wurden die Färbungen ohne die Primärantikörper inkubiert. Für die folgenden Färbungen wurden Fluoreszenzfarbstoffe eingesetzt. Wird der Farbstoff Alexa 568 mit grünem Licht (490-570 nm) angeregt, emittiert er Licht mit einer Wellenlänge zwischen 640-780 nm und wird somit als rotes Lichtsignal wahrgenommen. Regt man den Farbstoff Alexa 488 mit blauem Licht (430-490 nm) an, so emittiert er das Signal mit einer Wellenlänge zwischen 490-570 nm und wird als grünes Lichtsignal wahrgenommen.

Zur besseren Orientierung im Gewebe wurde eine histochemische Gegenfärbung mit dem Hoechstfarbstoff durchgeführt. Der Hoechstfarbstoff interkaliert in der doppelsträngigen DNA und färbt somit alle Zellkerne an. Er wird mit UV-Licht (1-380 nm) angeregt und erscheint als blaues Lichtsignal (430-490 nm). Alle Färbungen wurden mit einer digitalen Kamera (Cool snap ES) an einem Olympus BX50 Mikroskop fotografiert.

3.3.1. Färbungen an Kryoschnitten

Diese Färbungen wurden zur Darstellung der drei Neurotrophin-Rezeptoren TrkA, TrkB und TrkC durchgeführt. Die Embryos wurden für 24 h in 4% PFA fixiert und anschließend zur besseren Kryokonservierung für 48 h in 30% Saccharosepuffer eingelegt. Danach wurden die Embryos in Einbettmedium für Gefrierschnitte eingebettet und in Di-Methyl-Butan eingefroren. Das Gewebe wurde am Kryostaten in 10 µm dicke Schnitte bei -20°C geschnitten, auf Superfrost-Objektträger aufgenommen, für 30 min getrocknet und bis zur Färbung bei -80°C gelagert. Nach dem Auftauen der Schnitte wurden sie für 15 min in 0,1 M Phosphat-Puffer (PB) gewaschen und anschließend in 0,1 M PB mit 10% Serum und 0,1% Triton X-100 für 1 h bei Raumtemperatur geblockt. Der Primärantikörper wurde in 0,1 M PB mit 1% Serum und 0,1% Triton X-100 verdünnt und über Nacht bei 4°C auf den Schnitten inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 0,1 M PB wurde der Sekundärantikörper in 0,1 M PB mit 1% Serum und 0,1% Triton X-100 verdünnt und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Darauf folgte eine 5 min Inkubation mit dem Hoechstfarbstoff (1:20.000) und drei weitere Waschschrte in 0,1 M PB. Die Schnitte wurden in Immu-Mount (Thermo Shandon, Frankfurt, D) eingedeckelt und bis zur Auswertung bei -20°C gelagert. In der Tabelle 1 sind die verwendeten Antikörper mit der jeweiligen Verdünnung angegeben.

3.3.2. Färbungen im Matrigel

Mit dem Marker β III-Tubulin wurden die Neurone und die Schwann-Zellen mit dem Marker S100 β charakterisiert. Nach der Fixierung für 1 h in 4% PFA wurden die SGs dreimal für 10 min in Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS) gewaschen und anschließend zur Permeabilisierung für 10 min in PBS 0,1% Triton X-100 inkubiert. Daraufhin wurden die Antikörperbindungsstellen für 1 h bei Raumtemperatur mittels PBS+ 1% Rinderserumalbumin (BSA) unspezifisch blockiert. Der Primärantikörper

Anti- β IIIITubulin wurde 1:100 in PBS+ 1% BSA verdünnt und über Nacht mit den SGs bei 4°C inkubiert. Nach drei weiteren Waschschritten in PBS wurde der Sekundärantikörper Ziege-anti-Maus Alexa 568 (in PBS+ 1% BSA) für 1 h bei Raumtemperatur zugegeben. Für die Doppelfärbung wurden die gleichen Schritte noch einmal mit dem Primärantikörper Anti-S100 β und dem Sekundärantikörper Ziege-anti-Kaninchen Alexa 488 wiederholt. Anschließend wurden die SGs für 1 min mit dem Hoechst-Farbstoff (1: 20.000) inkubiert. In der Tabelle 1 sind die verwendeten Antikörper mit der jeweiligen Verdünnung angegeben.

Tab. 1: Antikörper für die Immunhistologie

Antikörper	Verdünnung
Kaninchen-anti-Ratte TrkA	1: 5000
Ziege-anti-Maus TrkB	1: 300
Ziege-anti-Maus TrkC	1: 300
Kaninchen-anti-Rind S100 β	1: 50
Maus-anti-Ratte β IIIITubulin	1: 100
Ziege-anti-Kaninchen Alexa 488	1: 250
Ziege-anti-Maus Alexa 568	1: 250
Kaninchen-anti-Ziege Alexa 488	1: 300
Ziege-anti-Kaninchen Alexa 568	1: 300

3.4. Primäre kortikale Einzelzellpräparation zur Analyse von Signaltransduktionswegen

Als Modell zur Analyse der Aktivierung der Trk-Signalwege durch NT3 und Zytokine im zentralen Nervensystem wurden kortikale Neuronen von E15 Mäusen präpariert. Hierzu wurden die Embryone dekapitiert und die beiden Hemisphären unter sterilen Bedingungen in gekühltes HBSS überführt. Die Hemisphären wurden voneinander getrennt und Reste des Kleinhirns und Stammhirns entfernt. Im Anschluss wurden die Meningen von den Kortizes abgelöst und jeweils 10 Kortizes in einem Falconröhrchen mit 5 ml HBSS⁻ (ohne Mg und Ca) gesammelt.

3.4.1. Neuronale Zellkultur

Die Kortizes wurden drei Mal in HBSS⁻ gewaschen. Zur besseren Vereinzelung der Zellen wurde das Gewebe für 30 min mit 0,3% Trypsin bei 37°C inkubiert. Das Trypsin wurde mit 2 ml FKS neutralisiert und es wurden 30 μ g/ml DNase I

zugegeben. Anschließend wurde das Trypsin und FKS durch dreimaliges Waschen in Neuronenmedium wieder entfernt. Nach dem letzten Waschschrift wurden alle Kortizes in ein 50 ml Falconröhrchen überführt und die Zellen mit einer 5 ml Pipette durch Titration vereinzelt. Bei einer Zentrifugation mit 300 xg für 5 min bei 4°C wurden restliche Gewebeproben pelletiert. Die neuronalen Zellen im Überstand wurden bei einer weiteren Zentrifugation mit 900 xg für 5 min bei 4°C pelletiert. Dieses Pellet wurde in 10 ml warmen Neuronenmedium resuspendiert und die Zellzahl bestimmt. Die Zellen wurden in, vorher mit Poly-D-Lysin beschichtete, 6-Well Platten mit einer Dichte von 2 Mio. Zellen/ Well ausgesät und bei 37°C und 5% CO₂ für sechs Tage inkubiert. Nach 24 h erfolgte ein halber Mediumwechsel.

3.4.2. Gemischte Zellkultur

Die Kortizes wurden zwei Mal in HBSS⁻ gewaschen. Zur besseren Vereinzlung der Zellen wurde das Gewebe für 25 min mit 1,5 ml 2,5% Trypsin bei 37°C inkubiert. Das Trypsin wurde mit 1,5 ml FKS neutralisiert und 30 µg/ml DNase I zugegeben und die Zellen mit einer 5 ml Pipette durch Titration vereinzelt. Bei einer Zentrifugation mit 1200 xg für 5 min bei 4°C wurden die Zellen pelletiert und anschließend in 10 ml Mischkulturmedium resuspendiert. Aus dieser Suspension wurden die restlichen Gewebeproben durch ein Zellsieb entfernt und anschließend die Zellzahl bestimmt. Die Zellen wurden in, vorher mit Poly-D-Lysin beschichtete, 6-Well Platten mit einer Dichte von 4 Mio. Zellen/ Well ausgesät und bei 37°C und 5% CO₂ für sechs Tage inkubiert. Nach 24 h erfolgte ein halber Mediumwechsel.

3.4.3. Probenherstellung für die Analyse der Aktivierung Trk-Signalkaskaden

Nachdem die primären kortikalen Zellen für sechs Tage kultiviert wurden, wurden die Zellen 2x mit HBSS (neuronaler Zellkultur) bzw. DMEM (gemischte Zellkultur) gewaschen und für 2 h in HBSS bzw. DMEM mit einem der Zytokine IL-1β, IL-4, IL-6, IFNγ oder TNFα (10 ng/ml) präinkubiert. Anschließend wurden die Proben für 5 min mit NT3 (10 ng/ml) inkubiert und in kaltem PBS 2x gewaschen. Daraufhin wurden die Zellen in 200 µl SDS-Lysepuffer mit einem Zellschaber von den Kulturschalen abgeschabt und die Proteine extrahiert.

3.5. Bestimmung der Zellzahl

Um die Anzahl an lebenden Zellen in einer Suspension zu bestimmen, wurden die Zellen mit dem Farbstoff Trypanblau angefärbt. Dieser Farbstoff kann nur von lebenden Zellen wieder aus der Plasmamembran heraustransportiert werden, womit alle toten Zellen dunkelblau und alle lebenden Zellen hellrosa erscheinen. Die Zellen wurden 1:2 mit Trypanblau verdünnt und anschließend 10 µl in ein Haemocytometer mit einer Einteilung nach Neugebauer eingebracht. Die Zellzahl der Suspension berechnet sich folgendermaßen: gezählte Zellzahl in vier Kästchen einer Diagonalen $\times 4 \times$ Verdünnung (2) \times Volumen der Zellsuspension \times Kammerkonstanten (10^4).

3.6. Proteinextraktion und Konzentrationsbestimmung

Die Zellen wurden in einem SDS-Lysepuffer, der Proteinasen (PMSF, Aprotinin, Leupeptin) und Phosphatasen (Natriumorthovanadat, Natriumpyrophosphat, Glycerolphosphat) enthält, durch mehrmaliges auf und ab pipettieren und eine 3 s Ultraschallbehandlung aufgeschlossen und die Proteine isoliert. Nach der Ultraschallbehandlung wurden die Proben noch für 30 min auf Eis inkubiert und die nicht gelösten Teile durch eine Zentrifugation (16.000 xg, 30 min, 4°C) pelletiert. Die Proteinkonzentration im Überstand der Proben wurde mit dem BCA-Kit über eine BSA-Standardreihe bestimmt. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers und die Absorption wurde bei 562 nm mit dem Biotek Synergy2 gemessen. Die Proteinproben wurden bei -20°C gelagert.

3.7. SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Bei diesem Verfahren werden die Proteine aus einem Gemisch anhand ihrer Molekülgröße aufgetrennt. Das Proteingemisch wird in einem Puffer mit SDS und β -Mercaptoethanol erhitzt, wobei die Tertiär- und Sekundär-Struktur der Proteine aufgehoben werden und alle Proteine, durch die Micellenbildung mit dem SDS, eine konstante negative Ladung pro Masseneinheit haben. Im elektrischen Feld laufen alle Proteine im weitporigen Sammelgel mit gleicher Geschwindigkeit in einem Feldstärkegradienten, der durch die unterschiedliche Mobilität der Glycin- und Chlorid-Ionen in den Puffern hergestellt wird. Am Übergang zum engporigen Trenngel werden die Proteine durch den erhöhten Reibungswiderstand stärker gestaut aber die Glycin-Ionen wandern an den Proteinen vorbei. Dadurch löst sich

der Feldstärkegradient auf und die Proteine liegen nun in einem homogenen Puffer vor, so dass sie sich anhand ihrer Molekulargröße weiter auftrennen.

Von jeder Probe wurden 10 µg Gesamtprotein in einer 10%igen SDS-PAGE bei 70 V im Sammelgel und 140 V im Trenngel aufgetrennt. Zur Orientierung wurde auf jedes Gel 7 µl eines Proteinstandards (250 kDa –10 kDa, BioRad, München, D) mitaufgetragen. Die Elektrophorese wurde gestoppt, wenn die 25 kDa Markerbande aus dem Gel herausgelaufen war. Die Herstellung der SDS- Polyacrylamidgele erfolgte anhand des folgendem Pipettierschemas:

Tab. 2: Pipettierschema für 10%ige SDS-PAGE

	Sammelgel	Trenngel
H ₂ O	4,5 ml	7,2 ml
Trenngelpuffer	----	3,8 ml
Sammelgelpuffer	1,9 ml	----
40% Acrylamid	810 µl	3,75 ml
10% SDS	75 µl	150 µl
10% APS	57 µl	75 µl
TEMED	19 µl	30 µl

3.8. Proteinnachweis mittels Western-Blot

Bei dieser Methode werden die Proteine nach der SDS-PAGE auf einer hydrophoben, mikroporösen Polivinylidenfluorid (PVDF)-Membran fixiert und über eine Antikörperbindung visualisiert.

3.8.1 Proteintransfer vom Gel auf eine PVDF-Membran

Die nach ihrer Größe aufgetrennten Proteine werden auf eine PVDF-Membran transferiert und dort fixiert. Der Transfer auf die Membran erfolgt im elektrisch erzeugten Feldstärkegradienten bei einer konstanten Spannung und die Proteine werden über hydrophobe Wechselwirkungen auf der PVDF-Membran fixiert.

Hierzu musste die PVDF-Membran durch einen kurzen Waschschrift in 100%igen Methanol angefeuchtet werden. Das Methanol wurde durch einen weiteren Waschschrift in Wasser wieder abgewaschen und anschließend wurden ein Blotpapier und das Gel im Kathodenpuffer, die Membran im Anoden-Puffer II und ein weiteres Blotpapier im Anoden-Puffer I für 15 min equilibriert. Der Transfer erfolgte

für 60 min bei 15 V in einer Semi-dry Blotkammer und wurde folgendermaßen aufgebaut: Anode- Blotpapier- Membran- Gel- Blotpapier- Kathode.

Nach dem Transfer wurden die fixierten Proteine auf der Membran in einem Färbebad mit Ponceaurot angefärbt und je nach Größe des nachzuweisenden Proteins in Streifen geschnitten. Anschließend wurde der Farbstoff in TBST-Puffer wieder abgewaschen.

3.8.2. Darstellung von Proteinen über spezifische Antikörper

Der Nachweis der Proteine findet über eine Antigen-Antikörper Reaktion statt. Der Primärantikörper bindet über seine variable Region sein spezifisches Antigen auf der Membran und der Sekundärantikörper bindet an die konstante Region des Primärantikörpers. An die konstante Region des Sekundärantikörper ist das Enzym *horseradish peroxidase* (HRP) gekoppelt. Wird das Enzym mit seinem Substrat inkubiert, so wird bei der chemischen Reaktion Licht ausgesendet. Dieses Signal kann auf lichtempfindlichen Filmen als schwarzes Signal sichtbar gemacht werden.

Tab. 3: Antikörper für die Western-Blots

Antikörper	Verdünnung	Blockierung
Kaninchen-anti-Ratte TrkA	1: 1000	5% Milchpulver
Ziege-anti-Maus TrkB	1: 250	5% Milchpulver
Ziege-anti-Maus TrkC	1: 500	5% Milchpulver
Kaninchen-anti-Human PLC γ 1	1: 500	2% BSA
Kaninchen-anti-Human phosphoPLC γ 1	1: 500	2% BSA
Kaninchen-anti-Maus Akt	1: 500	2% BSA
Maus-anti-Maus phosphoAkt	1: 500	2% BSA
Kaninchen-anti-Ratte MAPKp42/44	1: 500	2% BSA
Maus-anti-Ratte phosphoMAPKp42/44	1: 500	2% BSA
Maus-anti-Maus β -Actin	1: 5000	5% Milchpulver
Schaf Anti-Maus HRP	1: 5000	
Esel Anti-Kaninchen HRP	1: 5000	
Kaninchen Anti-Ziege HRP	1: 5000	

Die Membranen wurden zur Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen für mindestens 1 h bei Raumtemperatur in TBST-Puffer mit 5% Milchpulver bzw. 2% BSA inkubiert. Die Zugabe des Primärantikörpers, der in der Blockierlösung verdünnt wurde, erfolgte über Nacht bei 4 °C. Am nächsten Tag wurde der überschüssige

Primärantikörper innerhalb 30 min in TBST-Puffer von der Membran gewaschen. Der Sekundärantikörper wurde ebenfalls in TBST mit 5% Milchpulver bzw. 2% BSA verdünnt und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach drei weiteren Waschschritten in TBST wurden die Membranen mit der Substrat-Lösung (ECL bzw. ECL Plus) benetzt und Filme je nach Antikörper mit unterschiedlichen Expositionszeiten (15 s, 1 min, 5 min und 10 min) entwickelt. Die Verdünnungen und Blockierungslösungen für die verwendeten Antikörper sind in der Tabelle 3 zusammengefasst.

3.8.3 Wiederverwendung von Western-Blot-Membranen

Um auf ein und derselben Membran mehrere Antikörper testen zu können wird der gebundene Antikörperkomplex von der Membran entfernt. Dies kann zum Beispiel durch die Herabsetzung des pH-Wertes von pH 7.4 auf pH 2.2 erfolgen, wodurch die gebundenen Antikörper zerstört werden und sich somit von der Membran lösen. Anschließend wird die Membran wieder in einem Puffer mit neutralem pH-Wert equilibriert und kann nun erneut verwendet werden.

Diese Methode wurde hier angewendet um auf ein und derselben Membran erst die phosphorylierte Form und anschließend das komplette Protein nachzuweisen. Nach der Entwicklung mit den Phospho-Protein-Antikörpern wurden die Membranen für 10 min bei Raumtemperatur in 100 mM Natriumcitrat pH 2.2 inkubiert, drei Mal für 5 min in TBST gewaschen und der Western Blot mit dem Total-Protein-Antikörper wiederholt.

3.8.4. Auswertung der Western-Blot-Signale

Die Quantifizierung der Western Blot Signale erfolgte mit dem Alphamager. Hierbei wurde ein standardisiertes Feld, das die stärkste Bande eines Western Blots vollständig beinhaltet, über alle Banden gelegt, ein Hintergrund festgelegt und die Intensität des Schwarzwertes in diesem Feld gemessen. Anhand dieser Intensitäten wurde die Aktivierung des Proteins innerhalb einer Probe bestimmt. Hierzu wurde die Intensität des Total-Proteins als 100% festgelegt und der Anteil an phosphoryliertem Protein berechnet. Da sich die Intensitäten der Signale von verschiedenen Western Blots unterscheiden wurden alle Werte auf die Probe mit NT3 normalisiert und anschließend zusammen gefasst. Hieraus wurde der Mittelwert und der

Standardfehler des Mittelwertes berechnet und eine Signifikanzanalyse mit dem Mann-Whitney-U-Test durchgeführt.

3.9. Durchflußzytometrie/ FACS (*fluorescence associated cell sorting*)

Bei dieser Methode werden unterschiedliche physikalische Eigenschaften von Zellen sowie gekoppelte Fluoreszenzfarbstoffe analysiert, in dem sie in einem Flüssigkeitsstrom einzeln einen Laserstrahl passieren. Zum Nachweis der unterschiedlichen Zellpopulationen in der primären und der gemischten primären Neuronenkultur wurden die Astrozyten über das GFAP-Protein, die Neurone über das β III-Tubulin-Protein und die Mikroglia über das CD11b-Protein identifiziert.

Die adhärenenten Zellen wurden zwei Mal in PBS mit 1 mM EDTA gewaschen und anschließend mit 2 ml 0,05% Trypsin+ EDTA für 15 min bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden nun vorsichtig von dem Kulturboden abgeschlagen und in einem 50 ml Falconröhrchen mit 8 ml PBS mit 5% FKS gesammelt. Nach einem Waschschrift in PBS wurde die Zellzahl bestimmt und jeweils 5×10^6 Zellen in einem FACS-Röhrchen gepoolt und bei 1800 xg für 3 min bei 4°C pelletiert. Da es sich bei den folgenden Färbungen um den Nachweis von intrazellulären Proteinen handelt wurden zunächst alle Zellen in 1 ml 2% PFA mit 1% BSA für 30 min auf Eis fixiert. Um das überschüssige PFA wieder aus der Suspension zu entfernen, wurden die Zellen zwei Mal in 1 ml der Waschlösung 1 (PBS mit 1% BSA) gewaschen (Zentrifugation bei 1800 xg, 3 min, 4°C). Um die Zellmembran durchlässig zu machen und die unspezifischen Bindungstellen zu blockieren wurden die Zellen für 30 min mit 100 μ l der Blocklösung (PBS mit 1% BSA, 10% Kaninchenserum und 0,15% Saponin) inkubiert und anschließend bei 1800 xg, 3 min, 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 μ l Primärantikörperlösung (Blocklösung mit Antikörper) resuspendiert und für 1 h bei 4°C inkubiert. Die Proben für den CD11b-Antikörper und die Isotypkontrolle wurden nur in der Blocklösung inkubiert. Hierauf folgten zwei Waschschriffe in 1 ml der Waschlösung 2 (PBS mit 1% BSA und 0,15% Saponin) (Zentrifugation 1800 xg, 3 min, 4°C) und daraufhin die Zugabe von 100 μ l Sekundärantikörperlösung (Blocklösung mit Antikörper). Der überschüssige Sekundärantikörper wurde nach 15 min wieder von den Zellen gewaschen (3x waschen in Waschlösung 2) und das angefärbte Zellpellet in 300 μ l Waschlösung 2 resuspendiert und direkt im Anschluss im FACS-Gerät gemessen. Die verwendeten Antikörper sind in der Tabelle 4 mit

ihrem Verdünnungsfaktor angegeben. Als Kontrollen wurden die Zellen ohne einen Primärantikörper inkubiert bzw. für den direkt gekoppelten CD11b-PE-Antikörper eine Isotypkontrolle mitgeführt.

Tab. 4: Antikörper für die Durchflußzytometrie

Antikörper	Verdünnung
Maus-anti-Schwein GFAP	1: 400
Maus-anti-Ratte β III-Tubulin	1: 500
Kaninchen-anti-Maus R-PE	1: 40
Ratte-anti-Maus CD11b-PE	1: 100
Ratte-Isotyp-PE	1: 100

Für die Auswertung wurden jeweils 10.000 Zellen im FACS-Gerät gezählt und mit der FlowJo Software ausgewertet. Der Ansatz wurde dreimal wiederholt.

3.10. Analyse der Neurotrophin-Rezeptor Expressionslevel auf mRNA-Ebene

Da die Zytokine das neurotrophininduzierte Wachstum der verletzten neuronalen Fortsätze beeinflussen konnte, wurde der Einfluss der Zytokine auf die Expression der Neurotrophinrezeptoren auf mRNA- und Protein-Ebene ermittelt.

3.10.1 Probengewinnung

Für den allgemeinen Nachweis der Trk Rezeptoren wurden E13 SGs und reine primäre kortikale Neurone verwendet. Zur Untersuchung des Zytokineinflusses auf die Expression der Trk-Rezeptoren wurden E13 SGs wie unter Punkt 3.1. beschrieben präpariert und anschließend bei 37°C in SG Kulturmedium mit neurotrophen Faktoren und Zytokinen inkubiert. Dafür wurden die SGs eines Embryos seitenweise zu Gruppen zusammengefasst. Eine Gruppe diente als Kontrolle ohne Zytokin, die andere Seite wurde mit Zytokin behandelt. Nach einer einstündigen Inkubationszeit wurden die SGs in kaltem PBS gewaschen und die RNA isoliert, komplementäre DNA (cDNA) synthetisiert und eine *Real Time* Taqman PCR durchgeführt.

3.10.2. RNA Isolation und cDNA Synthese

3.10.2.1. RNA-Isolation

Die RNA Isolation erfolgte mit dem RNeasy Mini Kit von Qiagen. Die Gewebeprobe wurden in 700 µl Lysepuffer aufgenommen und durch Pipettieren homogenisiert. Dann wurde 1 Vol 70% Ethanol zu den Proben gegeben und die RNA nach den Angaben des Herstellers über die Säulen aufgereinigt. Die Eluierung der Proben erfolgte in 30 µl RNase freiem Wasser.

3.10.2.2. DNase-Verdau

Die so gewonnene RNA wurde von kontaminierender DNA befreit. Hierzu wurde der DNA-free Kit von Ambion benutzt. Es wurden die 30 µl RNA-Probe mit 3 µl 10x DNase I Puffer und 1 µl DNase I bei 37°C für 1 h inkubiert. Anschließend wurden 3 µl DNase-Inaktivierungsreagenz zugegeben, 2 min bei Raumtemperatur inkubiert und der Ansatz mehrmals gevortext. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 10.000 xg für 1,5 min wurde der Überstand abgenommen und bis zur cDNA-Synthese bei -80°C gelagert.

3.10.2.3. cDNA-Synthese

Da die RNA-Menge aus einem Ansatz nur sehr geringe Konzentrationen aufweist, wurde keine Quantifizierung der RNA durchgeführt, sondern jede Probe komplett verwendet. Mit $\frac{1}{3}$ der Probe wurde die cDNA-Synthese ohne reverse Transkriptase (RT⁻) und mit $\frac{2}{3}$ der Probe die Synthese mit reverser Transkriptase durchgeführt (RT⁺). Es wurde ein 2x Mastermix aus 10x RT Puffer, 25x dNTP-Mix, und 10x Random-Primer angesetzt und im gleichen Volumen zu den RNA-Proben gegeben. Zu den RT⁺ Proben wurde zusätzlich noch 2 µl MultiScribe RT (50 U/µl) pipettiert. Der RT⁻ Ansatz erfolgte in einem Endvolumen von 20 µl, der RT⁺ Ansatz in 40 µl. Die Proben wurden bei 25°C für 10 min und anschließend bei 37°C für 2 h inkubiert. Bis zur weiteren Verwendung wurden die cDNAs bei -80°C gelagert.

3.10.3. Relative Quantifizierung der cDNA durch *Real-Time* Taqman PCR

Zur relativen quantitativen Analyse der mRNA Menge der Trk-Rezeptoren wurde eine *Real Time* Taqman PCR durchgeführt. Diese Methode ermöglicht die Quantifizierung in „Echtzeit“. Hierbei wird zusätzlich zu den PCR Primern noch eine Sonde zu dem

Reaktionsansatz gegeben, die in der zu amplifizierenden Sequenz bindet. An diese Sonde ist ein Fluoreszenzfarbstoff (Reporter; hier FAM) und ein Quencher (hier TAMRA) gekoppelt. Durch die räumliche Nähe des Quenchers zu dem Reporter wird die Emission des Reporters unterdrückt. Wird die an der cDNA gebundene Sonde während der Doppelstrangpolymerisation von der Matrize verdrängt, wird der Quencher durch die Exonuklease Aktivität der Polymerase von der Sonde gespalten und die Emission des Reporters kann gemessen werden. Somit ist der Anstieg des Fluoreszenzsignals proportional zur Amplifikationsmenge der Zielsequenz. Für jede Probe wird eine PCR für ein Haushalts-Gen und ein Ziel-Gen durchgeführt.

Die Primer/Sonden für die TrkA-, TrkB-, und TrkC-Rezeptoren wurden von Applied Biosystems hergestellt, die Sequenzen für Primer und Sonde für das Haushalts-Gen β -Actin sind unter 2.5 aufgeführt. Von jeder RT⁺ und RT⁻ Probe wurde 1 μ l cDNA pro Reaktionsansatz eingesetzt. Für die Taqman PCR wurden die Ansätze nach folgendem Schema pipettiert:

Tab. 5: Pipettierschema für die RT PCR

	Trk-Rezeptoren	β -Actin
Fast Master Mix	6,5 μ l	6,5 μ l
H ₂ O	4,9 μ l	2 μ l
Primer	0,65 μ l	3 μ l
Sonde	---	0,5 μ l
cDNA	1 μ l	1 μ l
Gesamtvolumen	13 μ l	13 μ l

Die Versuche wurden im Applied Biosystems Gerät (ABI 7500 Fast) im Fast Modus durchgeführt (95 °C 20 s und anschließend 40 Zyklen mit 95 °C 3 s und 60 °C 30 s).

Für die Auswertung wurde eine relative quantitative Analyse ($2^{-\Delta\Delta CT}$ Methode nach Livak and Schmittgen 2001) durchgeführt. Der CT-Wert gibt an, in welchem PCR-Zyklus zum ersten Mal ein positives Fluoreszenzsignal gemessen wurde. Der $2^{-\Delta CT}$ Wert gibt die Expressionsstärke des Ziel-Gens im Verhältnis zum Haushalts-Gen an und der $2^{-\Delta\Delta CT}$ Wert gibt an, um ein wie Vielfaches sich die Expression des Ziel-Gens in einer behandelten Probe im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle verändert hat. (Für die Berechnung notwendige Formeln: $\Delta\Delta CT = \Delta_2 CT - \Delta_1 CT$; wobei $\Delta_1 CT = CT_{\text{Ziel-Gen}} - CT_{\text{Haushalts-Gen}}$ der Kontrolle und $\Delta_2 CT = CT_{\text{Ziel-Gen}} - CT_{\text{Haushalts-Gen}}$ der behandelten Probe ist.) Die Differenz von einer log-Stufe bei dem $2^{-\Delta CT}$ Wert entspricht einem

10fachen Expressionsunterschied. Da eine Pipettierungenauigkeit von einem halben Zyklus innerhalb einer Doppelbestimmung zugelassen wurde, wurden bei der $2^{-\Delta\Delta CT}$ Auswertung Werte zwischen 0,5 und 2 nicht als verändertes Expressionlevel des Ziel-Gens betrachtet.

3.11. Statistische Auswertung

Jeder Versuch wurde mindestens drei Mal durchgeführt. Ob sich die durchschnittlichen Werte eines Versuches signifikant voneinander unterscheiden wurde an Hand des Mann-Whitney-U-Test ermittelt. Der Mann-Whitney-U-Test wird bei voneinander unabhängigen Stichproben, die nicht normalverteilt sind angewendet. Als Null-Hypothese wird davon ausgegangen, dass sich die Mediane zweier Gruppen nicht voneinander unterscheiden. Ist der errechnete Signifikanzwert $<0,05$ so kann die Null-Hypothese mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% abgelehnt werden. Die Signifikanzberechnung erfolgte mit der Prism-Software des Programms GraphPad.

4. Ergebnisse

Um den Einfluss von Zytokinen auf das Auswachsen von peripheren und zentralen Neuronen nach einer mechanischen Läsion zu bestimmen, wurden organotypische Auswachsmodelle untersucht. Da dieses Wachstum von neurotrophen Faktoren abhängig ist, wurde die Expression der Neurotrophin-Rezeptoren und deren Signalkaskaden unter dem Einfluss der Zytokine analysiert.

4.1. Organotypische Modelle zum Nachweis neuronalen Wachstums nach mechanischen Läsionen

Um das Wachstumsverhalten von verletzten Neuronen im peripheren und zentralen Nervensystem zu analysieren wurden organotypische Auswachsmodelle untersucht.

4.1.1. Kultivierung von dorsalen Spinalganglien als neuronales Auswachsmodell für das periphere Nervensystem

Als Auswachsmodell für verletzte periphere Neurone wurden E13 SGs in einer dreidimensionalen Matrigelmatrix verwendet. Nach Kultivierung der SGs für 48h mit neurotrophen Faktoren konnten drei Zonen mit unterschiedlicher Dichte charakterisiert werden (siehe hierzu 3.1.3), die im folgenden als SG, Schwann-Zell-Zone und Neuriten-Zone beschrieben werden.

4.1.1.1. Einfluss von neurotrophen Faktoren auf das Wachstum der dorsalen Spinalganglien

Um den Einfluss von neurotrophen Faktoren auf das Auswachsverhalten von SG-Neuronen zu untersuchen, wurden die SGs für zwei Tage mit exogenem NGF, NT3 bzw. NT4 (50 ng/ml) alleine oder in Kombination inkubiert. Hierbei zeigte sich für jeden neurotrophen Faktor ein spezifisches Auswachsmuster für die Neuritenlänge, Dichte und die Schwann-Zell-Zone.

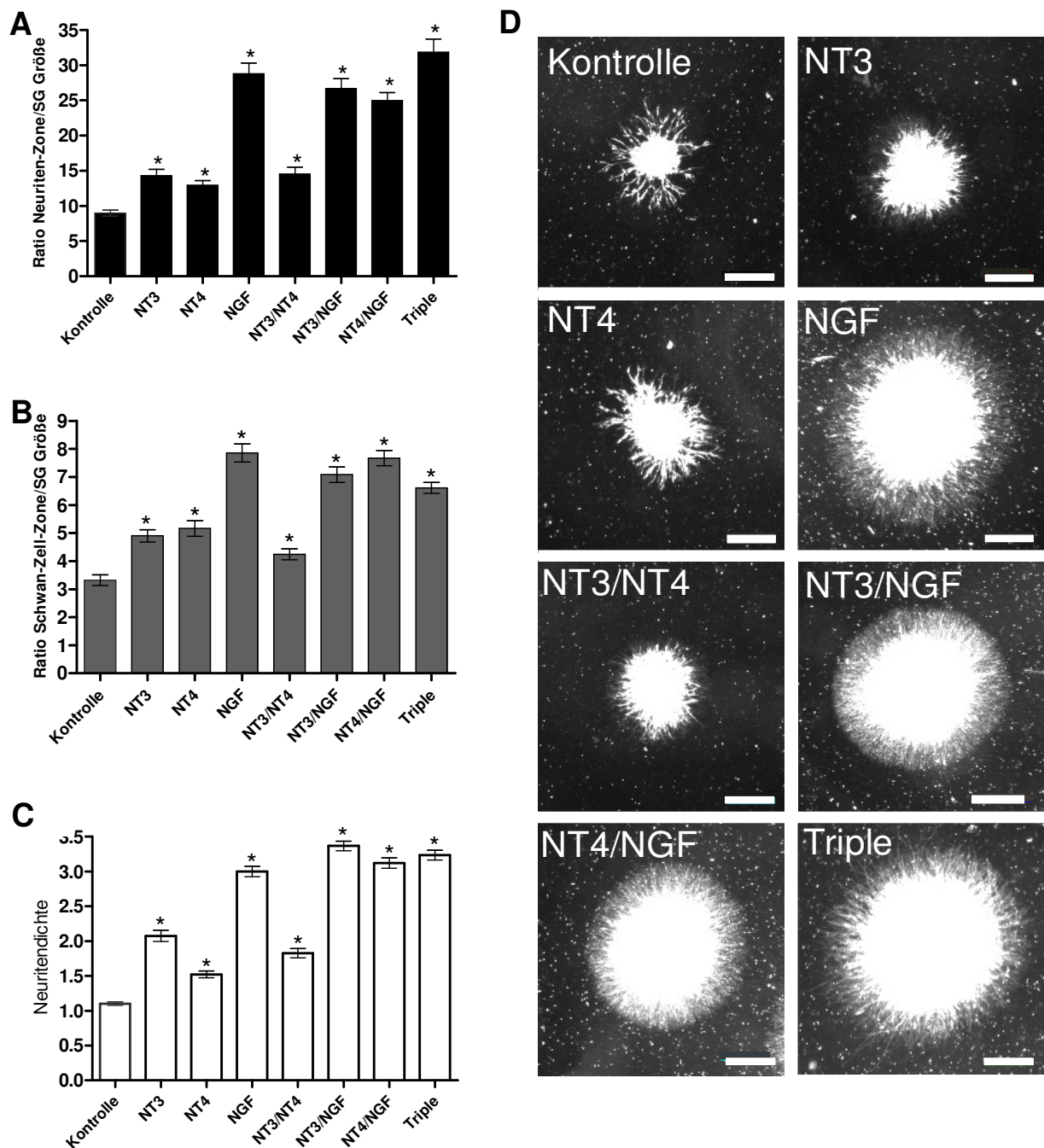


Abb. 12: Neurotrophe Faktoren verändern das Auswachsverhalten von E13 SGs.

Die SGs wurden für 2 Tage mit den neurotrophen Faktoren NT3, NT4 und NGF allein oder in Kombination (je 50 ng/ml) kultiviert. (A) Das Längenwachstum der Neuriten ist als Ratio der Neuritenzone pro SG-Größe angegeben. (B) Das Längenwachstum der Schwannzellen ist als Ratio der Schwann-Zell-Zone pro SG-Größe dargestellt. (C) Die Neuritendichte wird auf einer Skala von 1-4 als Mittelwert \pm sem ($n = 80$) dargestellt. Die Signifikanzen sind im Vergleich zur Kontrolle dargestellt ($p < 0,005$). (D) Lichtmikroskopische Aufnahmen von neurotrophinbehandelten, kultivierten SGs. Der Skalierungsbalken entspricht einer Länge von 300 μm .

Wurden die SGs ohne exogene neurotrophe Faktoren inkubiert, so zeigte sich nur ein minimales Neuritenwachstum. Die Neuriten und Schwann-Zellen lagen in einigen dicken Büscheln mit deutlichem Abstand zueinander vor (Abb. 12). Durch die Zugabe von neurotrophen Faktoren konnte das Wachstum stimuliert werden. Die Zugabe von NT3 stimulierte im Vergleich zur Kontrolle sowohl das Längenwachstum der Neuriten als auch ihre Dichte (Abb. 12A,C,D). Auch NT4 erhöhte die Länge der Neuriten im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 12A,D), wohingegen die Morphologie und Dichte der Neuriten und Schwann-Zellen denen der Kontrolle ähnelten (Abb. 12B,C,D).

Die NT3- induzierte Neuritenlänge unterschied sich nicht signifikant von der NT4-induzierten Länge (Abb. 12A,D), wohingegen die Neuritendichte durch die Inkubation mit NT3 im Vergleich zu NT4 signifikant gesteigert wurde ($p < 0,005$; Abb. 12C,D).

Die Kombination von NT3/NT4 zeigte keinen stärkeren Effekt beim Längenwachstum als NT3 oder NT4 allein (Abb. 12A,D). Die Dichte war im Vergleich zu NT4 allein signifikant erhöht ($p < 0,05$) und im Vergleich zu NT3 alleine ($p < 0,05$) signifikant verringert (Abb. 12C,D). Durch die Zugabe von NGF konnte das Wachstum der Neuriten im Gegensatz zur NT3- oder NT4- Behandlung signifikant ($p < 0,005$) gesteigert werden (Abb. 12A-D). Sowohl die Kombination von NGF mit NT3 oder NT4 als auch die Dreifach-Kombination zeigte im Vergleich zu NGF allein kein signifikant gesteigertes Längenwachstum (Abb. 12A,D). Die Dichte der Neuriten konnte durch die Kombination von NT3 mit NGF und die Dreifach-Kombination im Vergleich zu NGF allein signifikant ($p < 0,005$) erhöht werden (Abb. 12C,D).

Auch die Schwann-Zell-Zone wurde durch die Kultivierung mit exogenen neurotrophen Faktoren signifikant vergrößert. Es zeigte sich hier eine vergleichbare Relation unter den verschiedenen Gruppen wie beim Neuritenlängenwachstum (Abb. 12A,B).

Um zu testen ob das spontane Auswachsen auf endogen produzierte Neurotrophine zurückzuführen ist, wurden die SGs mit dem Neurotrophin-Rezeptor Inhibitor K252a behandelt. Selbst in der geringsten Konzentration von 10 nM konnte K252a das Neuritenwachstum und die Schwannzellen in den Kontrollen blockieren, wohingegen DMSO, das Lösungsmittel für K252a, keinen Einfluss zeigte (Abb. 13A,B).

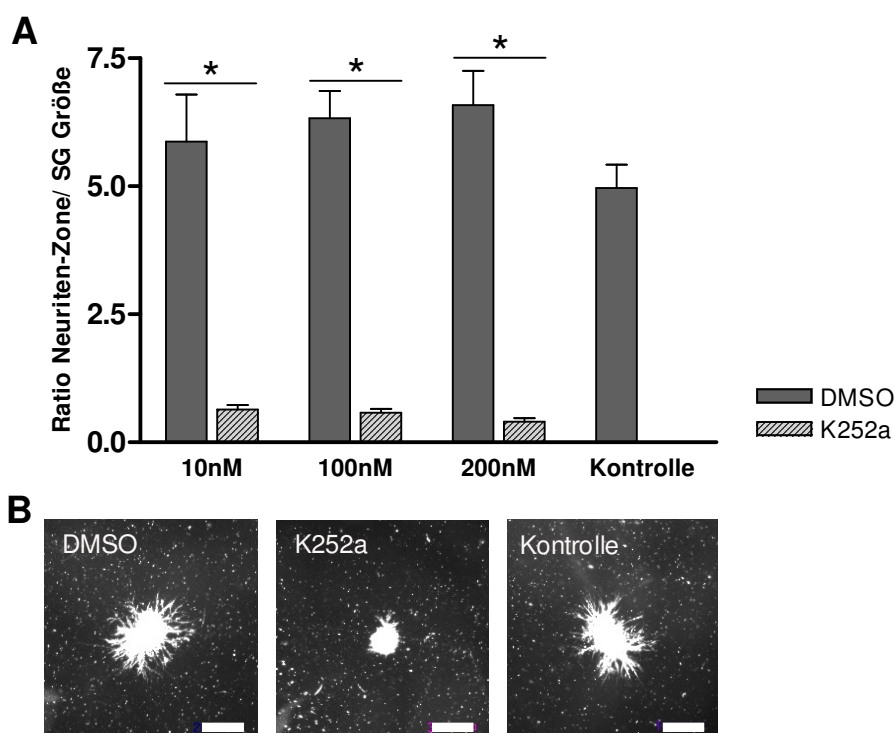


Abb. 13: Das spontane Wachstum der SGs lässt sich durch den Trk-Rezeptor Blocker K252a vollständig eliminieren.

(A) Das Neuritenlängenwachstum ist als Ratio der Neuritenzone pro SG Größe angegeben. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm sem ($n=6$). (B) Lichtmikroskopische Aufnahmen von DMSO und K252a behandelten SGs. Der Skalierungsbalken entspricht einer Länge von $300\mu\text{m}$.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Auswuchsverhalten der Spinalganglien von neurotrophen Faktoren abhängig ist, und dass die hier getesteten neurotrophen Faktoren NGF, NT3 und NT4 ein jeweils charakteristisches Auswuchsmuster induzieren konnten.

4.1.1.2. Einfluss von Zytokinen auf das Wachstum der dorsalen Spinalganglien

Um den Einfluss von Zytokinen auf das Wachstum von SGs zu untersuchen, wurden die SGs mit allen Kombinationen neurotropher Faktoren (50 ng/ml) und Zytokinen in unterschiedlichen Konzentrationen (niedrige Dosierung 50 ng/ml; hohe Dosierung 500 ng/ml) kultiviert. Es wurden typische pro-inflammatorische Zytokine (IL-1 β , IL-6 und TNF α) sowie die Markerzytokine für Th1-Zellen (IFN γ) und Th2-Zellen (IL-4) verwendet.

IL-1 β zeigte weder in der niedrigen noch in der hohen Konzentration einen Einfluss auf das neurotrophininduzierte Neuritenlängenwachstum. (Daten nicht gezeigt). Eine hohe IL-6 Konzentration führte zu keiner Veränderung des Längenwachstums (Daten nicht gezeigt). Bei der geringeren Dosierung zeigte sich jedoch eine signifikante Reduktion in der Kontrollgruppe und eine signifikante Steigerung des NT3/NT4-induzierten Wachstums (Abb. 14). Diese Steigerung konnte auch bei einer geringeren Konzentration von IL-6 (10 ng/ml) beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

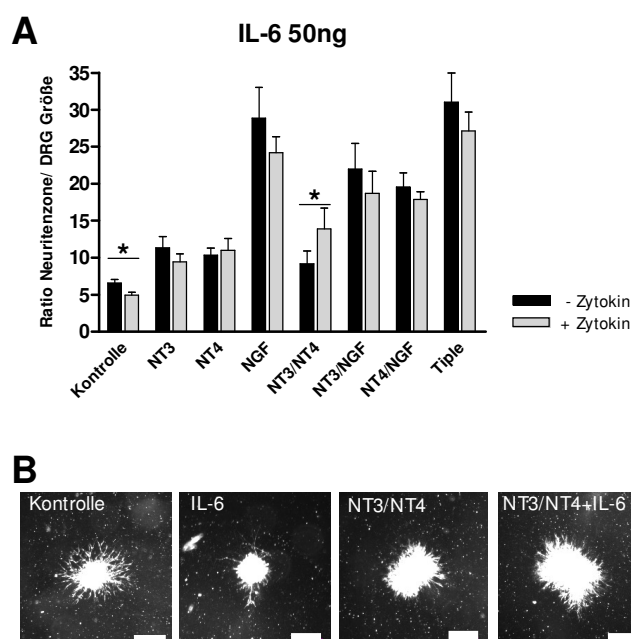


Abb. 14: IL-6 hat nur in geringer Konzentration einen steigernden Effekt auf das Auswachsen von kultivierten SGs.

Die E13 SGs wurden für 48h sowohl mit den neurotrophen Faktoren NT3, NT4 und NGF allein als auch in Kombinationen (je 50 ng/ml) und IL-6 in niedriger Konzentration (50 ng/ml) kultiviert. (A) Das Neuritenwachstum ist als Mittelwert \pm sem dargestellt. (B) Lichtmikroskopische Aufnahmen der ausgewachsenen SGs in den signifikant veränderten Gruppen. Der Skalierungsbalken entspricht einer Länge von 300 μ m.

Durch $\text{TNF}\alpha$ kam es zu einer Wachstumsreduktion. In geringer Dosierung hemmte es signifikant das Längenwachstum der Neuriten in der Kontrolle (Abb. 15A,C) und in hoher Dosierung reduzierte es signifikant das NT3-induzierte Wachstum sowie das Wachstum, dass durch NGF/NT3, NGF/NT4 oder die Dreifach-Kombination induziert wurde (Abb. 15B,C). Auch das NGF-induzierte Wachstum wurde tendenziell vermindert.

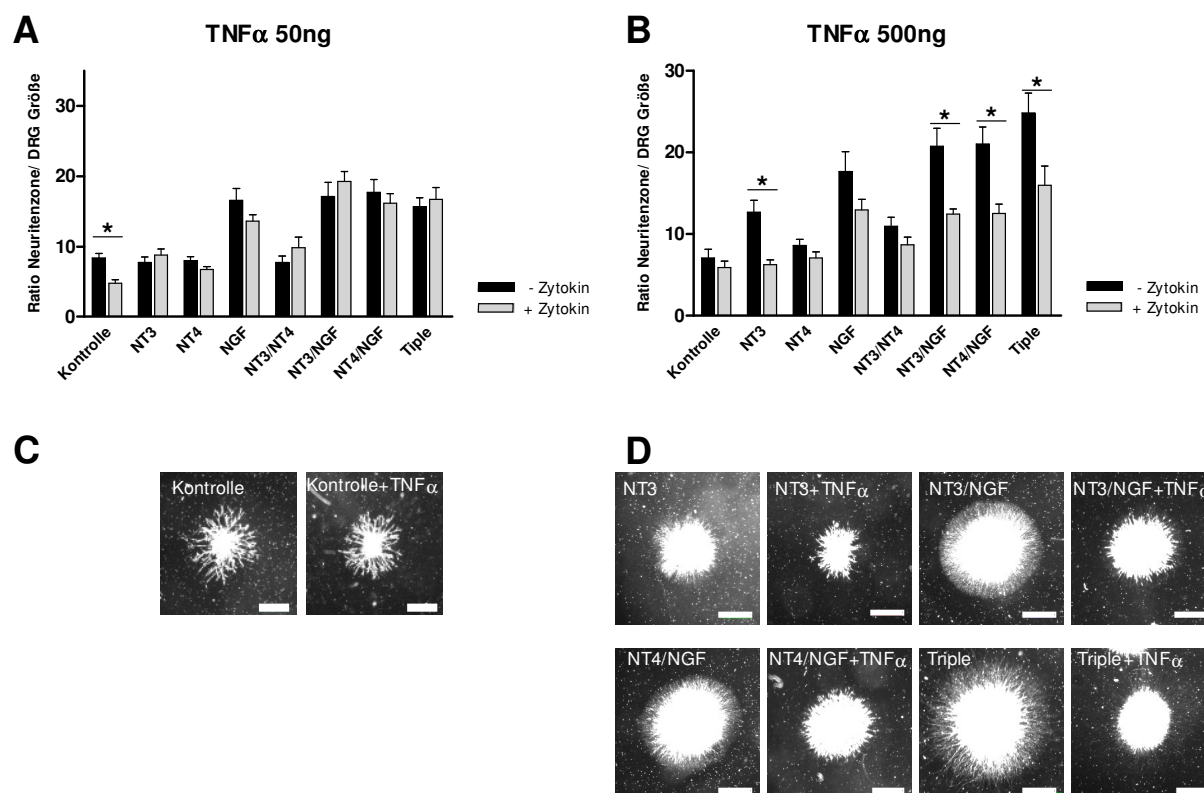


Abb. 15: $\text{TNF}\alpha$ hat einen hemmenden Effekt auf das Auswachsen von kultivierten SGs.

Die E13 SGs wurden für 48h sowohl mit den neurotrophen Faktoren NT3, NT4 und NGF allein als auch in Kombinationen (je 50 ng/ml) und $\text{TNF}\alpha$ in niedriger (50 ng/ml) und hoher (500 ng/ml) Konzentration kultiviert. (A,B) Das Neuritenwachstum ist als Mittelwert \pm sem dargestellt. (C,D) Lichtmikroskopische Aufnahmen der ausgewachsenen SGs in den signifikant veränderten Gruppen. Der Skalierungsbalken entspricht einer Länge von 300 μm .

IFN γ veränderte das Neuritenwachstum der Spinalganglien nur bei einer hohen Dosierung. Es führte zu einer signifikanten Verstärkung des NT3/NT4- und NT3/NGF-induzierten Wachstums (Abb. 16A,B).

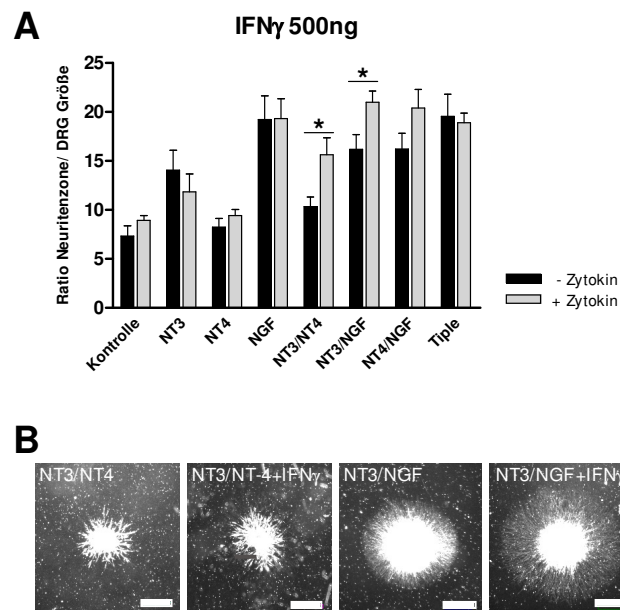


Abb. 16: IFN γ hat in hoher Konzentration einen steigernden Effekt auf das Auswachsen von kultivierten SGs.

Die E13 SGs wurden für 48h sowohl mit den neurotrophen Faktoren NT3, NT4 und NGF allein als auch in Kombinationen (je 50 ng/ml) und IFN γ in hoher Konzentration (50 ng/ml) kultiviert. (A) Das Neuritenwachstum ist als Mittelwert \pm sem dargestellt. (B) Lichtmikroskopische Aufnahmen der ausgewachsenen SGs in den signifikant veränderten Gruppen. Der Skalierungsbalken entspricht einer Länge von 300 μ m.

Da die Schwann-Zell-Zone durch 500 ng/ml IFN γ signifikant reduziert wurde (Abb. 17A,B) konnte keine äquivalente Dichteausswertung der Neuriten erfolgen.

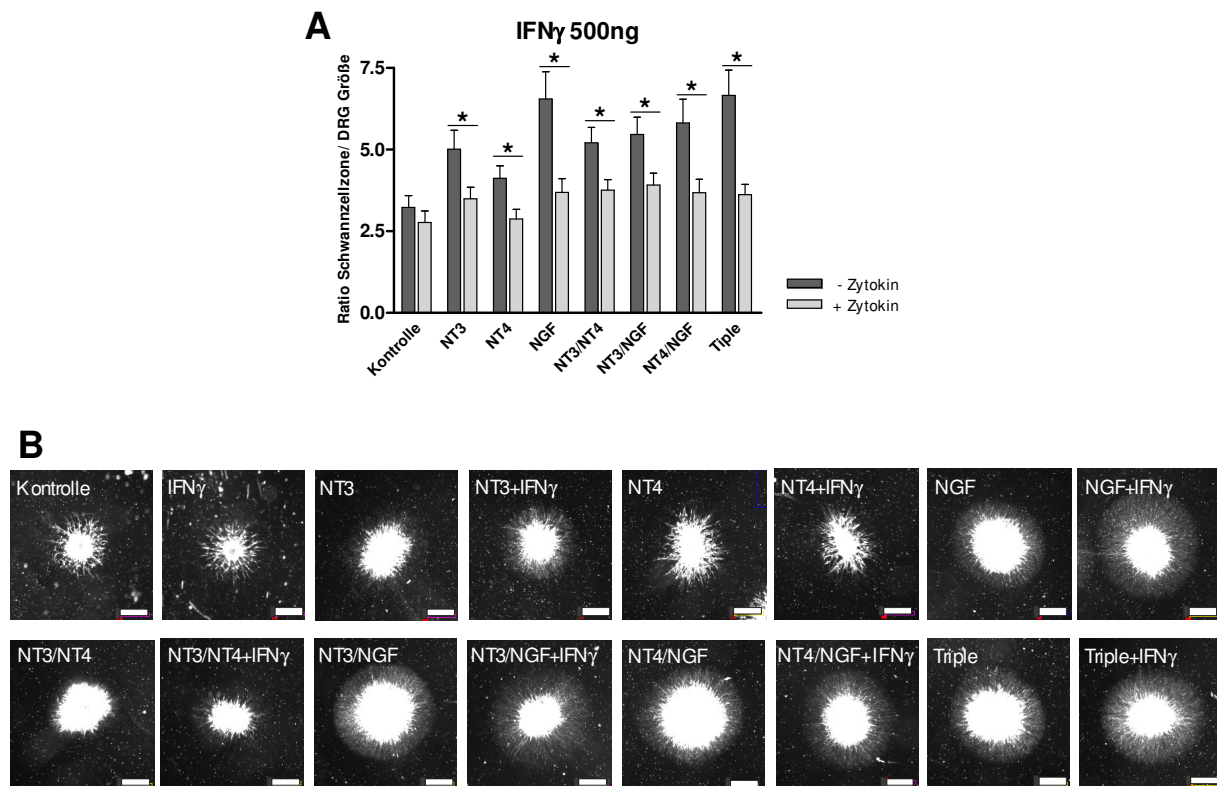


Abb. 17: IFN γ reduziert in hoher Konzentration die Schwann-Zell-Zone.

Die E13 SGs wurden für 48h sowohl mit den neurotrophen Faktoren NT3, NT4 und NGF allein als auch in Kombinationen (je 50 ng/ml) und IFN γ in hoher Konzentration (500 ng/ml) kultiviert. (A) Die Schwann-Zell-Zone ist als Mittelwert \pm sem dargestellt. (B) Lichtmikroskopische Aufnahmen der kultivierten SGs. Der Skalierungsbalken entspricht einer Länge von 300 μ m.

IL-4 beeinflusste das Längenwachstum in dosisabhängiger Weise. In geringer Konzentration hemmte es signifikant das NT4/NGF-abhängige Wachstum sowie das Wachstum in der Dreifach-Neurotrophin-Kombination (Abb. 18A,C). In der hohen Konzentration konnte es das NT4-induzierte Wachstum signifikant steigern (Abb. 18B,D).

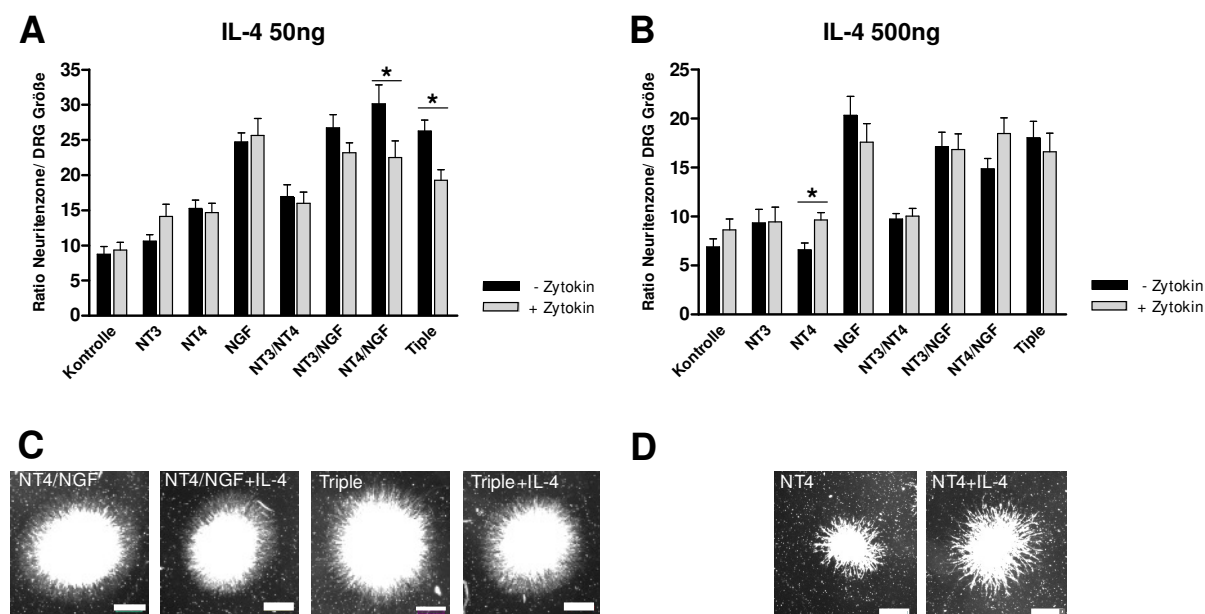


Abb. 18: IL-4 hat dosisabhängige Effekte auf das Auswachsen von kultivierten SGs.

Die E13 SGs wurden für 48h sowohl mit den neurotrophen Faktoren NT3, NT4 und NGF allein als auch in Kombinationen (je 50 ng/ml) und IL-4 in niedriger (50 ng/ml) und hoher (500 ng/ml) Konzentration kultiviert. (A,B) Das Neuritenwachstum ist als Mittelwert \pm sem dargestellt. (C,D) Lichtmikroskopische Aufnahmen der ausgewachsenen SGs in den signifikant veränderten Gruppen. Der Skalierungsbalken entspricht einer Länge von 300 μ m.

Die Neuritendichte wurde durch keines der getesteten Zytokine verändert.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die hier untersuchten Zytokine das neurotrophininduzierte Längenwachstum der embryonalen Spinalganglien auf unterschiedliche Weise beeinflussen können.

4.1.2. Kultivierung von entorhinalen Kortex (EC)-Explantaten als neuronales Auswachsmo- dell für das zentrale Nervensystem

Um das Auswachsen von verletzten Neuronen des zentralen Nervensystems zu untersuchen, wurden entorhinale Kortex-Explantate von p2 Mäusen in einer dreidimensionalen Kollagenmatrix kultiviert und nach 48 h deren Neuritendichte bestimmt. Auf die exogene Zugabe neurotropher Faktoren wurde in diesem Modell verzichtet, da die EC-Explantate selbst hohe Level neurotropher Faktoren

produzieren (NT3 [90 pg/ml], NT4 [40 pg/ml] und NGF [65 pg/ml]; Hendrix *et al.* in Revision), welche das Auswachsen der Neuriten in unbehandelten Kulturen stimulierte.

4.1.2.1. Einfluss von Zytokinen auf das neuronale Wachstum der entorhinalen Kortex-Explantate

Um den Einfluss von IL-6, IFN γ , TNF α und IL-1 β auf das Wachstum der verletzten entorhinalen Kortex-Neurone zu untersuchen, wurden die EC-Explantate von p2 Mäusen für 48 h mit den Zytokinen in niedriger (50 ng/ml) und hoher (500 ng/ml) Dosis kultiviert.

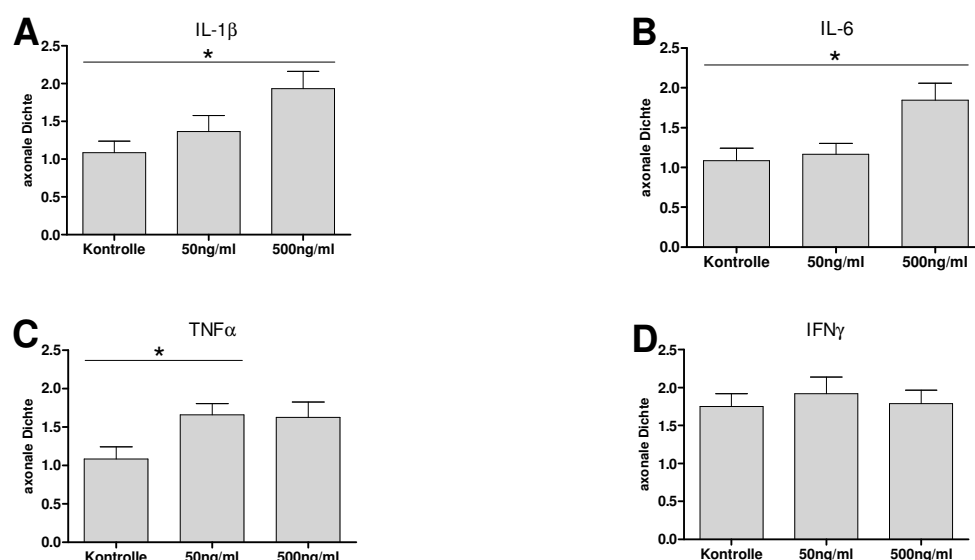


Abb. 19: IL-1 β , IL-6 und TNF α erhöhen die axonale Dichte von kultivierten EC-Explantaten.

Die EC-Explantate wurden für 48 h mit IL-1 β , IL-6, TNF α bzw. IFN γ in niedriger (50 ng/ml) und hoher (500 ng/ml) Konzentration kultiviert. (A-D) Die Dichte der auswachsenden Neuriten ist als Mittelwert \pm sem dargestellt.

Die Dichte der ausgewachsenen Neuriten konnte durch die Zugabe von 500 ng/ml IL-1 β (Abb. 19A), 50ng/ml IL-6 (Abb. 19B) und 500 ng/ml TNF α (Abb. 19C) signifikant gesteigert werden. IFN γ hat weder in der niedrigen noch in der hohen Konzentration die Dichte der ausgewachsenen Axone signifikant verändert (Abb. 19D).

4.2 Neurotrophin-Rezeptor (Trk)-Expression

Da die Ergebnisse der organotypischen Auswachsassays darauf hin deuten, dass der Einfluss der Zytokine auf das neuronale Auswachsen neurotrophinabhängig ist, wurde der Einfluss der Zytokine auf das Expressionslevel der Neurotrophin-Rezeptoren untersucht.

4.2.1. Trk-Rezeptor-Nachweis im peripheren und zentralen Nervensystem auf Protein- und mRNA-Ebene

Zu den spezifischen Neurotrophin-Rezeptoren gehören die *tropomyosin-related kinases* (Trk) A, B und C, welche sowohl in kurzen und langen Spleißvarianten exprimiert werden. Die Expression der Neurotrophin-Rezeptoren TrkA, TrkB und TrkC wurde in der Immunhistologie, im Western-Blot und über die relative, quantitative PCR untersucht.

4.2.1.1. Immunhistochemische Färbungen der Trk-Rezeptoren im SG

Die Verteilung der Neurotrophin-Rezeptoren in den Spinalganglien wurde mittels immunhistochemischer Färbungen an Kryoschnitten von E13 Embryonen dargestellt. Auf ca. 80% der Zellen in den SGs war ein Signal für den TrkA-Rezeptor nachzuweisen wohingegen kein positives TrkA-Signal im Rückenmark zu detektieren war (Abb. 20A). Die stärksten Signale für die TrkB- und TrkC-Rezeptoren waren im Rückenmark zu finden und nur auf ca. 20% der Zellen im SG (Abb. 20B,C).

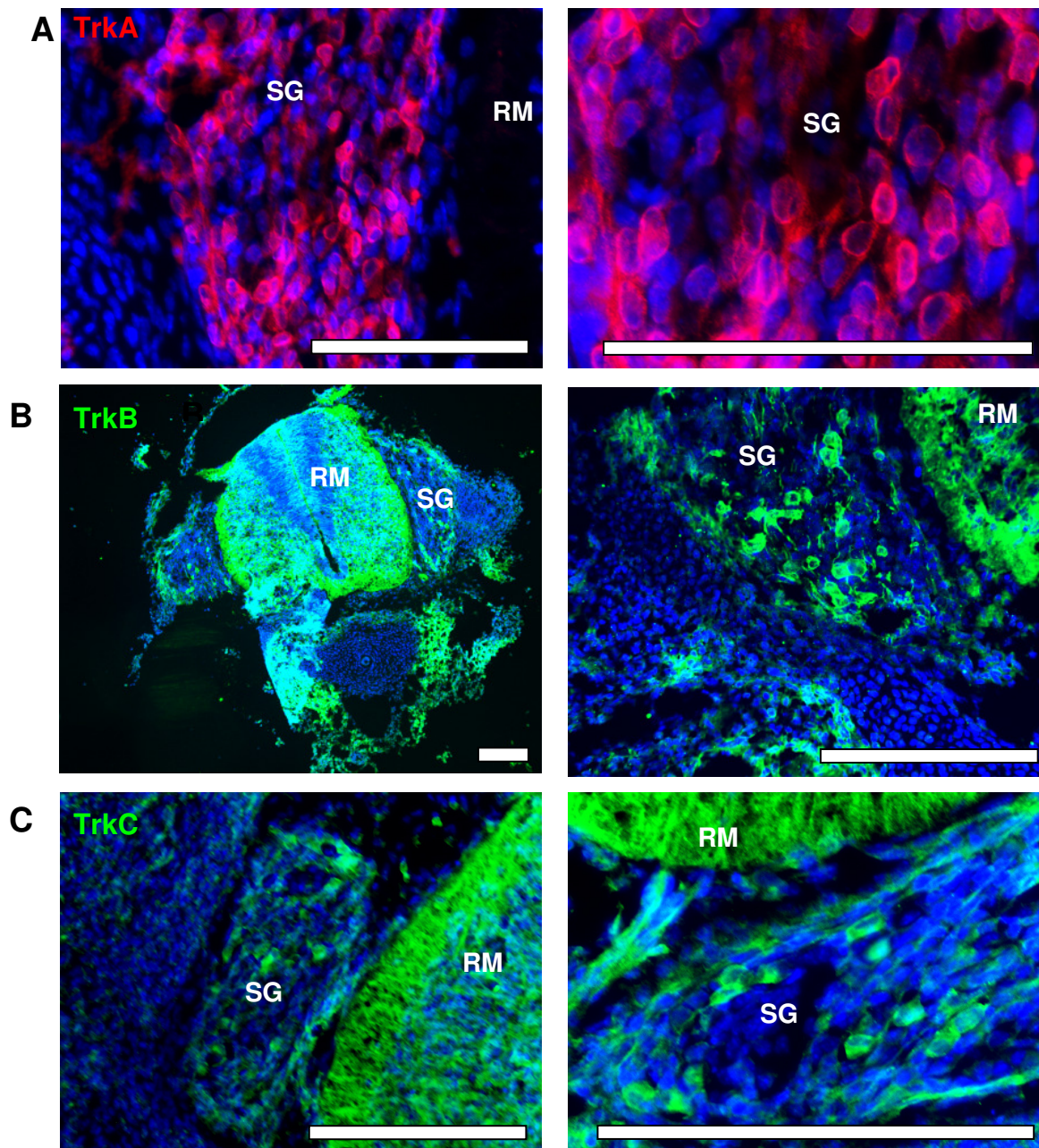


Abb. 20: Immunhistochemischer Nachweis des TrkA-, TrkB- und TrkC-Rezeptors in embryonalen Spinalganglien.

Die Neurotrophin-Rezeptoren wurden durch spezifische Antikörper auf Kryoschnitten von E13 Embryonen angefärbt und die Zellkerne durch den Hoechst-Farbstoff (blau) markiert. (A) TrkA-Rezeptor (rot), (B) TrkB-Rezeptor (grün) und (C) TrkC-Rezeptor (grün). Der Skalierungsbalken entspricht einer Länge von 300 μm . (SG= Spinalganglion; RM= Rückenmark)

4.2.1.2. Western-Blot-Nachweis der Trk-Rezeptoren in den dorsalen Spinalganglien und den entorhinalen Kortex-Explantaten

Von den E13 SGs und den p2 EC-Explantaten wurde Gesamtprotein isoliert und jeweils 10 µg dieses Lysats über eine 10%ige SDS-PAGE aufgetrennt, die Proteine auf eine PVDF-Membran geblottet und die Trk-Rezeptoren über spezifische Antikörper mittels Chemilumineszenz visualisiert.

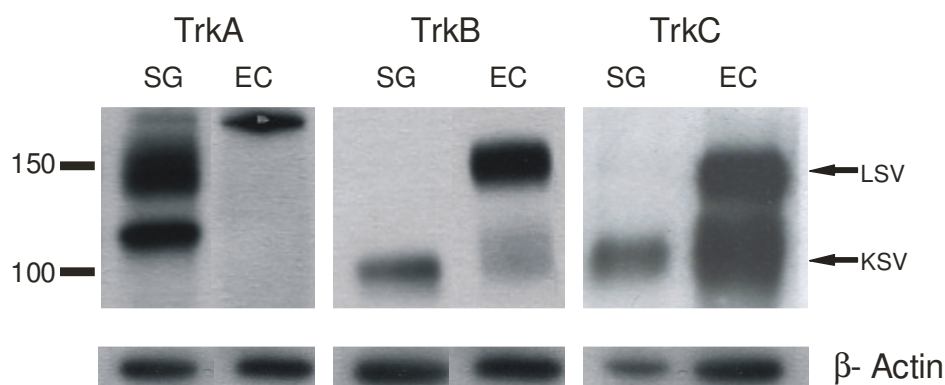


Abb. 21: Trk-Rezeptor-Nachweis in E13 SGs und p2 ECs auf Proteinebene

Gesamtprotein von E13 SGs und p2 ECs wurden über eine 10%ige SDS-PAGE aufgetrennt und die Neurotrophin-Rezeptoren TrkA, TrkB und TrkC im Western-Blot nachgewiesen. Als Ladekontrolle wurde β -Actin dargestellt. (LSV= lange Spleißvariante, KSV= kurze Spleißvariante)

Anhand des Western-Blots konnte in den E13 SGs der TrkA-Rezeptor nachgewiesen werden. Die TrkB- und TrkC-Rezeptoren waren nur in der kurzen Spleißvariante zu detektieren (Abb. 21). In den ECs konnte kein Protein des TrkA-Rezeptors jedoch Proteine des TrkB- und TrkC-Rezeptors nachgewiesen werden. Der TrkC-Rezeptor wurde sowohl in der kurzen als auch in der langen Spleißvariante stark exprimiert wohingegen vom TrkB-Rezeptor die lange Spleißvariante stärker exprimiert wurde als die kurze Variante (Abb. 21).

4.2.1.3. Trk-Rezeptor-mRNA-Expression in dorsalen Spinalganglien und primären kortikalen Einzelzellen

Für die Bestimmung der Trk-Rezeptor-Expressionslevel auf mRNA-Ebene wurde jeweils 1 μg RNA in cDNA umgeschrieben und eine relative, quantitative PCR durchgeführt. Die Expressionslevel der Rezeptoren wurde im Verhältnis zu dem Haushalts-Gen β -Actin analysiert.

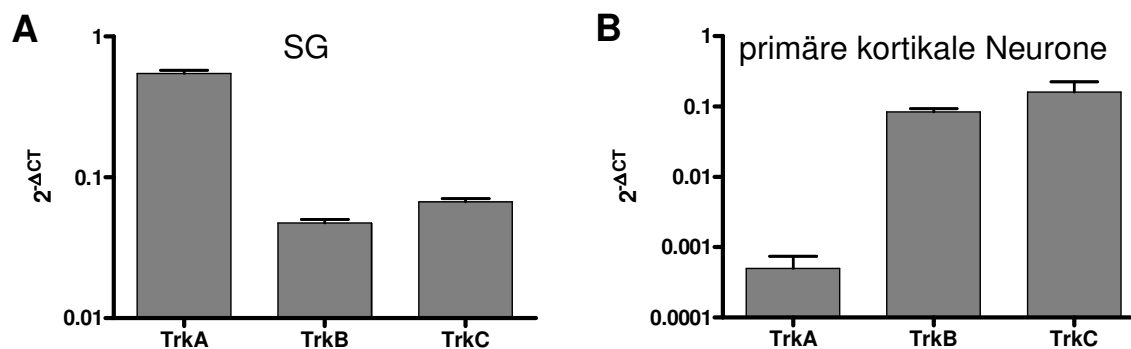


Abb. 22: Nachweis der Trk-Rezeptor-mRNA-Expression in E13 SGs und E15 primären kortikalen Neuronen

Das Expressionslevel der Trk-Rezeptoren in E13 SGs und primären kortikalen Neuronen wurde über die Taqman PCR-Methode untersucht. Die Trk-Rezeptor-Expression wurde im Verhältnis zur β -Actin Expression untersucht und als $2^{-\Delta CT}$ -Werte dargestellt. Der Unterschied einer Log-Stufe entspricht einem 10fachen Unterschied.

In den SGs ist das mRNA-Expressionslevel des TrkA-Rezeptors um ein 10faches höher als das Expressionslevel der TrkB- und TrkC- Rezeptoren (Abb. 22A). In den primären kortikalen Einzelzellen sind die TrkB- und TrkC-Rezeptor mRNAs um ein 100faches stärker exprimiert als die des TrkA-Rezeptors (Abb. 22B).

4.2.2. Einfluss von Zytokinen auf die Trk-Rezeptor-Expression im peripheren und zentralen Nervensystem

Für die mit Zytokinen behandelten SGs wurde die Trk-Rezeptor-Expression auf cDNA-Ebene und für die EC-Explantate im Western-Blot ermittelt.

4.2.2.1. Trk-Rezeptor-cDNA-Expression in dorsalen Spinalganglien

Nachdem die SGs für 1 h mit neurotrophen Faktoren und Zytokinen kultiviert wurden, wurde die RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und eine relative, quantitative Analyse der Trk-Rezeptoren im Taqman durchgeführt. Es wurde der Einfluss von IFN γ allein und in Kombination mit NT3/NT4 oder NT3/NGF (stimulierte im Auswachsassay)

sowie von $\text{TNF}\alpha$ allein und in Kombination mit NT3, NT3/NT4, NT3/NGF oder der dreifach Kombination an neurotrophen Faktoren (hemmte im Auswachsassay) untersucht. Die Expression der Trk-Rezeptoren wurde auf die Expression des Haushalts- Gens β -Actin bezogen.

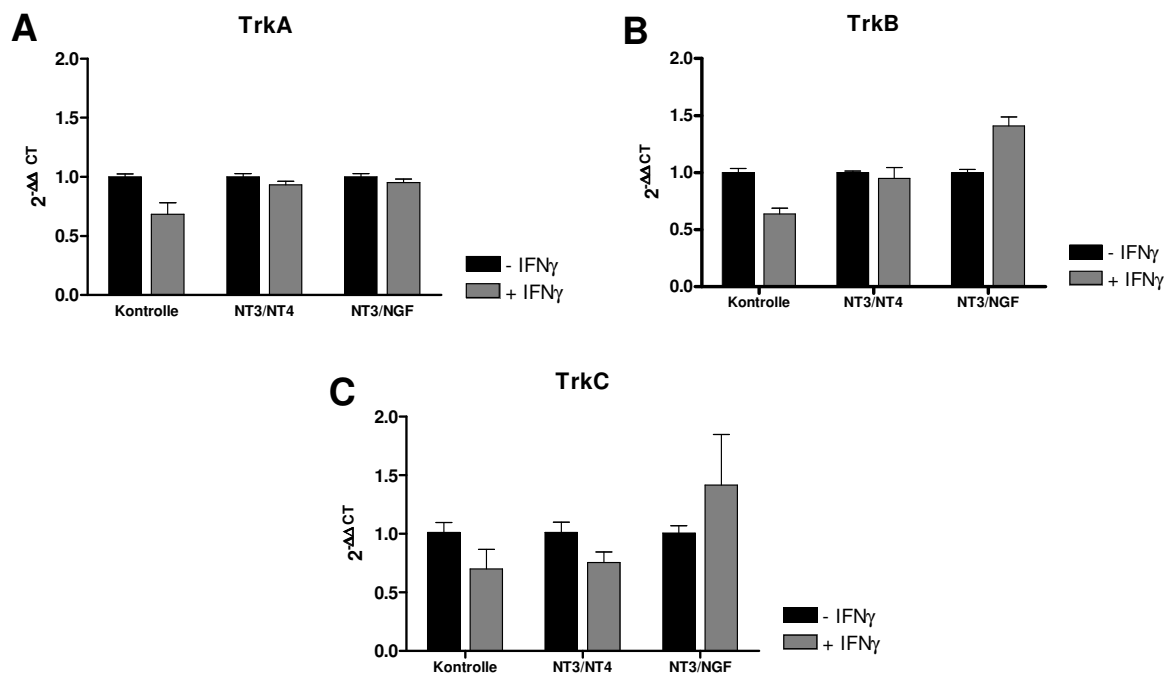


Abb. 23: Die Inkubation von E13 SGs mit IFN γ veränderte nicht die Trk-Rezeptor-Expression.

Das Expressionslevel der Trk-Rezeptoren in E13 SGs nach Kultivierung mit IFN γ wurde über die Taqman PCR-Methode untersucht. Die Expressionslevel des (A) TrkA-Rezeptor, (B) TrkB-Rezeptor und (C) TrkC-Rezeptor sind als $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ Werte \pm sem dargestellt.

Weder der Einfluss von $\text{TNF}\alpha$ (Daten nicht gezeigt) noch von IFN γ zeigten eine Veränderung des cDNA-Levels der Neurotrophin-Rezeptoren TrkA, TrkB und TrkC (Abb. 23A-C).

4.2.2.2. Trk-Rezeptor-Protein-Expression in entorhinalen Kortex-Explantaten

Um den Einfluss der Zytokine auf die Trk-Rezeptor-Expression auf Protein-Ebene zu untersuchen, wurden p2 EC-Explantate für 2 Tage mit zytokinproduzierenden T-Zellen kultiviert (steigert axonales Wachstum im organotypischen Auswachsassay, Hendrix *et al.*, in Revision) und anschließend die Proteinmengen der TrkB- und TrkC-Rezeptoren im Western-Blot bestimmt.

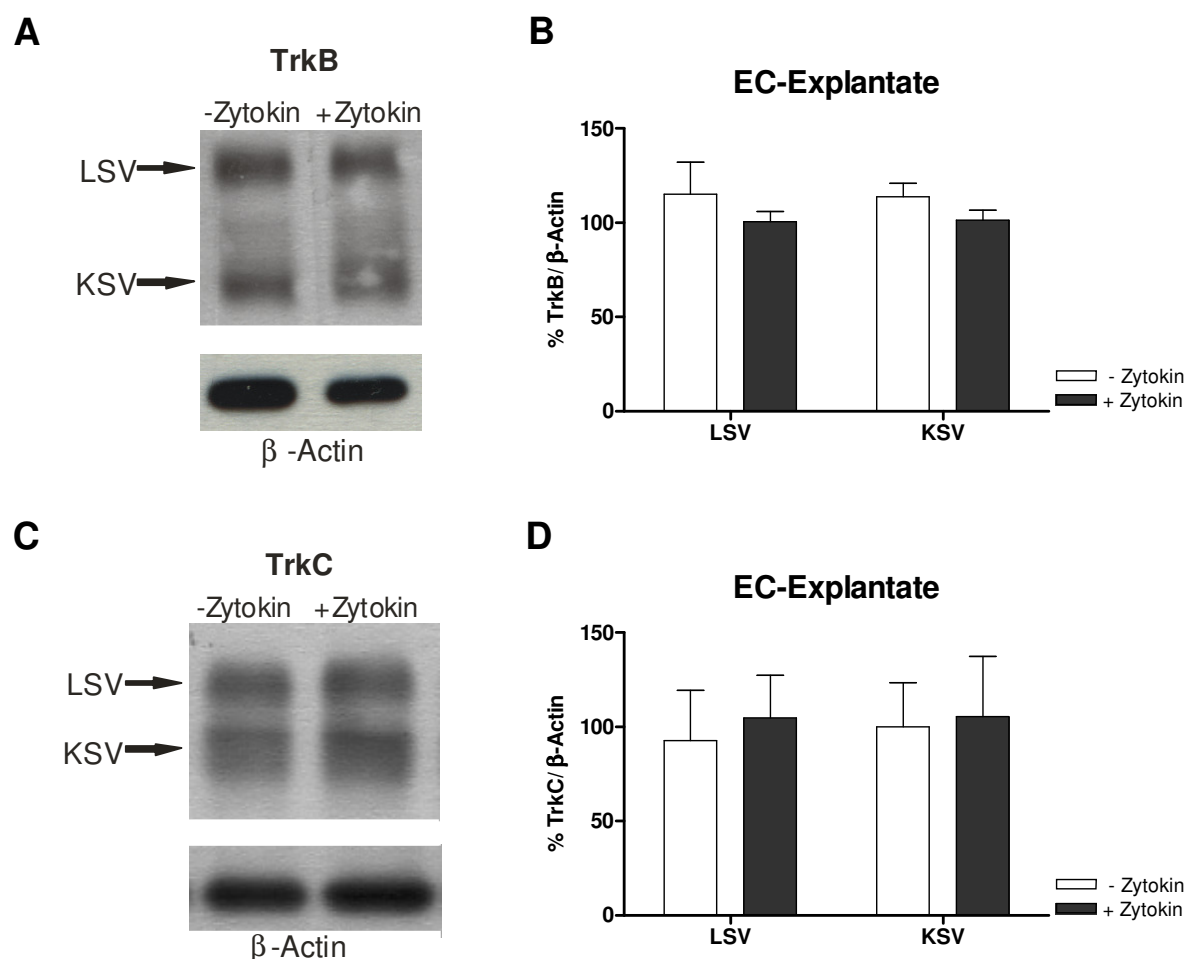


Abb. 24: Die Zytokinbehandlung von p2 EC-Explantaten verändert nicht die Trk-Rezeptor-Expression.

Die EC-Explantate wurden für 48 h mit Zytokin produzierenden Zellen kultiviert und anschließend die Proteinmenge der Trk-Rezeptoren im Western-Blot bestimmt. (A und C) Die Protein-Expressionslevel des TrkB- und TrkC- Rezeptors. (B und D) Die Trk-Rezeptor-Expression ist im Verhältnis zum Haushalts-Gen β -Actin als Mittelwert \pm sem dargestellt. (LSV= lange Spleißvariante, KSV= kurze Spleißvariante)

Weder die lange noch die kurze Spleißvariante der TrkB- und TrkC- Rezeptoren wurde durch die Kultivierung mit Zytokinen in ihrem Expressionlevel beeinflusst (Abb. 24).

4.3. Einfluss von Zytokinen auf die Aktivierung der Trk-Rezeptor-Signalkaskaden im zentralen Nervensystem

Die Zytokine können das neurotrophininduzierte neuronale Auswachsen von peripheren und zentralen Nervenzellen verändern. Anhand der hier untersuchten Modelle konnte gezeigt werden, dass die Zytokine keine Modulation der Neurotrophin-Rezeptor-Expression hervorrufen. Anschließend wurde untersucht, ob die Zytokine die Aktivierung der Signalkaskaden der Trk-Rezeptoren beeinflussen.

Hierzu wurden keine organotypischen Modelle sondern primäre kortikale Einzelzellen verwendet. Anhand der organotypischen Auswachsmodelle lässt sich nicht bestimmen, ob die Zytokine direkt auf die neuronalen Zellen wirken oder auf andere Zellen im Gewebeverband. Deshalb wurden primäre kortikale Neuronenkulturen mit unterschiedlichen Zellzusammensetzungen untersucht.

4.3.1. Analyse der Zelltypen in den primären kortikalen Kulturen

Nach der Vereinzelnung der kortikalen Zellen wurden zwei unterschiedliche Arten von primären Neuronenkulturen angelegt. Zum einen wurde eine gemischte Kultur angelegt, in der das Überleben von verschiedenen Zellpopulationen durch die Zugabe von Serum ermöglicht wurde, und zum anderen wurde eine neuronale Kultur angelegt, in der das Überleben der neuronalen Zellen dadurch begünstigt wurde, dass das Serum im Medium durch das B27-Supplement ersetzt wurde. Um den Anteil der verschiedenen Zellpopulationen nach den unterschiedlichen Kulturbedingungen zu bestimmen, wurden die Zellen nach sechs Tagen Inkubation im FACS analysiert. Die Neurone wurden über den β III-Tubulin-Marker, die Astrozyten über den GFAP-Marker und die Mikroglia über den CD11b-Marker dargestellt.

Anhand der FACS-Analyse zeigten sich deutliche Unterschiede in den Zellpopulationen der neuronalen und gemischten kortikalen Kulturen. Die neuronale Kultur setzte sich aus ca. 82% β III-Tubulin positiven (Abb. 25A), 2% GFAP positiven (Abb. 25C) und 0,1% CD11b positiven Zellen (Abb. 25E) zusammen. In der gemischten Kultur lag der Anteil an β III-Tubulin positiven Zellen bei ca. 70% (Abb. 25B), an GFAP positiven Zellen bei 15% (Abb. 25D) und CD11b positiven Zellen bei 1% (Abb. 25F).

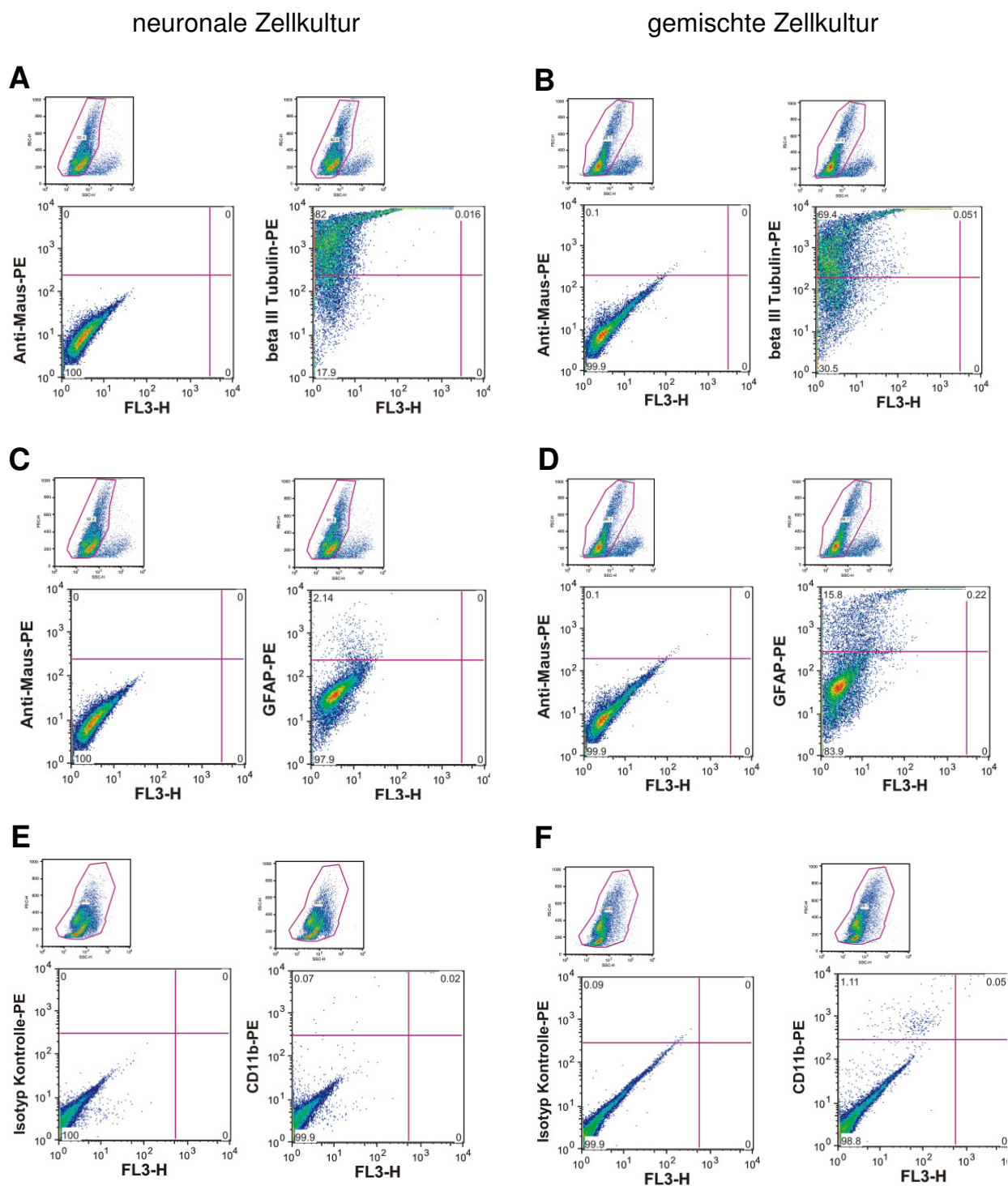


Abb. 25: Unterschiedlicher Anteil von Neuronen, Astrozyten und Mikroglia in der neuronalen und gemischten Zellkultur

FACS-Analyse zur Bestimmung des prozentualen Anteil der verschiedenen Zelltypen in den kortikalen Zellkulturen für (A,B) Neuronen, (C,D) Astrozyten und (E,F) Mikroglia. Dargestellt ist jeweils die gesamte Zellpopulation im FSC gegen den SSC (kleines Quadrat) und die Fluoreszenz 2 (PE) gegen die Fluoreszenz 3 (großes Quadrat). Die Sekundärantikörper- bzw. Isotyp-Kontrolle ist neben der spezifischen Färbung abgebildet.

In der reinen Kultur waren im Verhältnis zu den Neuronen 40x weniger Astrozyten und kaum Mikroglia (0,1%) vorhanden, wohingegen in der gemischten Kultur nur 4x mehr Neurone als Astrozyten und ein geringer Teil an Mikroglia (1%) vorhanden waren.

4.3.2. Einfluss von Zytokinen auf die Aktivierung der Trk-Signalkaskaden in den primären kortikalen Zellkulturen

Durch die Bindung von neurotrophen Faktoren an die Trk-Rezeptoren können unterschiedliche Signalkaskaden aktiviert werden. Um eine mögliche Interaktion der Zytokine auf der Signalebene der Trk-Rezeptoren zu bestimmen, wurde die Aktivierung von jeweils einem ausgewählten Marker-Protein aus den drei beschriebenen Kaskaden analysiert. Die Einzelzellen wurden nach sechs Tagen in Kultur für zwei Stunden mit einem der Zytokine präinkubiert, die Trk-Signalkaskaden durch NT3 stimuliert und anschließend die Proteine isoliert. Für den Western Blot wurden 10 µg Gesamtprotein in einer 10%igen SDS-PAGE aufgetrennt und mit den Antikörpern gegen die Proteine PLCγ1, Akt und MAPKp42/44 inkubiert. Für die Auswertung wurde der prozentuale Anteil an phosphoryliertem Protein zum gesamten Protein bestimmt und die Aktivierung durch NT3 gleich 100% gesetzt.

Weder NT3 noch eines der Zytokine IL-1β, IL-4, IL-6, IFNγ oder TNFα veränderte die totale Menge der drei untersuchten Marker-Proteine (Daten nicht gezeigt). Durch die Präinkubation mit den Zytokinen allein wurde der Aktivierungszustand der Proteine im Vergleich zur Kontrolle nicht verändert. Durch die fünfminütige Zugabe von NT3 zu den Einzelzellen konnte die Aktivierung von PLCγ1, Akt und MAPKp42/44 drastisch erhöht werden.

4.3.2.1. Einfluss von Zytokinen auf die Trk-Signalkaskaden in der gemischten primären kortikalen Zellkultur

Die gemischten primären kortikalen Zellen wurden nach sechs Tage in Kultur für 2 h mit den Zytokinen IL-4 bzw. IFN γ (10 ng/ml) präinkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 5 min mit NT3 (10 ng/ml) stimuliert.

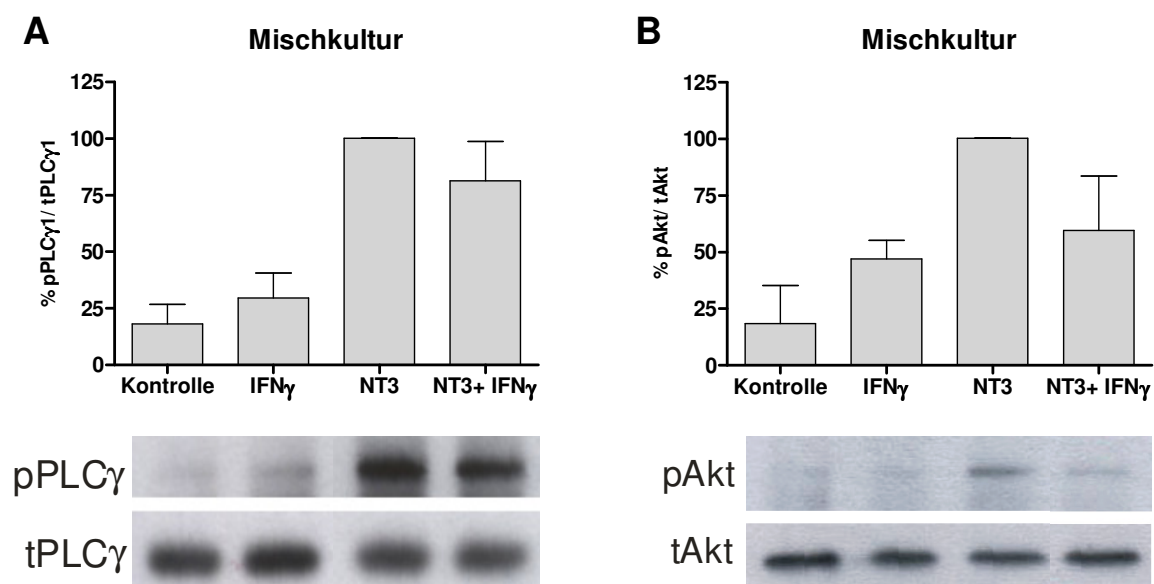


Abb. 26: Einfluss von IFN γ auf die Trk-Signalkaskaden in gemischten primären kortikalen Kulturen.

Die gemischten kortikalen Kulturen wurden mit IFN γ (10 ng/ml) präinkubiert und anschließend mit NT3 (10 ng/ml) stimuliert. In den Graphiken sind die prozentualen Anteile an phosphoryliertem Protein vom gesamten Protein, welche auf NT3= 100% normalisiert wurden, als Mittelwert \pm sem dargestellt. (A) Aktivierung von PLC γ 1 und (B) Aktivierung von Akt.

IFN γ zeigte keinen signifikanten Einfluss auf die NT3-abhängige Phosphorylierung von PLC γ 1 und Akt in den gemischten kortikalen Kulturen (Abb. 26). Die tendenzielle Reduktionen sind auf Grund der hohen Standardabweichungen nicht signifikant.

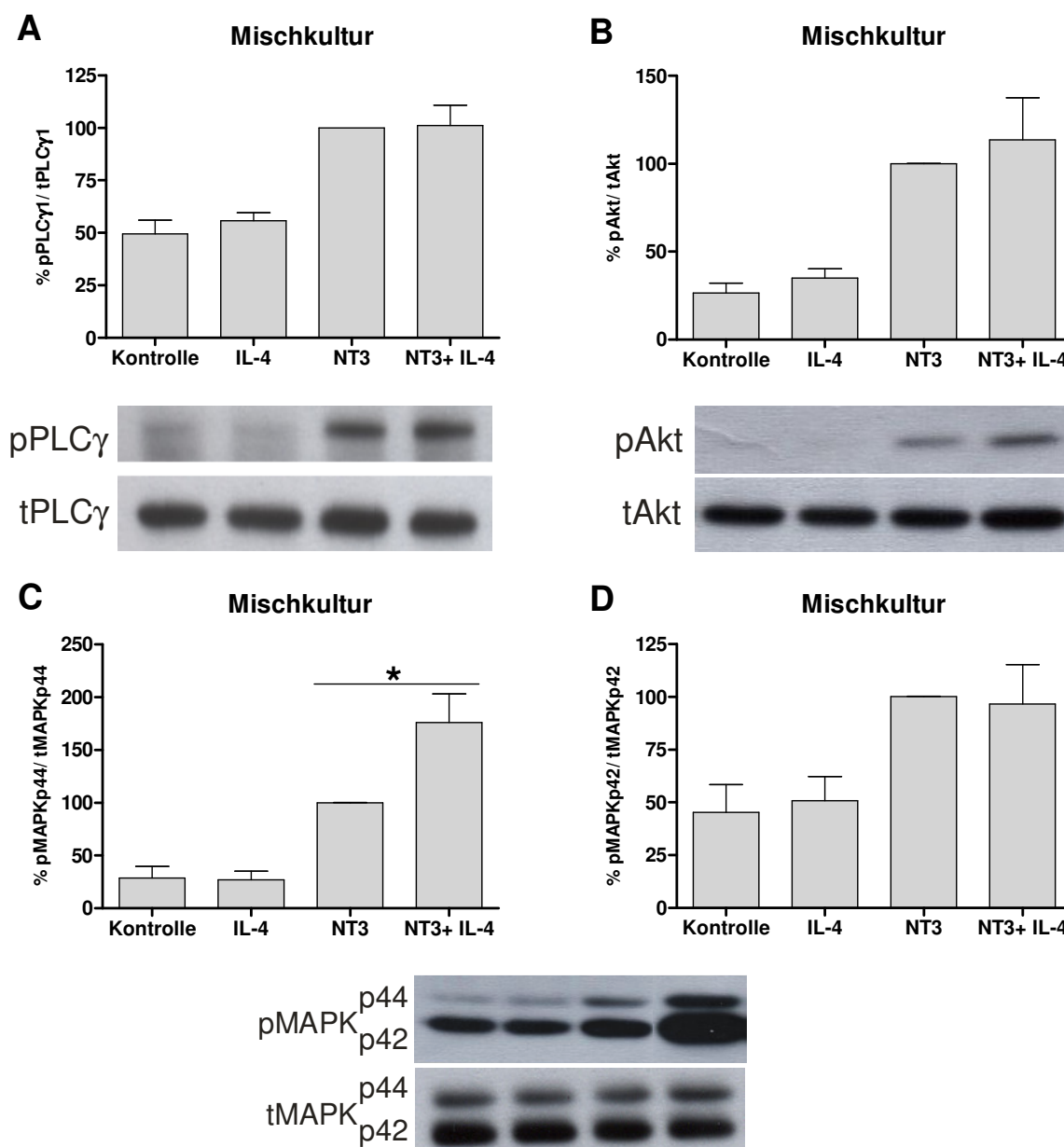


Abb. 27: Einfluss von IL-4 auf die Trk-Signalkaskaden in gemischten primären kortikalen Kulturen.

Die gemischten kortikalen Kulturen wurden mit IL-4 (10 ng/ml) präinkubiert und anschließend mit NT3 (10 ng/ml) stimuliert. In den Graphiken sind die prozentualen Anteile an phosphoryliertem Protein vom gesamten Protein, welche auf NT3= 100% normalisiert wurden, als Mittelwert \pm sem dargestellt.

(A) Aktivierung von PLC γ , (B) Aktivierung von Akt, (C) Aktivierung von MAPKp44, (D) Aktivierung von MAPKp42; (*) = $p < 0,05$

Die NT3-induzierte Aktivierung von PLC γ 1, Akt und MAPKp42 bleibt durch die Präinkubation von IL-4 unverändert. Die NT3-abhängige Phosphorylierung von MAPKp44 wird in den gemischten kortikalen Kulturen signifikant gesteigert (Abb. 27).

4.5.2.3. Einfluss von Zytokinen auf die Trk-Signalkaskaden in der neuronalen primären kortikalen Zellkultur

Die neuronalen kortikalen Zellen wurden nach sechs Tagen in Kultur für 2 h mit den Zytokinen IL-1 β , IL-4, IL-6, TNF α bzw. IFN γ (10 ng/ml) präinkubiert und anschließend für 5 min mit NT3 (10 ng/ml) stimuliert.

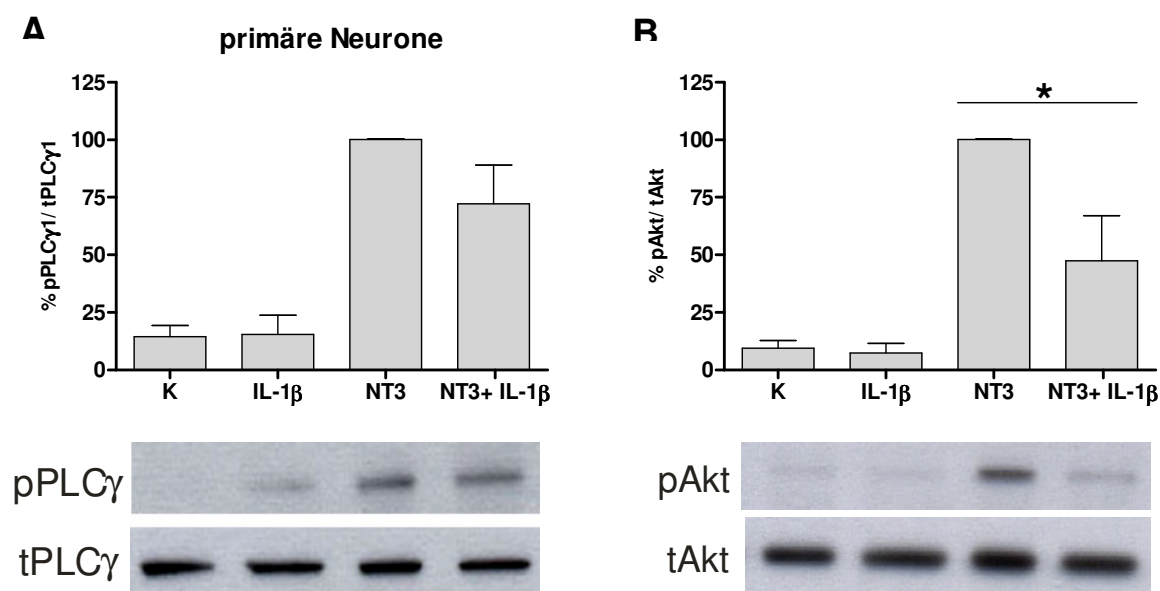


Abb. 28: Einfluss von IL-1 β auf die Trk Signalkaskaden in primären kortikalen Neuronen.

Die kortikalen Neurone wurden mit IL-1 β (10 ng/ml) präinkubiert und anschließend mit NT3 (10 ng/ml) stimuliert. In den Graphiken sind die prozentualen Anteile an phosphoryliertem Protein vom gesamten Protein, welche auf NT3= 100% normalisiert wurden, als Mittelwert \pm sem dargestellt.

(A) Aktivierung von PLC γ , (B) Aktivierung von Akt; (*) = p < 0,05.

Die NT3-induzierte Aktivierung der Phospholipase Cy1 in der neuronalen Zellkultur wurde durch die Präinkubation mit IL-1 β nicht signifikant gehemmt, zeigte jedoch eine Tendenz zur Reduktion. Die NT3-abhängige Phosphorylierung von Akt wurde durch IL-1 β hingegen signifikant reduziert (Abb. 28).

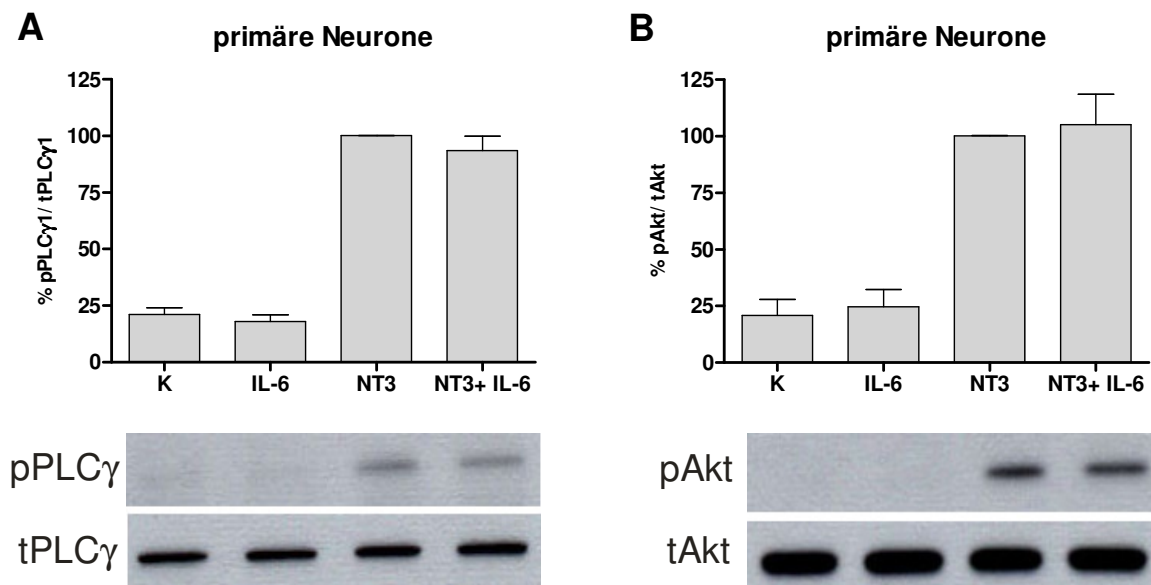


Abb. 29: Einfluss von IL-6 auf die Trk Signalkaskaden in primären kortikalen Neuronen.

Die kortikalen Neurone wurden mit IL-6 (10 ng/ml) präinkubiert und anschließend mit NT3 (10 ng/ml) stimuliert. In den Graphiken sind die prozentualen Anteile an phosphoryliertem Protein vom gesamten Protein, welche auf NT3= 100% normalisiert wurden, als Mittelwert \pm sem dargestellt.

(A) Aktivierung von PLC γ , (B) Aktivierung von Akt.

IL-6 zeigte keinen Einfluss auf die NT3-abhängige Aktivierung von PLC γ 1 und Akt in den primären kortikalen Neuronen (Abb. 29).

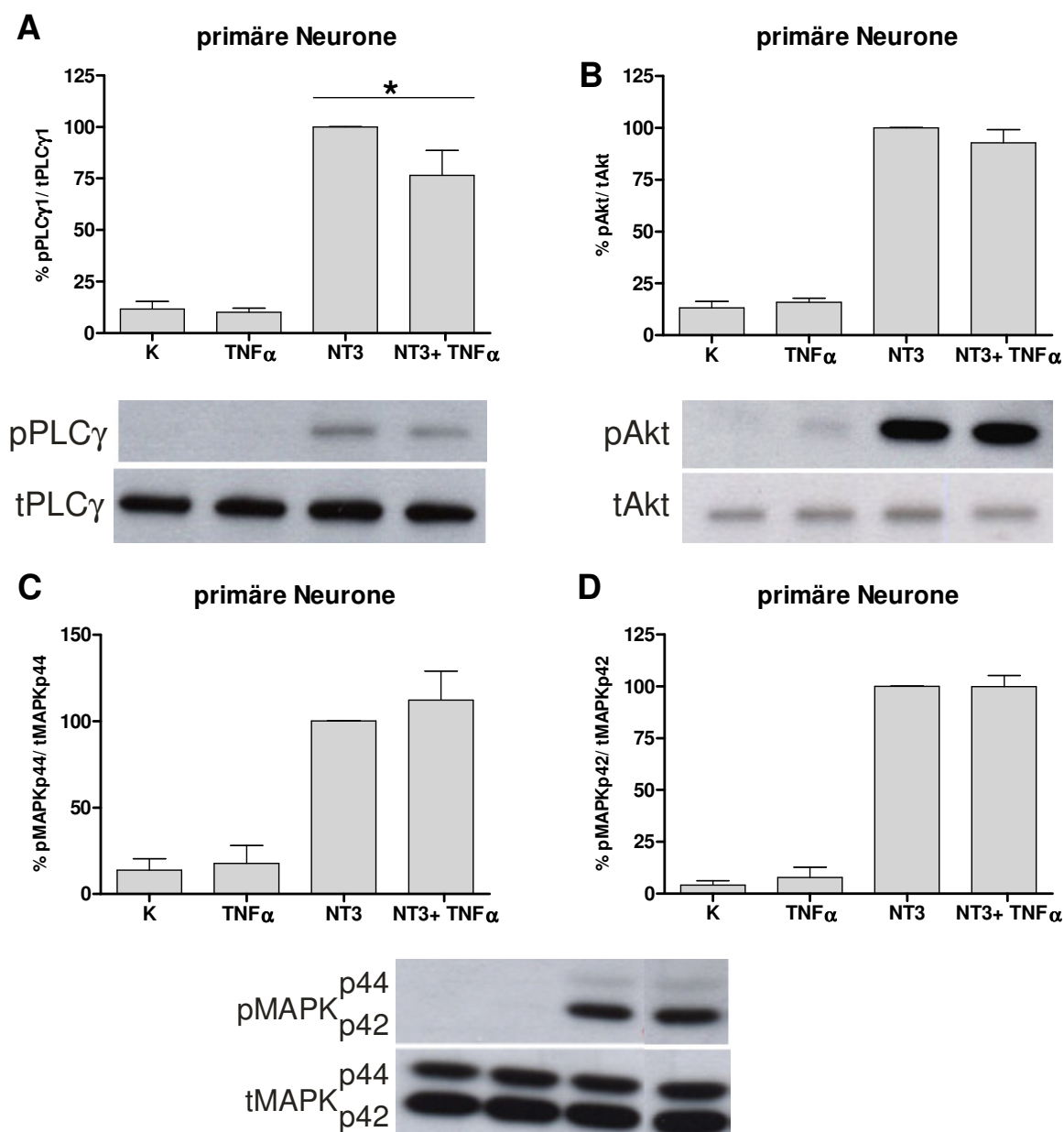


Abb. 30 Einfluss von TNF α auf die Trk Signalkaskaden in primären kortikalen Neuronen.

Die kortikalen Neurone wurden mit TNF α (10 ng/ml) präinkubiert und anschließend mit NT3 (10 ng/ml) stimuliert. In den Graphiken sind die prozentualen Anteile an phosphoryliertem Protein vom gesamten Protein, welche auf NT3= 100% normalisiert wurden, als Mittelwert \pm sem dargestellt.

(A) Aktivierung von PLC γ , (B) Aktivierung von Akt, (C) Aktivierung von MAPKp44, (D) Aktivierung von MAPKp42; (*) = $p < 0,05$.

Die Präinkubation der primären kortikalen Neurone mit TNF α veränderte nicht die NT3-induzierte Aktivierung von Akt oder MAPKp42/44. Die NT3-abhängige Phosphorylierung von PLC γ 1 konnte durch TNF α jedoch signifikant verringert werden (Abb. 30).

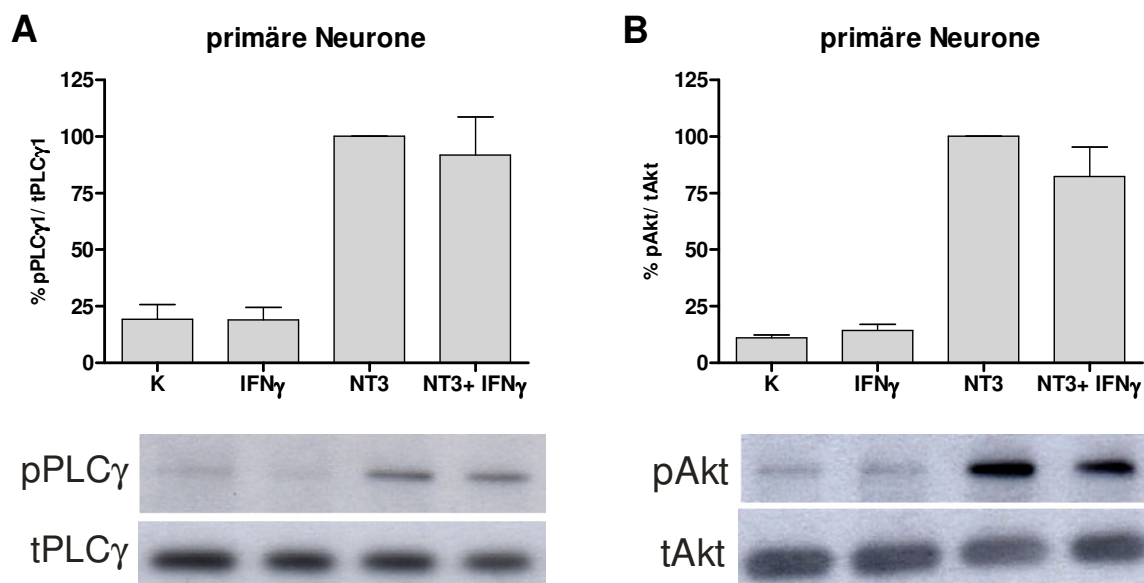


Abb. 31: Einfluss von IFN γ auf die Trk Signalkaskaden in primären kortikalen Neuronen.

Die kortikalen Neurone wurden mit IFN γ (10 ng/ml) präinkubiert und anschließend mit NT3 (10 ng/ml) stimuliert. In den Graphiken sind die prozentualen Anteile an phosphoryliertem Protein vom gesamten Protein, welche auf NT3= 100% normalisiert wurden, als Mittelwert \pm sem dargestellt.

(A) Aktivierung von PLC γ , (B) Aktivierung von Akt; (*) = $p < 0,05$.

Wie in der primären kortikalen Mischkultur zeigte IFN γ auch in der primären kortikalen Neuronenkultur keinen signifikanten Einfluss auf die Aktivierung von PLC γ und Akt nach der NT3-Stimulation (Abb. 31).

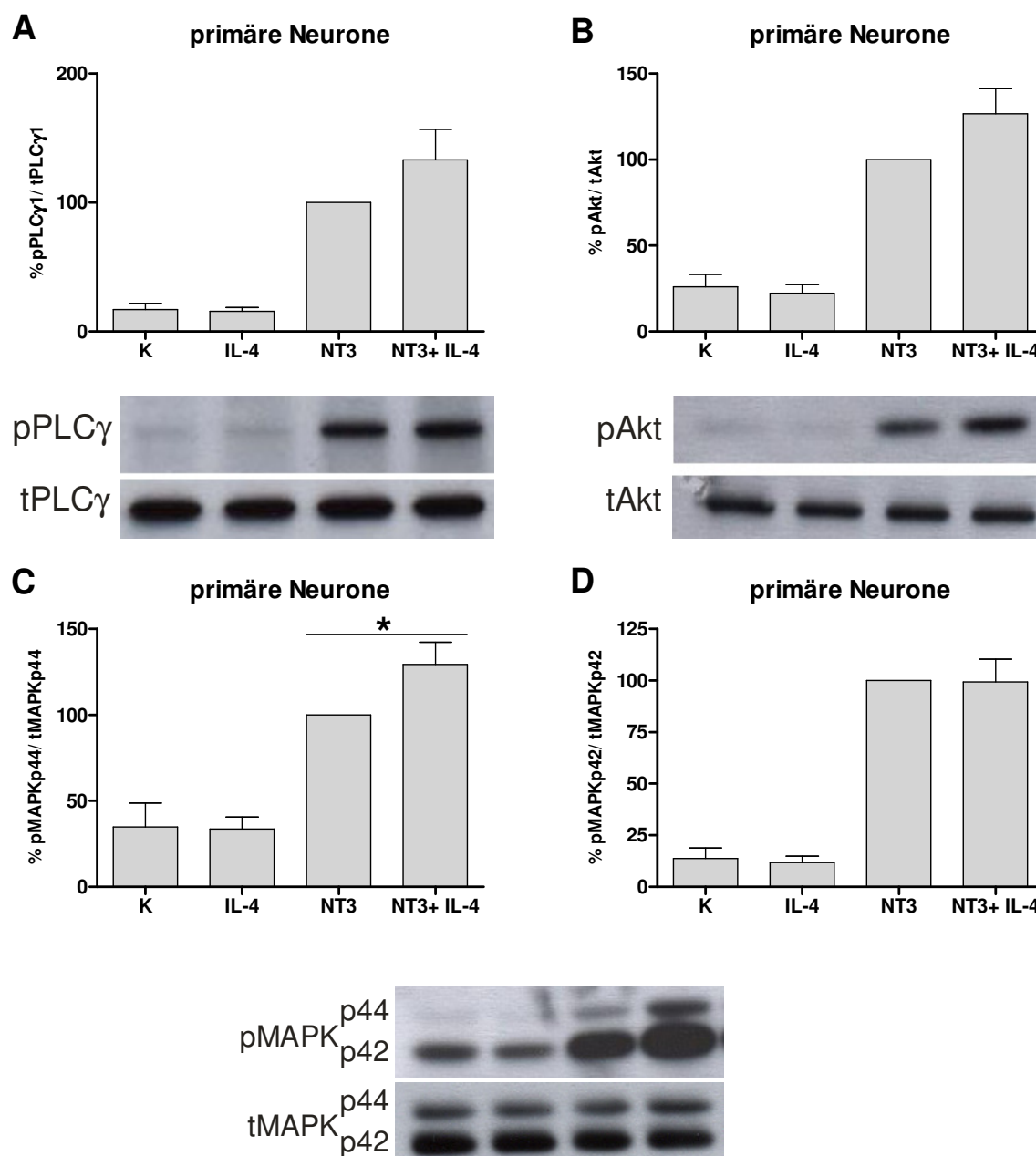


Abb. 32: Einfluss von IL-4 auf die Trk Signalkaskaden in primären kortikalen Neuronen.

Die kortikalen Neurone wurden mit IL-4 (10 ng/ml) präinkubiert und anschließend mit NT3 (10 ng/ml) stimuliert. In den Graphiken sind die prozentualen Anteile an phosphoryliertem Protein vom gesamten Protein, welche auf NT3= 100% normalisiert wurden, als Mittelwert \pm sem dargestellt.

(A) Aktivierung von PLC γ , (B) Aktivierung von Akt, (C) Aktivierung von MAPKp44, (D) Aktivierung von MAPKp42; (*) = $p < 0,05$.

Durch IL-4 konnte eine verstärkte NT3- abhängige Phosphorylierung von PLC γ 1 und Akt in der reinen primären kortikalen Neuronenkultur gezeigt werden, die aufgrund des hohen Standardfehlers jedoch nicht signifikant ist. Die NT3-induzierte Aktivierung

von MAPKp44 konnte durch IL-4 signifikant gesteigert werden, wohingegen die Aktivierung von MAPKp42 unbeeinflusst blieb (Abb. 32).

Insgesamt zeigt sich also, dass die NT3-induzierte Aktivierung der Trk-Signalkaskaden in primären kortikalen Einzelzellen durch die Präinkubation mit Zytokinen verändert werden konnte. Durch die Zugabe von $\text{TNF}\alpha$ wurde die Aktivierung von $\text{PLC}\gamma$ reduziert, $\text{IL-1}\beta$ führte zur verminderten Aktivierung von Akt und IL-4 verstärkte die Aktivierung der MAPK Kinase.

5. Diskussion

Zur Regeneration von verletztem neuronalem Gewebe ist sowohl das Überleben der verletzten Zellen als auch die Wiederherstellung ihrer ursprünglichen Morphologie und deren Verknüpfungen notwendig. Ein wichtiger Bestandteil der medizinischen Forschung befasst sich mit der Frage, warum Regenerationsprozesse im ZNS nur sehr geringfügig und im PNS meist nur unvollständig erfolgen, sowie man diese beeinflussen kann. Da in Folge einer Verletzung eine Immunreaktion ausgelöst wird, stellt sich die Frage, ob diese die regenerativen Prozesse im Nervensystem beeinflusst. Auf Grund dessen wurde in dieser Arbeit eine vergleichende Studie zum Einfluss verschiedener Zytokine auf das axonale Auswachsen von organotypischen Explantaten aus dem PNS und ZNS erstellt, wobei im besonderen eine mögliche Interaktion zwischen ausgewählten neurotrophen Faktoren und Zytokinen untersucht wurde.

5.1. Neuronale Auswachsassays des peripheren und zentralen Nervensystems

Um den Einfluss der Zytokine auf die Regeneration von verletzten Neuronen zu untersuchen, wurden organotypische Explantate dorsaler Spinalganglien als Auswachsmodell für das PNS und entorhinaler Kortex für das ZNS herangezogen. Die Präparation dieser organotypischen Explantate führte zu einer mechanischen Verletzung des Gewebes. Das Wiederauswachsen der neuronalen Fortsätze wurde unter dem Einfluss der rekombinanten Zytokine IL-1 β , IL-4, IL-6, IFN γ und TNF α untersucht. Diese Zytokine sind von besonderem Interesse, da IL-1 β , IL-6 und TNF α zu Beginn einer Entzündungsreaktion von den aktivierten Makrophagen und Endothelzellen sezerniert werden können, während die Zytokine IL-4 und IFN γ hauptsächlich von den später einströmenden Lymphozyten sezerniert werden können.

5.1.1. Neuronaler Auswachsassay des PNS

Um der Frage nach dem Einfluss der Zytokine auf das axonale Wiederauswachsen nachzugehen, wurde zuerst das neuronale Auswachsmodell der Spinalganglien genauer charakterisiert. Es ist beschrieben, dass die Neurotrophine (NT) nicht nur das Überleben, sondern auch das Auswachsen von Nervenzellen stimulieren können (Lentz et al. 1999, Markus et al. 2002, Reichardt et al. 2006). Die NT werden sowohl

von den Neuronen selbst als auch von nicht-neuronalen Zellen produziert. In embryonalen SG-Kulturen zeigte sich ohne die Zugabe von exogenen NT nur ein minimales Neuritenwachstum, welches durch die Inkubation mit K252a, einem Inhibitor der Trk-Rezeptoren, eliminiert werden konnte. Dies deutet darauf hin, dass die SG in diesem Modell selber nur sehr geringe Mengen an NT produzieren, jedoch konnte durch die Applikation von exogenen NT das Neuritenwachstum der SG deutlich stimuliert werden. In der Literatur wurde das Auswuchsverhalten von SG-Neuriten oftmals an Einzelzellen untersucht. Genc et al. (2005) konnten allerdings zeigen, dass bei kultivierten Einzelzellen der Trigeminalganglien (TG) das Trk-Rezeptor-Expressionmuster im Vergleich zu organotypischen Explantaten und der *in vivo* Situation verändert war. In den Einzelzell-Kulturen exprimieren die meisten Zellen alle drei Trk-Rezeptoren parallel, wohingegen in organotypischen Kulturen und *in vivo* meist nur einer der drei Trk-Rezeptoren auf einer Zelle exprimiert wird (Genc et al. (2005)). Es stellt sich daher die Frage, ob das neurotrophininduzierte neuronale Auswachsen in den organotypischen Explantaten vergleichbar mit dem der Einzelzellkulturen ist. In Einzelzellkulturen, die mit Fibroblasten zusammen kultiviert wurden, konnte sowohl für NT3, NT4 als auch für NGF eine wachstumsfördernde Funktion festgestellt werden (Jerregard et al. 2000). BDNF zeigte hingegen nur einen sehr geringen Einfluss auf das neuronale Wachstum (Jerregard et al. 2000). Sowohl in embryonalen SG- als auch in TG-Neuronen induziert NGF verstärkt die Elongation und NT3 die Verzweigung der neuronalen Fortsätze (Lentz et al. 1999, Ulupinar et al. 2000). Dies korreliert gut mit dem NT-induzierten Auswuchsmuster aus den hier untersuchten organotypischen SG-Kulturen. NT3 und NT4 konnten das Auswachsen der Neuriten im Vergleich zur Kontrolle steigern, jedoch geringer als das durch NGF-induzierte Wachstum. Eine Potenzierung des Längenwachstums durch die Kombination der NT konnte weder in den Einzelzell-Kulturen noch in den organotypischen Explantaten gezeigt werden (Lentz et al. 1999, Ulupinar et al. 2000, Genc et al. 2005). Die NT3-induzierte Neuritendichte war im Vergleich zu den mit NT4-behandelten Explantaten erhöht, jedoch geringer als in den NGF-behandelten Explantaten. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass ca. 80% der Zellen den TrkA-Rezeptor und nur 20% der Zellen den TrkB- bzw. TrkC-Rezeptor exprimieren. Durch die Kombination von NGF und NT3 wurde die höchste Neuritendichte in den Explantaten induziert. In Einzelzell-Kulturen führte die Kombination von NGF mit NT3 nicht zu einer noch stärkeren Stimulation der

Neuritenlänge bzw. -dichte, sondern zu einer Kombination dieser Effekte (Lentz et al. 1999, Ulupinar 2000, Genc 2005). Ob in dem hier untersuchten Modell die erhöhte Neuritendichte durch die Kombination von NGF mit NT3 durch den synergistischen Effekt, der bei Einzelzellen festgestellt wurde oder durch eine erhöhte Anzahl an auswachsenden Neuronen bedingt war, lässt sich nicht feststellen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sowohl in dem organotypischen neuronalen AuswachsmodeLL als auch in neuronalen Einzelzell-Kulturen die neurotrophen Faktoren NGF, NT3 und NT4 ein spezifisches Auswachsmuster der Neuriten hervorrufen. Das NT-induzierte Wachstum unterscheidet sich nicht grundlegend in den beiden Modellen. Durch die veränderte Trk-Rezeptor-Expression in den Einzelzellen können in diesen Kulturen jedoch mehr Zellen auf einen Stimulus reagieren und ein verändertes Auswachsmuster durch die Kombination der neurotrophen Faktoren induziert werden, als im organotypischen Modell.

5.1.2. Neuronaler Auswachsassay des ZNS

Die EC-Explantate zeigten auch ohne Zugabe von exogenen neurotrophen Faktoren axonales Wachstum, das auf die endogene Produktion dieser Faktoren in den organotypischen Kulturen zurückzuführen ist (NT3 [90 pg/ml], NT4 [40 pg/ml] und NGF [65 pg/ml]; Hendrix et al., in Revision). Dieses Wachstum konnte durch die Kultivierung der EC-Explantate mit K252a deutlich reduziert werden (Hendrix et al. in Revision), was darauf schließen lässt, dass auch das Wachstum der axonalen Fortsätze im ZNS neurotrophinabhängig ist.

5.2. Einfluss von Zytokinen auf das neuronale Wachstum

Da die Regeneration von verletzten Nervenfasern meist von einer Immunreaktion begleitet wird, sollte der Einfluss von verschiedenen Zytokinen, die bei einer Immunantwort auftreten, auf das axonale Wachstum untersucht werden. Da sich sowohl die Regenerationsfähigkeit als auch die Immunreaktion im PNS von der im ZNS unterscheidet, wurde der Einfluss der Zytokine in unterschiedlichen Modellen untersucht, die jeweils das ZNS und PNS repräsentieren.

5.2.1. Effekt von IL-1 β auf das neuronale Wachstum

Interleukin-1 gehört zu den frühen Entzündungsfaktoren. Bereits wenige Stunden nach einer Verletzung des zentralen oder peripheren Nervensystems kommt es an der Verletzungsstelle durch die einströmenden Makrophagen, aktivierte Mikroglia und

Schwann-Zellen zur verstärkten Synthese von IL-1 (Wang et al. 2007, Allen et al. 2005, Rotshenker et al. 1992, Temporin et al. 2008).

Im PNS sind unterschiedliche Effekte von IL-1 β auf das Auswachsen verletzter Neurone beschrieben. So inhibierte IL-1 β *in vitro* das axonale Auswachsen von organotypischen SG-Kulturen aus neugeborenen Ratten (Larsson et al. 2005), stimulierte es aber in adulten murinen Spinalganglien (Horie et al. 1997), wohingegen es keinen Einfluss auf das Neuritenwachstum von neuronalen Zellen aus dem p7 und adultem Stadium, wenn sie als Einzelzellen kultiviert wurden, zeigte (Horie et al. 1997, Temporin et al. 2008). Eine Wachstumsreduktion, die durch MAG induziert wurde, konnte in den adulten Einzelzell-Kulturen durch IL-1 β jedoch wieder kompensiert werden (Temporin et al. 2008). Bei einer Ko-Kultivierung von neonatalen SG-Neuronen auf Fibroblasten konnte das Neuritenwachstum durch IL-1 β wiederum gesteigert werden (Edoff et al. 2002). *In vivo* führte die kontinuierliche Gabe von IL-1 β nach einer Ischiasläsion zu einer stärkeren funktionellen Regeneration der sensorischen Fasern (Temporin et al. 2008a), aber in den hier untersuchten embryonalen SG-Kulturen konnte weder durch eine geringe noch durch eine hohe Konzentration von IL-1 β ein Einfluss auf das Auswachsen der Neuriten gezeigt werden. Die Konzentration des IL-1 β scheint nicht der essentielle Faktor für die Auswirkung auf das neuronale Wachstum zu sein. So zeigte eine hohe Konzentration IL-1 β eine Reduktion (Larsson et al. 2005), eine Stimulation (Temporin et al. 2008) bzw. keine Modulation des Neuritenwachstums. Auch bei geringen Konzentrationen konnte sowohl eine Steigerung (Horie et al. 1997, Temporin et al. 2008, Edoff et al. 2002) oder aber keine Modulation des neuronalen Wachstums beobachtet werden. Vielmehr scheint das Entwicklungsstadium und die Anwesenheit von nicht-neuronalen Zellen für die unterschiedlichen Effekte von IL-1 β verantwortlich zu sein. So steigerte IL-1 β das Auswachsen von adulten, hemmte es jedoch in neonatalen und zeigte keinen Einfluss in embryonalen SG-Neuronen. Da die Wachstumsstimulation durch IL-1 β in neuronalen Einzelzell-Kulturen ausblieb, scheint der Effekt über die nicht-neuronalen Zellen vermittelt zu werden. Dafür spricht, dass IL-1 β z.B. die Produktion von NGF in den nicht-neuronalen Zellen wie Mikroglia, Astrozyten, Fibroblasten, enterischen Gliazellen, sowie den nicht-neuronalen Zellen des Ischiasnervs und der Haut induzieren kann (Heese et al. 1998, Jauneau et al. 2006, Edoff et al. 2002, von Boyen et al. 2006, Lindholm et al. 1987, Bläsing et al. 2005). Andererseits kann IL-1 β aber auch direkt auf die

neuronalen Zellen wirken. So wird z.B. der IL-1-Rezeptor auf den Neuronen der Spinalganglien exprimiert, über den die Aufhebung der MAG-induzierten Wachstumsinhibition reguliert werden kann (Temporin et al. 2008).

Die meisten Untersuchungen zur Wirkung von Interleukin-1 auf neuronale Zellen des ZNS analysierten den Einfluss von IL-1 β auf das Überleben der Neurone nach einer Schädigung. Weder *in vivo* noch *in vitro* konnte die alleinige Gabe von IL-1 β eine Reaktion in unverletzten Neuronen hervorrufen (Allen et al. 2005, Pringle et al. 2001). In geringen Konzentrationen zeigte IL-1 β eine Verstärkung von neurotoxischen Effekten (Tong et al. 2008, Soiampornkul et al. 2008, Viviani et al. 2003), wohingegen hohe Konzentrationen einen induzierten Zelltod meist verringern konnten (Pringle et al. 2001, Strijbos et al. 1995). Temporin et al. (2008) konnten zeigen, dass IL-1 β allein das Wachstum von zerebellären Neuronenkulturen nicht beeinflusste, aber die Wachstumsinhibition, die durch MAG induziert wurde, wieder eliminieren konnte. Die hier untersuchten EC-Explantate zeigten nur dann ein verstärktes Auswachsen, wenn sie mit einer hohen Konzentration IL-1 β kultiviert wurden, wohingegen bei einer geringen Konzentration IL-1 β keine Veränderung des Wachstums beobachtet werden konnte. Demnach hat IL-1 β in geringen Konzentrationen weder in zerebellären Einzelzellen noch in organotypischen entorhinalen Kortex-Explantaten einen Einfluss auf das Wiederauswachsen von Neuriten. Da IL-1 β im Laufe der Entwicklung im ZNS exprimiert wird, könnte diese Konzentration mehr den physiologischen Bedingungen entsprechen. Bei einer hohen Konzentration, die eventuell eher einer Entzündungsreaktion gleich kommt, konnte das Auswachsen der Neuriten im organotypischen Modell jedoch gesteigert werden, sowie die MAG-abhängige Wachstumsinhibition wieder aufgehoben werden konnte. Dies spricht dafür, dass IL-1 β an den Auswachsprozessen nach einer Verletzung beteiligt sein könnte.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass IL-1 β sowohl im PNS als auch im ZNS das Wachstum von Neuriten stimulieren kann, und dieser Effekt vermutlich über die Stimulation von nicht-neuronalen Zellen induziert wird. Während der Effekt im PNS stärker von dem Entwicklungsstadium abhängig ist, so ist er im ZNS deutlich von der IL-1 β -Konzentration abhängig.

5.2.2. Effekt von IL-6 auf das neuronale Wachstum

IL-6 ist ein wichtiger Faktor bei der Aktivierung der Akute-Phase-Reaktion und trägt somit zur Induktion der unspezifischen Immunantwort bei (Walport et al. 2008). Nach einer Verletzung des peripheren Nervensystems kommt es zur Hochregulation der IL-6-Expression in den SG (Thier et al. 1999, Osamura et al. 2005) und Schwann-Zellen (Hirota et al. 1996, Thier et al. 1999). Die IL-6-Expression steigt auch nach einer Verletzung oder Infektion im ZNS an und ist sowohl in den Neuronen als auch in den Gliazellen nachweisbar (Munoz-Fernandez 1998).

In den embryonalen organotypischen SG-Kulturen konnte das NT3/NT4-induzierte Neuritenwachstum durch IL-6 gesteigert werden, wohingegen das Wachstum der Kontrolle durch IL-6 gehemmt wurde. Andere *in vitro* Untersuchungen zum Einfluss von IL-6 auf das Wiederauswachsen von Spinalganglienneuronen wurden nicht in organotypischen Modellen sondern an Einzelzell-Kulturen durchgeführt. Cafferty et al. (2004) konnten zeigen, dass IL-6 allein keinen Einfluss auf das neuronale Auswachsen von adulten SG-Neuronen hat, aber das NGF- bzw. NT3-induzierte Wachstum verstärken konnte. In Fibroblasten/SG Ko-Kulturen konnte durch IL-6 eine Stimulation des Neuritenwachstum induziert werden, welche durch einen blockierenden Antikörper gegen NGF wieder aufgehoben wurde (Edoff et al. 2002). Auch das Neuritenwachstum von PC12-Zellen konnte nicht durch IL-6 alleine, sondern nur durch die Kombination mit NGF gesteigert werden (Wu et al. 1996). Desweiteren konnte die Wachstumsinhibition der SG-Neuriten durch MAG oder Myelin mittels Zugabe von IL-6 aufgehoben werden (Cao et al. 2006). Durch die Applikation von IL-6 in Spinalganglien konnte *in vivo* die Regeneration der verletzten zentralen Axone gesteigert werden (Cao et al. 2006). In IL-6-defizienten Mäusen wurden unterschiedliche Beobachtungen gemacht. So beschreiben Zhong et al. (1999), dass in IL-6-defizienten Mäusen nach einer Ischiasläsion eine verzögerte Regeneration der sensiblen Fasern auftrat, wohingegen die motorischen Fasern keine verlangsamte Regeneration zeigten. Diese Ergebnisse konnten von Cao et al. (2006) allerdings nicht bestätigt werden. Sowohl *in vivo* als auch *in vitro* Experimente zeigten einen wachstumsstimulierenden Effekt von IL-6 auf die Neurone der Spinalganglien. In den *in vitro* Experimenten zeigte sich, dass IL-6 alleine keinen Einfluss auf das Auswachsen in PC12-Zellen, in SG-Einzelzellen und organotypischen SG-Explantaten hatte, das neurotrophininduzierte Wachstum jedoch gesteigert werden konnte. In den organotypischen embryonalen Explantaten

stimulierte es das NT3/NT4-abhängige Wachstum und in adulten und neonatalen Einzelzell-Kulturen das NGF- und NT3-induzierte Wachstum. Somit lässt sich festhalten, dass IL-6 in verschiedenen Kulturmodellen unterschiedliches neurotrophinabhängiges Wiederauswachsen der Neuriten stimulieren kann. Da diese Stimulation auch in Einzelzell-Kulturen zu beobachten ist, lässt sich vermuten, dass IL-6 direkt auf die Neurone wirken kann.

Durch IL-6 konnte sowohl die Neuritendichte von den hier untersuchten EC-Explantaten als auch das Neuritenwachstum von hippokampalen organotypischen Kulturen gesteigert werden (Hakkoum *et al.* 2007). Weiterhin reduzierte IL-6 die Wachstumsinhibition von hippokampalen Neuronen, die durch MAG und Myelin induziert wurde (Cao *et al.* 2006). Das Überleben von Neuroblastomzellen wurde zwar durch IL-6 reduziert, gleichzeitig stimulierte es aber die Differenzierung in neuritenbildende Zellen (Munoz-Fernandez *et al.* 1994). In IL-6 defizienten Mäusen wurde eine verminderte axonale Regeneration nach einer Axotomie des *Nervus facialis* beschrieben (Galiano *et al.* 2001), wohingegen die transiente Blockade des IL-6-Rezeptors nach einer Rückenmarkverletzung zu einer verminderten Astrogliose und verstärkten funktionellen Regeneration führte (Okada *et al.* 2004). Die Daten zeigen, dass IL-6 einen stimulierenden Einfluss auf die Regeneration von Nervenzellen aus dem ZNS hat, denn es förderte das Auswachsen der durchtrennten Nervenfortsätze, konnte die wachstumsinhibierende Wirkung von Myelin und MAG aufheben und führte zur Differenzierung in neuritentragende Zellen. Ob IL-6 die NGF-Produktion in Astrozyten modulieren kann wird kontrovers diskutiert (Frei *et al.* 1989, Awatsuji *et al.* 1993, März *et al.* 1999).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass IL-6 auf viele verschiedene Neuronentypen wachstumsstimulierend wirken kann, und dass diese Stimulation, zumindest im PNS, neurotrophinabhängig ist. Durch die Wirkung von IL-6 auf nicht-neuronale Zellen kann sowohl ein wachstumsstimulierender als auch ein -reduzierender Effekt ausgelöst werden. Die Stimulation des Neuritenwachstums könnte durch die IL-6-induzierte Produktion von NGF in Fibroblasten und Astrozyten (Edoff *et al.* 2002, Frei *et al.* 1989, März *et al.* 1999) ausgelöst werden, während die durch IL-6 verstärkte Astrogliose für die Wachstumsreduktion verantwortlich sein könnte.

5.2.3. Effekt von $\text{TNF}\alpha$ auf das neuronale Wachstum

Auch $\text{TNF}\alpha$ ist ein entscheidender Faktor in der angeborenen Immunantwort, der zur lokalen Eindämmung von Infektionen beiträgt (Walport et al. 2008). Die Produktion und Sekretion von $\text{TNF}\alpha$ steigt während der Wallerschen Degeneration in den umliegenden Schwann-Zellen an (Shamash et al. 2002), weiterhin kommt es zur Expression des $\text{TNF}\alpha$ -R1 in den Neuronen der Spinalganglien (Ohtori et al. 2004). Verletzungen des zentralen Nervensystems führen innerhalb einer Stunde zur verstärkten $\text{TNF}\alpha$ -Produktion in den Neuronen, Astrozyten, Makrophagen und Mikroglia (Pan et al. 1997).

In den embryonalen organotypischen SG-Kulturen konnte das NT3-, NT3/NGF-, NT4/NGF- und Triple-induzierte Neuritenwachstum durch hohe Konzentrationen $\text{TNF}\alpha$ signifikant und das NGF-induzierte Wachstum tendenziell reduziert werden. In ähnlicher Weise konnten Larsson et al. (2005) zeigen, dass $\text{TNF}\alpha$ das NGF-induzierte Neuritenwachstum in organotypischen SG-Kulturen von neugeborenen Ratten reduzierte. Auch in Einzelzell-Kulturen von SG-Neuronen aus neugeborenen Ratten auf immortalisierten Schwann-Zellen konnte das NGF-induzierte Wachstum durch $\text{TNF}\alpha$ gehemmt werden (Schneider-Schaulies et al. 1991). $\text{TNF}\alpha$ scheint somit das neurotrophin-induzierte Wachstum der SG-Neurone zu reduzieren, wobei es nicht nur das NGF-induzierte sondern auch das NT3-induzierte Wachstum reduzierte. Obwohl auch in der Kombinationen von NGF/NT3, NGF/NT4 und NGF/NT3/NT4 das Wachstum reduziert wurde, war in der Kombination aus NT3/NT4 keine drastische Reduktion sichtbar. Dies könnte eventuell darin begründet sein, dass nur das NT3-induzierte Wachstum nicht aber das NT4-induzierte Wachstum reduziert wurde, und somit das gesamte Wachstum unverändert zu sein schien. Erstaunlicherweise wird durch $\text{TNF}\alpha$ einerseits das NGF-abhängige Neuritenwachstums gehemmt aber andererseits die NGF-mRNA-Produktion in Fibroblasten (Hattori et al. 1993) und Ischiasnervengewebe (Lindholm et al. 1987) induziert. Diese verstärkte Neurotrophin-Produktion könnte das Überleben der verletzten Neuronen begünstigen.

In Einzelzell-Kulturen verminderte $\text{TNF}\alpha$ das Überleben von embryonalen mesencephalen und kortikalen Neuronen (Clarke et al. 2002, McGuire et al. 2001), in dem es zur verstärkten Apoptose führte (Falcao et al. 2007). Ebenso wurde die Überlebensrate von Neuroblastomzellen durch $\text{TNF}\alpha$ reduziert, wobei gleichzeitig die

Differenzierung in neuritenbildenden Zellen induziert wurde (Munoz-Fernandez et al. 1994). Im Gegensatz dazu konnte TNF α den durch NMDA, Glutamat oder Glukosemangel induzierten Zelltod von embryonalen hippokampalen, septalen und kortikalen Neuronen in Einzelzell-Kulturen verringern (Cheng et al. 1994). TNF α beeinflusst demnach das Überleben der Neurone, aber auch das Neuritenwachstum im ZNS konnte durch TNF α beeinflusst werden. Einerseits konnte TNF α in hoher Konzentration die Dichte der aus den EC-Explantaten auswachsenden Neuriten steigern, andererseits reduzierte es die Länge und die Verzweigungen der auswachsenden Neuriten von kortikalen Neuronen (Falcao et al. 2007) und hippokampalen Neuronen, die auf Astrozyten ko-kultiviert wurden, aber nicht die Anzahl an primären Fortsätzen (Neumann et al. 2002). Auch in einem organotypischen Auswachsmodell von embryonalen mesencephalen Gewebekulturen konnten unterschiedliche Effekte von TNF α gezeigt werden, zum einen hemmte TNF α das frühe, gliaunabhängige Wachstum und zum anderen stimulierte es das spätere gliaabhängige Wachstum der Neuriten (Marschinke et al. 2008). TNF α scheint demnach sehr unterschiedliche Effekte auf Neurone auszuüben. Zum einen induziert es Apoptose und vermindert somit das Überleben der Nervenzellen, zum anderen kann es aber einen induzierten Zelltod verringern. Auch der Einfluss von TNF α auf das Wachstum der Nervenfortsätze ist unterschiedlich beschrieben. Es wurde sowohl ein wachstumsreduzierender als auch ein -stimulierender Effekt von TNF α gezeigt. Die reduzierenden Effekte wurden in Einzelzell-Kulturen nach 16 h und 24 h Inkubation beschrieben, und Neumann et al. (2002) konnten zeigen, dass der hemmende Effekt von TNF α durch einen direkten Einfluss von TNF α auf die Neurone vermittelt wurde, da bei TNF α R-defizienten Neuronen keine Wachstumsreduktion durch TNF α gezeigt werden konnte. Im Gegensatz dazu wurden die stimulierenden Effekte von TNF α in organotypischen Kulturen erst nach 48 h bzw. 72 h beschrieben. Daraus lässt sich schließen, dass TNF α primär das Wachstum der Neuriten hemmen kann, dieser Effekt jedoch durch die Stimulation der nicht-neuronalen Zellen wieder aufgehoben werden kann. Diese wachstumsfördernden Effekte könnten durch eine erhöhte Produktion der neurotrophen Faktoren in den nicht-neuronalen Zellen hervorgerufen werden, denn TNF α kann z.B. die Produktion von NGF und BDNF in Astrozyten und Mikroglia induzieren (Kuno et al. 2006, Saha et al. 2006, Brodie et al. 1996, Heese et al. 1998).

Der stimulierende Effekt könnte durch den indirekten Weg über die nicht-neuronalen Zellen verzögert auftreten und daher erst zu einem späteren Zeitpunkt sichtbar werden.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass $\text{TNF}\alpha$ in hoher Konzentration sowohl das Wachstum der PNS- als auch der ZNS-Neurone beeinflussen kann. Im PNS wurden bisher nur wachstumsreduzierende Effekte beschrieben, was mit den in dieser Arbeit beschriebenen Daten korreliert. Auch im ZNS kommt es durch $\text{TNF}\alpha$ zur Reduktion des Neuritenwachstums, welche jedoch durch die Stimulation von nicht-neuronalen Zellen durch $\text{TNF}\alpha$ wieder aufgehoben werden könnte und somit zum verstärkten Auswachsen führt.

5.2.4 Effekt von $\text{IFN}\gamma$ auf das neuronale Wachstum

Das während der spezifischen Immunantwort produzierte $\text{IFN}\gamma$ spielt eine wichtige Rolle bei der Aktivierung der Makrophagen und Eliminierung von intrazellulären Erregern (Walport et al. 2008). Periphere Läsionen führten zur verstärkten $\text{IFN}\gamma$ Expression im Endoneurium (Taskinen et al. 2000) und Neumann et al. (1997) konnten zeigen, dass kultivierte embryonale SG-Neurone $\text{IFN}\gamma$ produzierten, hippocampale Neurone und GFAP-positive Zellen hingegen nicht. Auch der $\text{IFN}\gamma$ -Rezeptor wurde auf allen kultivierten SG-Neuronen nachgewiesen. Weiterhin kommt es auch nach einer Ischämie im Gehirn zur systemischen und lokalen $\text{IFN}\gamma$ mRNA Expression (Li et al. 2001).

In dem hier untersuchten Modell kam es durch hohe Konzentrationen $\text{IFN}\gamma$ zum verstärkten Auswachsen der SG-Neurone und zur Reduktion der Schwann-Zell-Zone. In der Literatur sind unterschiedliche Einflüsse von $\text{IFN}\gamma$ im PNS beschrieben, so erhöht es einerseits die Überlebensrate von kultivierten p0 SG-Neuronen (Turnley et al. 2001), stimuliert die Differenzierung von PC12-Zellen (Improta et al. 1988, Cho et al. 2005) und induziert das Absterben von kultivierten primären Schwann-Zellen (Conti et al. 2002, Nagano et al. 2001). Weiterhin konnten Schneider-Schaulies et al. (1991) zeigen, dass $\text{IFN}\gamma$ das Neuritenwachstum von SG-Einzelzellen, die auf immortalisierten Schwann-Zellen kultiviert wurden, reduzieren konnte. Wurden SG-Explantate aus neugeborenen Ratten in einer Astrozytenmatrix kultiviert, so konnte $\text{IFN}\gamma$ allein eine leichte Steigerung des Neuritenwachstums induzieren, es hemmte aber das IL-1/bFGF-induzierte Auswachsen (Fok-Seang et al. 1998). Eine Kultivierung der Explantate ohne Astrozyten auf Laminin führte durch die

Kombination von IFN γ /IL-1/bFGF jedoch zu einer Stimulation des Neuritenwachstum (Fok-Seang et al. 1998). Es zeigte sich, dass IFN γ das Neuritenwachstum der SG-Neurone nur dann signifikant verändern konnte, wenn es in Kombination mit neurotrophen Faktoren appliziert wurde. Wurden die SG-Neurone auf immortalisierten Schwann-Zellen oder auf Astrozyten kultiviert, so konnte der NT-induzierte Wachstumseffekt durch IFN γ reduziert werden. Hierbei zeigte sich allerdings, dass die durch IFN γ induzierte Wachstumsreduktion auf eine Modulation der Astrozyten zurück zu führen ist, da der gleiche Versuchsansatz ohne Astrozyten zur Stimulation des Neuritenwachstum führte. Obwohl IFN γ das Auswachsen von neuronalen Einzelzellen, die auf immortalisierten Schwann-Zellen kultiviert wurden, hemmte, zeigte die durch IFN γ induzierte Reduktion der Schwann-Zell-Zone in den hier untersuchten embryonalen Explantaten keinen Einfluss auf das Auswachsen der Neuriten. Dies könnte daran liegen, dass im Matrigel wachstumsfördernde Proteine (z.B. Laminin) enthalten sind, die sonst von den Schwann-Zellen exprimiert werden und somit dieser Effekt der Schwann-Zellen auf das Neuritenwachstum in diesem Modell keine große Rolle spielt. Wurden die SG-Explantate ohne zusätzliche Zellen kultiviert, so konnte durch IFN γ das NT-induzierte Wachstum der Neuriten noch gesteigert werden, wobei erstaunlicherweise das Wachstum nur in den Gruppen gesteigert wurde, die mit einer Neurotrophin-Doppelkombination kultiviert wurden.

Es scheint, dass IFN γ auf sehr unterschiedlichen Wegen das Neuritenwachstum der SG-Neurone nach einer Verletzung beeinflussen kann. Einerseits kann es in den Neuronen das NT-abhängige Neuritenwachstum stimulieren, andererseits kann es das Wachstum der peripheren Neurone durch die Modulation von nicht-neuronalen Zellen im ZNS und PNS hemmen. Darüber hinaus kann durch IFN γ die NGF-Produktion in der Haut stimuliert werden (Bläsing et al. 2005), was wiederum das Auswachsen der SG-Neuriten ins PNS-Milieu fördern könnte.

IFN γ stimuliert die Differenzierung von cholinergen Neuronen im basalen Vorderhirn, PAJU-Zellen, Neuroblastomzellen und adulten Stammzellen in neuritentragende Zellen (Jonakait et al. 1994, Song et al. 2005, Munoz-Fernandes et al. 1994, Wong et al. 2004). Barish et al. (1991) konnte zeigen, dass IFN γ zwar die Verzweigung der auswachsenden Neuriten von embryonalen hippokampalen Neuronen erhöhen konnte, die Länge der Neuriten jedoch unverändert blieb. Dieser Effekt war unabhängig davon, ob die Neurone mit oder ohne Astrozyten kultiviert wurden. Wurden hingegen embryonale kortikale Neuronen auf Mikroglia kultiviert, so konnte

IFN γ das Längenwachstum der Neuriten reduzieren (Rozenfeld et al. 2003). In dem hier untersuchten organotypischen entorhinalen Kortex-Modell konnte jedoch keine Veränderung der neuronalen Dichte durch IFN γ induziert werden.

Diese sehr unterschiedlichen Effekte von IFN γ auf das neuronale Wachstum könnten durch die verschiedenen Modelle zu erklären sein. Zum einen wurden Neurone unterschiedlichen Ursprungs, die als organotypische Explantate oder Einzelzellen kultiviert wurden, untersucht und die neuronalen Einzelzellen mit unterschiedlichen Zellen ko-kultiviert. Zum anderen wurden verschiedene Parameter für die Bestimmung des neuronalen Wachstums herangezogen. Die durch IFN γ verstärkte Verzweigung könnte nur in den hippokampalen nicht aber in den kortikalen Neuronen induziert werden. Weiterhin scheinen unter dem Einfluss von IFN γ nur Mikroglia aber nicht Astrozyten das Längenwachstum der Neuriten zu vermindern. Der direkte Einfluss von IFN γ auf die Neurone in einer Einzellzell-Kultur könnte somit eher wachstumsstimulierend und der indirekte Effekt durch die Mikroglia eher hemmend sein. In dem hier untersuchten organotypischen Modell könnten sich die stimulierenden und hemmenden Einflüsse von IFN γ gegenseitig wieder aufheben und somit scheint das axonale Wachstum unbeeinflusst.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass IFN γ auf viele Zellen unterschiedlich wirkt, und demnach wurden je nach Versuchsansatz eine eher stimulierende oder hemmende Wirkung von IFN γ auf das neuronale Wachstum beschrieben. Es scheint jedoch, dass IFN γ einerseits einen steigernden Effekt auf das Auswachsen von PNS und ZNS Neuronen hat, wenn es direkt auf die neuronalen Zellen wirkt und andererseits durch die Modulation von Astrozyten, Schwann-Zellen und Mikroglia das Neuritenwachstum reduzieren kann. Da IFN γ in einer Vielzahl von Zelltypen die Differenzierung in neuritentragende Zellen induzieren kann, scheint es ein wichtiger Faktor in der neuronalen Entwicklung und Regeneration zu sein.

5.2.5. Effekt von IL-4 auf das neuronale Wachstum

IL-4 wird von den nach einer Verletzung eingewanderten Th2-Zellen, Mastzellen und Basophilen sezerniert (da Silva et al. 2008) und trägt zur Aktivierung der Antikörperproduktion in den B-Lymphozyten bei (Walport et al. 2008). Nach einer Ischämie im Gehirn kommt es zur lokalen IL-4 mRNA-Expression (Li et al. 2001), und nach einer intrakortikalen Lipopolysaccharid-Injektion zur IL-4-Produktion in Mikroglia

aber nicht in Astrozyten oder Neuronen (Park et al. 2005). Aktivierte Astrozyten exprimieren zwar den IL-4R aber kein IL-4 (Brodie et al. 1998).

Im PNS-Modell konnten geringe Konzentrationen IL-4 das NT4/NGF- und Triple-induzierte Auswachsen signifikant hemmen und das NT3/NGF-induzierte Auswachsen reduzieren, wobei eine hohe IL-4-Konzentration das NT4-induzierte Auswachsen jedoch fördern konnten. In der Literatur gibt es keinen direkten Hinweis darauf, dass IL-4 das Wachstum von Spinalganglion-Neuronen beeinflussen kann, es ist lediglich ein indirekter Zusammenhang zwischen IL-4 und dem Neuritenwachstum beschrieben. So kommt es bei der atopischen Dermatitis zur erhöhten Innervation der Epidermis, die mit einer erhöhten Invasion von Mastzellen und Th-Zellen sowie einer erhöhten IL-4-Sekretion einhergeht (Yamaguchi et al. 2008). Diese Hyperinnervation kann sowohl durch Sema3A (Yamaguchi et al. 2008), einem wachstumsinhibierenden Faktor für sensorische Fasern, als auch durch anti-NGF (Takano et al. 2005), reduziert werden. Die erhöhte Innervation in der atopischen Dermatitis scheint demnach NGF-abhängig zu sein und möglicherweise könnte IL-4 die NGF-Sekretion der Keratinozyten und Fibroblasten erhöhen und somit das NGF-abhängige Wachstum der Neuriten stimulieren.

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass IL-4 das Neuritenwachstum der Spinalganglienneurone beeinflussen kann und dass diese Effekte von der IL-4-Konzentration und den neurotrophen Faktoren abhängig ist. In geringer Konzentration reduzierte es das Wachstum, dass durch die Kombination aus NGF mit NT3 und/oder NT4 induziert wurde. Da das Auswachsen, dass durch die Einzelfaktoren induziert wurde, nicht durch IL-4 verändert wurde, scheint die Kombination der neurotrophen Faktoren ausschlaggebend für den reduzierenden Effekt zu sein. Eine Steigerung konnte nur bei dem NT4-abhängigen Wachstum mit einer hohen Konzentration IL-4 festgestellt werden. Bei der Kombination aus NT4 mit NT3 und/oder NGF ist diese Steigerung nicht mehr erkennbar, was darauf zurückzuführen sein könnte, dass die Steigerung durch NT4/IL-4 nur auf das Niveau angehoben wurde, welches auch durch NT3 allein erreicht wurde. Da das NGF-induzierte Auswachsen auch ohne IL-4 höher ist, als das NT4/IL-4-induzierte Wachstum, könnte auch hier die IL-4-induzierte Wachstumssteigerung nicht erkennbar sein.

Für die Wirkung von IL-4 auf das ZNS ist beschrieben, dass es das Überleben von retinalen Ganglion-Zellen (Scholl-Franco et al. 2001), Motoneuronen (Zhao et al.

2006) und hippokampalen Neuronen (Araujo et al. 1993 und 1995) *in vitro* sowie *in vivo* von kortikalen (Park et al. 2005) und fascialen Motoneuronen (DeBoy et al. 2006) fördern konnte, indem es z.B. die Produktion von freien Radikalen, die von aktivierter Mikroglia synthetisiert werden, reduzierte (Zhao et al. 2006) und das Überleben von aktivierter Mikroglia verringerte (Park et al. 2005). Weiterhin hemmte es die Proliferation und förderte die Differenzierung von retinalen Vorläufer-Zellen in Photorezeptor-Zellen (Scholl-Franco et al. 2002, da Silva et al. 2008) und konnte die NGF-Produktion in Astrozyten stimulieren (Brodie et al. 1998, Awatsuji et al. 1993). Durch eine geringe IL-4-Konzentration konnte ebenfalls das neuronale Auswachsen von EC-Explantaten *in vitro* stimuliert werden (Hendrix et al., in Revision) und diese Stimulation des Neuritenwachstums war nicht auf eine erhöhte Überlebensrate der Neurone zurück zu führen. Auch *in vivo* konnte durch die Applikation von IL-4-produzierenden Zellen das Auswachsen von kortikospinalen Fasern gesteigert und eine verbesserte funktionellen Regeneration nach einer Rückenmarksverletzung beobachtet werden (Hendrix et al. In Revision).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass IL-4 in geringer Konzentration das NT-induzierte Wachstum von neuronalen Zellen des PNS inhibieren konnte. Einen steigernden Effekt auf das neurotrophininduzierte axonale Wachstum konnte durch geringe Konzentration im ZNS-Modell und hohe Konzentration im PNS-Modell erreicht werden.

Tab. 6: Zusammenfassung der Zytokineinflüsse auf das neuronale Auswachsen im PNS- und ZNS-Modell

	SG		EC	
	50ng/ml	500ng/ml	50ng/ml	500ng/ml
IL-1 β	0	0	0	+
IL-4	-	+	0 ¹	0 ¹
IL-6	+	0	0	+
IFN γ	0	+	0	0
TNF α	-	-	+	0

SG = Spinalganglien (PNS-Modell); EC = entorhinaler Kortex (ZNS-Modell); 50 bzw. 500ng/ml = Zytokinkonzentration; 0 = keinen Effekt, + = stimulierender Effekt, - = reduzierender Effekt auf das Neuritenwachstum; 1 = Hendrix et al, in Revision

Fasst man alle Ergebnisse zusammen, so zeigt sich, dass alle hier untersuchten Zytokine die Regeneration von verletzten Nervenfasern beeinflussen können, jedoch mit unterschiedlicher Auswirkung, abhängig von dem Neuronentyp, dem Entwicklungsstadium der Neuronen, den neurotrophen Faktoren und der Zytokinkonzentration (Tab. 6). So steigerte z.B. IFN γ nur in den Spinalganglienzellen und IL-1 β nur in den entorhinalen kortikalen Neuronen das Auswachsen. Durch TNF α kam es zur Reduktion des Neuritenwachstums im PNS-Modell aber zur Stimulation im ZNS-Modell. IL-6 stimulierte das Auswachsen der Neuriten sowohl in den SG- als auch in den EC-Explantaten, wobei es im PNS-Modell nur in geringer Konzentration und im ZNS-Modell in hoher Konzentration zu diesem Effekt kam. IL-4 konnte in geringer Konzentration das Neuritenwachstum der SG-Explantate reduzieren, in hoher Konzentration jedoch stimulieren. Diese Effekte könnten sowohl durch eine direkte Modulation der Neurone oder durch die Modulation der nicht-neuronalen Zellen durch die Zytokine hervorgerufen werden.

5.3. Zytokin/Neurotrophin Interaktion

Da die Zytokine das neurotrophininduzierte Auswachsen der Neuriten beeinflussten, wurden hierzu mögliche Interaktionsebenen zwischen Zytokinen und neurotrophen Faktoren untersucht. Zum einen wurde untersucht, ob Zytokine die Trk-Rezeptor-Expression veränderten und zum anderen, ob sie die Aktivierung der Trk-Rezeptor-Signalkaskaden beeinflussten.

5.3.1. Einfluss der Zytokine auf die Trk-Rezeptor-Expression

In E13 Spinalganglien exprimieren nur wenig Neurone den TrkC-Rezeptor (Farinas et al. 1998) jedoch ein Großteil der Zellen den TrkA-Rezeptor (Molliver et al. 1997). Für die SG zeigte sich in der RT-PCR, dass die TrkA-mRNA im Vergleich zu der TrkB- und TrkC-mRNA um ein zehnfaches stärker exprimiert wurde. Dieses Ergebnis wurde auch auf Proteinebene im Western Blot und in der immunhistologischen Färbung an Kryoschnitten bestätigt. Für die primären kortikalen Neurone konnte gezeigt werden, dass die TrkB- und TrkC-mRNA um ein 100faches stärker exprimiert wurde als die TrkA-mRNA. Im Western Blot konnte jedoch kein TrkA-Protein in den EC-Explantaten nachgewiesen werden. Dies könnte daran liegen, dass kein TrkA-Protein gebildet wurde oder dass die gebildete TrkA-Protein-Menge zu gering war,

um sie im Western Blot zu detektieren. Auch Knüsel et al. (1994) konnten im Kortexgewebe keine NGF-abhängige Aktivierung der Trk-Rezeptoren nachweisen. In Neuroblastomzellen konnte IFN γ die Stabilität der TrkA-mRNA und die NGF-abhängige Aktivierung des Trk-Rezeptors erhöhen (Lucarelli et al. 1995). Um zu testen, ob auch in den hier untersuchten Modellen die zytokinvermittelte Veränderung des neuronalen Wachstum durch eine veränderte Trk-Rezeptor-Expression herbei geführt wurde, wurden relative, quantitative RT-PCRs durchgeführt. Es konnte jedoch weder durch IFN γ noch durch TNF α , die im Auswachsassay einen deutlichen Effekt auf das Neuritenwachstum der Spinalganglien-Neurone zeigten, eine signifikante Veränderung der TrkA, -B oder -C mRNA-Level induziert werden. Auch in EC-Explantaten konnte keine Veränderung der mRNA-Level der drei Trk-Rezeptoren nach der Kultivierung mit zytokinproduzierenden Zellen gemessen werden (Hechler und Hendrix, unveröffentlicht). Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die Zytokine in Neuroblastomzellen eine andere Wirkung entfalten als in verletztem neuronalen Gewebe. In den EC-Explantaten konnte auch im Western-Blot keine Veränderung der Trk-Protein-Mengen durch die Kultivierung mit Zytokinen festgestellt werden. Diese Daten lassen darauf schließen, dass die Zytokine das neuronale Wachstum nicht über eine Modulation der Trk-Rezeptor-Expression beeinflussen.

5.3.2. Einfluss der Zytokine auf die Trk-Rezeptor-Signalkaskaden

Die Zytokin-induzierte Modulation des neurotrophinabhängigen Neuritenwachstums könnte auch auf der Ebene der Trk-Signalkaskaden erfolgen, da sowohl über die Trk-Rezeptoren als auch die Zytokinrezeptoren, die IL-1R/TLR-Rezeptoren und die TNF-Rezeptoren zum Teil ähnliche Signalkaskaden aktiviert werden können. So können über die Trk- und Zytokinrezeptoren sowohl die Ras/MAPKp42/p44- als auch die PI3K/Akt- Kaskade aktiviert werden (Reichardt et al. 2006, Vosshenrich et al. 2002). Zu den durch die TNF-Rezeptoren aktivierten MAP Kinasen gehört nicht nur JNK sondern auch MAPKp42/p44 und MAPKp38 (Jupp et al. 2001). Durch den IL-1R können ebenfalls MAPK-Kaskaden aktiviert werden, die zur Aktivierung von JNK und MAPKp38 führen. Weiterhin kann es durch den IL-1R zur Aktivierung der PI3K/Akt-Kaskade kommen (Martin et al. 2002). Um eine mögliche Interaktion auf der Ebene der Signalkaskaden zu testen, wurden kortikale Einzelzell-Kulturen mit einem Zytokin präinkubiert und anschließend durch NT3 die Trk-Signalkaskaden aktiviert, wobei nur

die Präinkubation mit den Zytokinen zu keiner veränderten Aktivierung von PLC γ 1, Akt oder MAPKp42/p44 führte.

Die Präinkubation mit IL-1 β führte zu einer verminderten Aktivierung von Akt durch NT3. Auch Soiampornkul et al. (2007) konnten eine reduzierte NT3-abhängige Aktivierung von Akt und MAPKp42/p44 durch IL-1 β zeigen und führen die reduzierte Überlebensrate in neuronalen Einzelzell-Kulturen nach einer Inkubation mit IL-1 β auf diese verminderte Aktivierung zurück. Auch die IL-1 β -abhängige Eliminierung der durch MAG-induzierten Reduktion des Wachstums, ist auf eine Interaktion in den Neuronen zurückzuführen. Hierbei kommt es durch IL-1 β zur Aktivierung der MAPKp38 in den Neuronen, welches wiederum zur Inhibierung der RhoA-Aktivierung führt und somit die Wachstumsreduktion aufhebt (Temporin et al. 2008). Da die IL-1 β -abhängige Stimulation des Neuritenwachstum in den EC-Explantaten erst bei hohen Zytokinkonzentrationen induziert werden konnte, und die Beobachtungen aus den Auswachsversuchen darauf hinweisen, dass der stimulierende Effekt von IL-1 β auf das Neuritenwachstum nicht durch eine direkte Interaktion in Neuronen hervorgerufen, sondern über nicht-neuronale Zellen vermittelt wird, scheint ein anderer Versuchsaufbau für die Untersuchung des Einflusses von IL-1 β auf das neuronale Auswachsen sinnvoll. Zum einen sollten eine ansteigende Konzentrationsreihe von IL-1 β gewählt und zum anderen die Neurone mit nicht-neuronalen Zellen zusammen kultiviert werden.

IL-6 konnte das Auswachsen in den organotypischen EC-Explantaten steigern. Bei der Analyse der Signalkaskaden zeigte sich keine Veränderung der NT3-induzierten Aktivierung von PLC γ 1 und Akt durch IL-6. Da die Steigerung des Neuritenwachstum nur bei hohen Konzentrationen IL-6 beobachtet werden konnte, wäre es sinnvoll, die Modulation der Signalkaskaden noch einmal mit höheren Dosen IL-6 zu testen. Weiterhin konnte durch Cao et al. (2006) gezeigt werden, dass IL-6 die durch Myelin- bzw. MAG-induzierte Reduktion des Neuritenwachstums über die Aktivierung von JAK wieder aufheben konnte und Wu et al. (1996) konnten zeigen, dass die Stimulation des Neuritenwachstum durch IL-6 in PC12-Zellen sowohl durch die JAK/STAT- als auch die Ras/MAPK-Kaskaden vermittelt wurde. Dies lässt vermuten, dass die IL-6-abhängige Wachstumssteigerung in den kortikalen Neuronen auch über die Aktivierung der MAPK-Kaskade reguliert werden könnte.

In den primären neuronalen Einzelzellen konnte durch TNF α die NT3-induzierte Phosphorylierung von PLC γ 1 reduziert werden, wobei es keinen Einfluss auf die

Aktivierung von Akt und MAPKp42/p44 hatte. Neumann et al. (2002) konnten eine Aktivierung von RhoA durch $\text{TNF}\alpha$ in neuronalen Einzelzellen beobachten. Diese Effekte sprechen dafür, dass durch den direkten Einfluss von $\text{TNF}\alpha$ in den neuronalen Zellen das Wachstum reduziert werden kann. Ähnlich wie bei IL-1 β deuten die Ergebnisse der Auswachsassays darauf hin, dass die Stimulation des Neuritenwachstum durch $\text{TNF}\alpha$ nicht durch eine direkte Interaktion in den Neuronen sondern über die nicht-neuronalen Zellen hervorgerufen werden. Demnach sollte auch hier zukünftig der Einfluss von $\text{TNF}\alpha$ auf die Signalkaskaden in einer Mischkultur untersucht werden.

Durch $\text{IFN}\gamma$ konnte das neuronale Wachstum in den organotypischen EC-Explantaten nicht verändert werden. Auch in den embryonalen kortikalen Einzelzellen, sowohl in der neuronalen als auch in der gemischten Kultur, konnte durch $\text{IFN}\gamma$ keine Veränderung der NT3-induzierten Aktivierung von $\text{PLC}\gamma 1$ und Akt hervorgerufen werden.

Durch IL-4 konnte sowohl in der neuronalen als auch in der gemischten Einzelzellkultur eine Steigerung der NT3-induzierten MAPK Aktivierung gezeigt werden. EC-Explantate von IL-4R-defizienten oder IL-4R-mutierten Mäusen (durch Mutation keine Aktivierung von Akt und MAPK möglich) zeigten im Gegensatz zu Wildtyp- und STAT6-defizienten Mäusen keine Stimulation des Neuritenwachstums durch IL-4-sezernierende Zellen (Hendrix et al. In Revision). Demnach scheint die IL-4-induzierte Wachstumssteigerung in den organotypischen EC-Explantaten durch einen direkten Effekt von IL-4 auf die neuronalen Zellen vermittelt zu werden.

Tab. 7: Zusammenfassung der Zytokineinflüsse auf die NT3-induzierte Aktivierung der Trk-Signalkaskaden in kortikalen Einzelzellen

	$\text{PLC}\gamma 1$	Akt	MAPK
IL-1 β	0	-	n.a.
IL-6	0	0	n.a.
$\text{TNF}\alpha$	-	0	0
$\text{IFN}\gamma$	0	0	n.a.
IL-4	0	0	+

0 = kein Effekt, + = stimulierender Effekt, - = reduzierender Effekt auf die Aktivierung; n.a. = nicht analysiert

Insgesamt zeigt sich, dass die hier untersuchten Zytokine die NT3-abhängige Aktivierung der Trk-Signalkaskaden in kortikalen Neuronen auf unterschiedliche Weise beeinflussen können (Tab. 7). Sowohl IL-6 als auch IFN γ zeigten keinen Einfluss auf die NT3-abhängige Aktivierung von PLC γ 1 und Akt. Über IL-1 β konnte die Aktivierung von Akt und über TNF α die Aktivierung von PLC γ 1 reduziert werden. IL-4 konnte hingegen die Phosphorylierung von MAPK stimulieren.

Werden alle Daten zusammen betrachtet, so zeigt sich 1. dass Zytokine das Wiederauswachsen von verletzten Neuronen modulieren können; 2. dass die Wirkung der Zytokine vom Neuronentyp, der Zytokinkonzentration und dem Entwicklungsstadium der Neuronen abhängig ist; 3. dass dies sowohl über eine indirekte als auch direkte Interaktionen erfolgen kann; und 4. dass Zytokine die neurotrophininduzierte Aktivierung der Trk-Signalkaskaden beeinflussen können. Daraus ergibt sich, dass die Kombination von Zytokinen und neurotrophen Faktoren eine mögliche, wenn auch komplizierte Therapieform nach einer Verletzung des ZNS oder PNS darstellen könnte.

5.4. Ausblick

Zytokine spielen nach einer Verletzung des Nervensystems nicht nur bei der Immunantwort eine wichtige Rolle, sondern sind auch an den Regenerationsprozessen der Nervenzellen beteiligt. Sie können sowohl das Überleben, als auch die Differenzierung und das Auswachsen der Neurone beeinflussen. Um sich diese Effekte für eine mögliche Therapie nach einer Verletzung des Nervensystems zu Nutze zu machen, müssen diese sehr komplexen Interaktionen zwischen den Zytokinen und den Zellen des Nervensystems weiterhin untersucht werden. So stellt sich z.B. die Frage, in welchen Konzentrationen die Zytokine *in vivo* zu einer Stimulation des Neuritenwachstum führen können und welche Folgen durch diese Konzentration in den nicht-neuronalen Zellen hervorgerufen werden können. Auch die Frage zu welchem Zeitpunkt eine Modulation der Zytokinexpression mit einer verbesserten funktionellen Regeneration *in vivo* einhergeht, ist zu klären. Weiterhin zeigte sich, dass ein Zytokin in Neuronen unterschiedlichen Ursprungs auch unterschiedliche Effekte auf das Auswachsverhalten induzieren kann. Somit stellt sich die Frage, wodurch sich die Interaktionen von einem Zytokin in den verschiedenen Neuronentypen unterscheiden. Durch das Verständnis der Modulation der Signalkaskaden in den

neuronalen Zellen durch die Zytokine, könnten sich darüber hinaus neue Therapiewege eröffnen.

6. Literaturverzeichnis

- Allan, S. M., et al. (2005). "Interleukin-1 and neuronal injury." Nat Rev Immunol **5**(8): 629-40.
- Amaral, D. G. and M. P. Witter (1989). "The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data." Neuroscience **31**(3): 571-91.
- Arai, K. I., et al. (1990). "Cytokines: coordinators of immune and inflammatory responses." Annu Rev Biochem **59**: 783-836.
- Araujo, D. M. and C. W. Cotman (1993). "Trophic effects of interleukin-4, -7 and -8 on hippocampal neuronal cultures: potential involvement of glial-derived factors." Brain Res **600**(1): 49-55.
- Araujo, D. M. and C. W. Cotman (1995). "Differential effects of interleukin-1 beta and interleukin-2 on glia and hippocampal neurons in culture." Int J Dev Neurosci **13**(3-4): 201-12.
- Arevalo, J. C. and S. H. Wu (2006). "Neurotrophin signaling: many exciting surprises!" Cell Mol Life Sci **63**(13): 1523-37.
- Arnett, H. A., et al. (2001). "TNF alpha promotes proliferation of oligodendrocyte progenitors and remyelination." Nat Neurosci **4**(11): 1116-22.
- Atwal, J. K., et al. (2000). "The TrkB-Shc site signals neuronal survival and local axon growth via MEK and P13-kinase." Neuron **27**(2): 265-77.
- Awatsuji, H., et al. (1993). "Interleukin-4 and -5 as modulators of nerve growth factor synthesis/secretion in astrocytes." J Neurosci Res **34**(5): 539-45.
- Balschun, D., et al. (2004). "Interleukin-6: a cytokine to forget." Faseb J **18**(14): 1788-90.
- Barde, Y. A., et al. (1982). "Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain." Embo J **1**(5): 549-53.
- Barish, M. E., et al. (1991). "Gamma-interferon promotes differentiation of cultured cortical and hippocampal neurons." Dev Biol **144**(2): 412-23.
- Baxter, G. T., et al. (1997). "Signal transduction mediated by the truncated trkB receptor isoforms, trkB.T1 and trkB.T2." J Neurosci **17**(8): 2683-90.
- Beattie, M. S., et al. (2000). "Cell death and plasticity after experimental spinal cord injury." Prog Brain Res **128**: 9-21.
- Behar, O., et al. (2000). "Putting the spinal cord together again." Neuron **26**(2): 291-3.
- Benveniste, E. N. (1998). "Cytokine actions in the central nervous system." Cytokine Growth Factor Rev **9**(3-4): 259-75.
- Blasing, H., et al. (2005). "Pro-inflammatory cytokines upregulate the skin immunoreactivity for NGF, NT-3, NT-4 and their receptor, p75NTR in vivo: a preliminary report." Arch Dermatol Res **296**(12): 580-4.
- Blesch, A., et al. (1999). "Leukemia inhibitory factor augments neurotrophin expression and corticospinal axon growth after adult CNS injury." J Neurosci **19**(9): 3556-66.
- Bradbury, E. J., et al. (1999). "NT-3 promotes growth of lesioned adult rat sensory axons ascending in the dorsal columns of the spinal cord." Eur J Neurosci **11**(11): 3873-83.
- Braun, A., et al. (1998). "Role of nerve growth factor in a mouse model of allergic airway inflammation and asthma." Eur J Immunol **28**(10): 3240-51.
- Bregman, B. S., et al. (1997). "Neurotrophic factors increase axonal growth after spinal cord injury and transplantation in the adult rat." Exp Neurol **148**(2): 475-94.
- Brodie, C. (1996). "Differential effects of Th1 and Th2 derived cytokines on NGF synthesis by mouse astrocytes." FEBS Lett **394**(2): 117-20.
- Brodie, C., et al. (1998). "Functional IL-4 receptors on mouse astrocytes: IL-4 inhibits astrocyte activation and induces NGF secretion." J Neuroimmunol **81**(1-2): 20-30.
- Buchman, V. L., et al. (1994). "Role of transforming growth factor-beta isoforms in regulating the expression of nerve growth factor and neurotrophin-3 mRNA levels in embryonic cutaneous cells at different stages of development." Development **120**(6): 1621-9.
- Burridge, K. and K. Wennerberg (2004). "Rho and Rac take center stage." Cell **116**(2): 167-79.
- Byram, S. C., et al. (2004). "CD4-positive T cell-mediated neuroprotection requires dual compartment antigen presentation." J Neurosci **24**(18): 4333-9.

- Cafferty, W. B., et al. (2004). "Conditioning injury-induced spinal axon regeneration fails in interleukin-6 knock-out mice." J Neurosci **24**(18): 4432-43.
- Cafferty, W. B., et al. (2001). "Leukemia inhibitory factor determines the growth status of injured adult sensory neurons." J Neurosci **21**(18): 7161-70.
- Canto, C. B., et al. (2008). "What does the anatomical organization of the entorhinal cortex tell us?" Neural Plast **2008**: 381243.
- Cao, Z., et al. (2006). "The cytokine interleukin-6 is sufficient but not necessary to mimic the peripheral conditioning lesion effect on axonal growth." J Neurosci **26**(20): 5565-73.
- Casha, S., et al. (2001). "Oligodendroglial apoptosis occurs along degenerating axons and is associated with FAS and p75 expression following spinal cord injury in the rat." Neuroscience **103**(1): 203-18.
- Chang, J. Y., et al. (1990). "Interferon suppresses sympathetic neuronal cell death caused by nerve growth factor deprivation." J Neurochem **55**(2): 436-45.
- Chao, C. C., et al. (1993). "Neuroprotective role of IL-4 against activated microglia." J Immunol **151**(3): 1473-81.
- Chen, G. and D. V. Goeddel (2002). "TNF-R1 signaling: a beautiful pathway." Science **296**(5573): 1634-5.
- Chen, L. E., et al. (1996). "Tumor necrosis factor promotes motor functional recovery in crushed peripheral nerve." Neurochem Int **29**(2): 197-203.
- Chen, M. J., et al. (2007). "Norepinephrine induces BDNF and activates the PI-3K and MAPK cascades in embryonic hippocampal neurons." Cell Signal **19**(1): 114-28.
- Cheng, B., et al. (1994). "Tumor necrosis factors protect neurons against metabolic-excitotoxic insults and promote maintenance of calcium homeostasis." Neuron **12**(1): 139-53.
- Cho, S. G., et al. (2005). "IFN γ and TNF α synergistically induce neurite outgrowth on PC12 cells." Neurosci Lett **378**(1): 49-54.
- Clarke, D. J. and R. L. Branton (2002). "A role for tumor necrosis factor alpha in death of dopaminergic neurons following neural transplantation." Exp Neurol **176**(1): 154-62.
- Clary, D. O. and L. F. Reichardt (1994). "An alternatively spliced form of the nerve growth factor receptor TrkA confers an enhanced response to neurotrophin 3." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(23): 11133-7.
- Conti, G., et al. (2002). "Interleukin-1 beta and interferon-gamma induce proliferation and apoptosis in cultured Schwann cells." J Neuroimmunol **124**(1-2): 29-35.
- Corbit, K. C., et al. (1999). "Protein kinase C δ mediates neurogenic but not mitogenic activation of mitogen-activated protein kinase in neuronal cells." Mol Cell Biol **19**(6): 4209-18.
- Correale, J. and A. Villa (2004). "The neuroprotective role of inflammation in nervous system injuries." J Neurol **251**(11): 1304-16.
- Cosker, K. E. and B. J. Eickholt (2007). "Phosphoinositide 3-kinase signalling events controlling axonal morphogenesis." Biochem Soc Trans **35**(Pt 2): 207-10.
- Cosker, K. E., et al. (2008). "Regulation of PI3K signalling by the phosphatidylinositol transfer protein PITP α during axonal extension in hippocampal neurons." J Cell Sci **121**(Pt 6): 796-803.
- Cowley, S., et al. (1994). "Activation of MAP kinase kinase is necessary and sufficient for PC12 differentiation and for transformation of NIH 3T3 cells." Cell **77**(6): 841-52.
- Cui, Q. (2006). "Actions of neurotrophic factors and their signaling pathways in neuronal survival and axonal regeneration." Mol Neurobiol **33**(2): 155-79.
- da Silva, A. G., et al. (2008). "Interleukin-4 blocks proliferation of retinal progenitor cells and increases rod photoreceptor differentiation through distinct signaling pathways." J Neuroimmunol **196**(1-2): 82-93.
- Das, K. P., et al. (2001). "Differential patterns of nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 mRNA and protein levels in developing regions of rat brain." Neuroscience **103**(3): 739-61.
- Deboy, C. A., et al. (2006). "Immune-mediated neuroprotection of axotomized mouse facial motoneurons is dependent on the IL-4/STAT6 signaling pathway in CD4(+) T cells." Exp Neurol **201**(1): 212-24.

- Donnerer, J. (2003). "Regeneration of primary sensory neurons." Pharmacology **67**(4): 169-81.
- Edoff, K. and H. Jerregard (2002). "Effects of IL-1beta, IL-6 or LIF on rat sensory neurons co-cultured with fibroblast-like cells." J Neurosci Res **67**(2): 255-63.
- Edstrom, A., et al. (1996). "Axonal outgrowth and neuronal apoptosis in cultured adult mouse dorsal root ganglion preparations: effects of neurotrophins, of inhibition of neurotrophin actions and of prior axotomy." Neuroscience **75**(4): 1165-74.
- Eide, F. F., et al. (1996). "Naturally occurring truncated trkB receptors have dominant inhibitory effects on brain-derived neurotrophic factor signaling." J Neurosci **16**(10): 3123-9.
- English, J., et al. (1999). "New insights into the control of MAP kinase pathways." Exp Cell Res **253**(1): 255-70.
- Ernfors, P. (2001). "Local and target-derived actions of neurotrophins during peripheral nervous system development." Cell Mol Life Sci **58**(8): 1036-44.
- Esteban, P. F., et al. (2006). "A kinase-deficient TrkC receptor isoform activates Arf6-Rac1 signaling through the scaffold protein tamalin." J Cell Biol **173**(2): 291-9.
- Falcao, A. S., et al. (2007). "Apoptosis and impairment of neurite network by short exposure of immature rat cortical neurons to unconjugated bilirubin increase with cell differentiation and are additionally enhanced by an inflammatory stimulus." J Neurosci Res **85**(6): 1229-39.
- Fansa, H. and G. Keilhoff (2003). "[Factors influencing nerve regeneration]." Handchir Mikrochir Plast Chir **35**(2): 72-82.
- Farinas, I., et al. (1998). "Characterization of neurotrophin and Trk receptor functions in developing sensory ganglia: direct NT-3 activation of TrkB neurons in vivo." Neuron **21**(2): 325-34.
- Fine, E. G., et al. (2002). "GDNF and NGF released by synthetic guidance channels support sciatic nerve regeneration across a long gap." Eur J Neurosci **15**(4): 589-601.
- Fok-Seang, J., et al. (1998). "Cytokine-induced changes in the ability of astrocytes to support migration of oligodendrocyte precursors and axon growth." Eur J Neurosci **10**(7): 2400-15.
- Fontaine, V., et al. (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**(7): RC216.
- Frei, K., et al. (1989). "On the cellular source and function of interleukin 6 produced in the central nervous system in viral diseases." Eur J Immunol **19**(4): 689-94.
- Gadient, R. A. and U. Otten (1994). "Identification of interleukin-6 (IL-6)-expressing neurons in the cerebellum and hippocampus of normal adult rats." Neurosci Lett **182**(2): 243-6.
- Gadient, R. A. and U. Otten (1995). "Interleukin-6 and interleukin-6 receptor mRNA expression in rat central nervous system." Ann N Y Acad Sci **762**: 403-6.
- Galiano, M., et al. (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**(2): 327-41.
- Genc, B., et al. (2005). "Differential Trk expression in explant and dissociated trigeminal ganglion cell cultures." J Neurobiol **64**(2): 145-56.
- Ginty, D. D. and R. A. Segal (2002). "Retrograde neurotrophin signaling: Trk-ing along the axon." Curr Opin Neurobiol **12**(3): 268-74.
- Goldberg, J. L., et al. (2002). "Retinal ganglion cells do not extend axons by default: promotion by neurotrophic signaling and electrical activity." Neuron **33**(5): 689-702.
- Goldberg, J. L., et al. (2002a). "Amacrine-signaled loss of intrinsic axon growth ability by retinal ganglion cells." Science **296**(5574): 1860-4.
- Grill, R. J., et al. (1997). "Robust growth of chronically injured spinal cord axons induced by grafts of genetically modified NGF-secreting cells." Exp Neurol **148**(2): 444-52.
- Gupta, S. (2002). "A decision between life and death during TNF-alpha-induced signaling." J Clin Immunol **22**(4): 185-94.

- Hakkoum, D., et al. (2007). "Interleukin-6 promotes sprouting and functional recovery in lesioned organotypic hippocampal slice cultures." J Neurochem **100**(3): 747-57.
- Hallbook, F. (1999). "Evolution of the vertebrate neurotrophin and Trk receptor gene families." Curr Opin Neurobiol **9**(5): 616-21.
- Hammarberg, H., et al. (2000). "Regulation of laminin-associated integrin subunit mRNAs in rat spinal motoneurons during postnatal development and after axonal injury." J Comp Neurol **428**(2): 294-304.
- Hao, Y., et al. (2004). "Mood stabilizer valproate promotes ERK pathway-dependent cortical neuronal growth and neurogenesis." J Neurosci **24**(29): 6590-9.
- Hattori, A., et al. (1993). "Tumor necrosis factor stimulates the synthesis and secretion of biologically active nerve growth factor in non-neuronal cells." J Biol Chem **268**(4): 2577-82.
- Heese, K., et al. (1998). "Inflammatory signals induce neurotrophin expression in human microglial cells." J Neurochem **70**(2): 699-707.
- Hirota, H., et al. (1996). "Accelerated Nerve Regeneration in Mice by upregulated expression of interleukin (IL) 6 and IL-6 receptor after trauma." J Exp Med **183**(6): 2627-34.
- Hohn, A., et al. (1990). "Identification and characterization of a novel member of the nerve growth factor/brain-derived neurotrophic factor family." Nature **344**(6264): 339-41.
- Holgado-Madruga, M., et al. (1997). "Grb2-associated binder-1 mediates phosphatidylinositol 3-kinase activation and the promotion of cell survival by nerve growth factor." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(23): 12419-24.
- Horie, H., et al. (1997). "IL-1 beta enhances neurite regeneration from transected-nerve terminals of adult rat DRG." Neuroreport **8**(8): 1955-9.
- Horiuchi, M., et al. (2006). "MEK-ERK signaling is involved in interferon-gamma-induced death of oligodendroglial progenitor cells." J Biol Chem **281**(29): 20095-106.
- Howe, C. L., et al. (2001). "NGF signaling from clathrin-coated vesicles: evidence that signaling endosomes serve as a platform for the Ras-MAPK pathway." Neuron **32**(5): 801-14.
- Huang, E. J. and L. F. Reichardt (2001). "Neurotrophins: roles in neuronal development and function." Annu Rev Neurosci **24**: 677-736.
- Huang, E. J. and L. F. Reichardt (2003). "Trk receptors: roles in neuronal signal transduction." Annu Rev Biochem **72**: 609-42.
- Improta, T., et al. (1988). "IFN-gamma facilitates NGF-induced neuronal differentiation in PC12 cells." Exp Cell Res **179**(1): 1-9.
- Ip, N. Y., et al. (1992). "Mammalian neurotrophin-4: structure, chromosomal localization, tissue distribution, and receptor specificity." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(7): 3060-4.
- Jakeman, L. B., et al. (1998). "Brain-derived neurotrophic factor stimulates hindlimb stepping and sprouting of cholinergic fibers after spinal cord injury." Exp Neurol **154**(1): 170-84.
- Jauneau, A. C., et al. (2006). "Interleukin-1beta and anaphylatoxins exert a synergistic effect on NGF expression by astrocytes." J Neuroinflammation **3**: 8.
- Jerregard, H., et al. (2000). "Fibroblast-like cells from rat plantar skin and neurotrophin-transfected 3T3 fibroblasts influence neurite growth from rat sensory neurons in vitro." J Neurocytol **29**(9): 653-63.
- Jonakait, G. M., et al. (1994). "Interferon-gamma promotes cholinergic differentiation of embryonic septal nuclei and adjacent basal forebrain." Neuron **12**(5): 1149-59.
- Jones, L. L., et al. (2001). "Neurotrophic factors, cellular bridges and gene therapy for spinal cord injury." J Physiol **533**(Pt 1): 83-9.
- Jupp, O. J., et al. (2001). "Type II tumour necrosis factor-alpha receptor (TNFR2) activates c-Jun N-terminal kinase (JNK) but not mitogen-activated protein kinase (MAPK) or p38 MAPK pathways." Biochem J **359**(Pt 3): 525-35.
- Kao, S., et al. (2001). "Identification of the mechanisms regulating the differential activation of the mapk cascade by epidermal growth factor and nerve growth factor in PC12 cells." J Biol Chem **276**(21): 18169-77.

- Kerschensteiner, M., et al. (1999). "Activated human T cells, B cells, and monocytes produce brain-derived neurotrophic factor in vitro and in inflammatory brain lesions: a neuroprotective role of inflammation?" J Exp Med **189**(5): 865-70.
- Kim, Y., et al. (2004). "A positive role of the PI3-K/Akt signaling pathway in PC12 cell differentiation." Mol Cells **18**(3): 353-9.
- Kirstein, M. and I. Farinas (2002). "Sensing life: regulation of sensory neuron survival by neurotrophins." Cell Mol Life Sci **59**(11): 1787-802.
- Kiss, K., et al. (2006). "Role of phospholipase C-gamma in NGF-stimulated differentiation and gene induction." Acta Biol Hung **57**(2): 147-55.
- Knusel, B., et al. (1994). "Regulated neurotrophin receptor responsiveness during neuronal migration and early differentiation." J Neurosci **14**(3 Pt 2): 1542-54.
- Koibuchi, N., et al. (1999). "Promoter-specific regulation of the brain-derived neurotrophic factor gene by thyroid hormone in the developing rat cerebellum." Endocrinology **140**(9): 3955-61.
- Koizumi, S., et al. (1988). "K-252a: a specific inhibitor of the action of nerve growth factor on PC 12 cells." J Neurosci **8**(2): 715-21.
- Krueger, J. M. (2008). "The role of cytokines in sleep regulation." Curr Pharm Des **14**(32): 3408-16.
- Kuno, R., et al. (2006). "The role of TNF-alpha and its receptors in the production of NGF and GDNF by astrocytes." Brain Res **1116**(1): 12-8.
- Lacroix, S., et al. (2002). "Delivery of hyper-interleukin-6 to the injured spinal cord increases neutrophil and macrophage infiltration and inhibits axonal growth." J Comp Neurol **454**(3): 213-28.
- Larsson, K., et al. (2005). "Disc related cytokines inhibit axonal outgrowth from dorsal root ganglion cells in vitro." Spine **30**(6): 621-4.
- Lee, A. C., et al. (2003). "Controlled release of nerve growth factor enhances sciatic nerve regeneration." Exp Neurol **184**(1): 295-303.
- Lee, F. S., et al. (2001). "The uniqueness of being a neurotrophin receptor." Curr Opin Neurobiol **11**(3): 281-6.
- Lee, R., et al. (2001). "Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins." Science **294**(5548): 1945-8.
- Lentz, S. I., et al. (1999). "Neurotrophins support the development of diverse sensory axon morphologies." J Neurosci **19**(3): 1038-48.
- Leon, A., et al. (1994). "Mast cells synthesize, store, and release nerve growth factor." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(9): 3739-43.
- Levi-Montalcini, R., et al. (1954). "In vitro experiments on the effects of mouse sarcomas 180 and 37 on the spinal and sympathetic ganglia of the chick embryo." Cancer Res **14**(1): 49-57.
- Lewin, G. R. and Y. A. Barde (1996). "Physiology of the neurotrophins." Annu Rev Neurosci **19**: 289-317.
- Li, H. L., et al. (2001). "IL-17 and IFN-gamma mRNA expression is increased in the brain and systemically after permanent middle cerebral artery occlusion in the rat." J Neuroimmunol **116**(1): 5-14.
- Lindholm, D., et al. (1987). "Interleukin-1 regulates synthesis of nerve growth factor in non-neuronal cells of rat sciatic nerve." Nature **330**(6149): 658-9.
- Lisak, R. P., et al. (2001). "Interferon-gamma, tumor necrosis factor-alpha, and transforming growth factor-beta inhibit cyclic AMP-induced Schwann cell differentiation." Glia **36**(3): 354-63.
- Liu, R. Y. and W. D. Snider (2001). "Different signaling pathways mediate regenerative versus developmental sensory axon growth." J Neurosci **21**(17): RC164.
- Liu, Y., et al. (1999). "Intraspinal delivery of neurotrophin-3 using neural stem cells genetically modified by recombinant retrovirus." Exp Neurol **158**(1): 9-26.
- Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." Methods **25**(4): 402-8.

- Lovett-Racke, A. E., et al. (2000). "Developmentally regulated gene expression of Th2 cytokines in the brain." Brain Res **870**(1-2): 27-35.
- Lu, X. and P. M. Richardson (1991). "Inflammation near the nerve cell body enhances axonal regeneration." J Neurosci **11**(4): 972-8.
- Lucarelli, E., et al. (1995). "Selective regulation of TrkA and TrkB receptors by retinoic acid and interferon-gamma in human neuroblastoma cell lines." J Biol Chem **270**(42): 24725-31.
- Lykissas, M. G., et al. (2007). "The role of neurotrophins in axonal growth, guidance, and regeneration." Curr Neurovasc Res **4**(2): 143-51.
- MacInnis, B. L. and R. B. Campenot (2002). "Retrograde support of neuronal survival without retrograde transport of nerve growth factor." Science **295**(5559): 1536-9.
- Makwana, M. and G. Raivich (2005). "Molecular mechanisms in successful peripheral regeneration." Febs J **272**(11): 2628-38.
- Markus, A., et al. (2002). "Neurotrophic factors and axonal growth." Curr Opin Neurobiol **12**(5): 523-31.
- Markus, A., et al. (2002a). "Raf and akt mediate distinct aspects of sensory axon growth." Neuron **35**(1): 65-76.
- Marschinke, F. and I. Stromberg (2008). "Dual effects of TNFalpha on nerve fiber formation from ventral mesencephalic organotypic tissue cultures." Brain Res **1215**: 30-9.
- Martin, M. U. and H. Wesche (2002). "Summary and comparison of the signaling mechanisms of the Toll/interleukin-1 receptor family." Biochim Biophys Acta **1592**(3): 265-80.
- Marz, P., et al. (1999). "Role of interleukin-6 and soluble IL-6 receptor in region-specific induction of astrocytic differentiation and neurotrophin expression." Glia **26**(3): 191-200.
- McAfoose, J. and B. T. Baune (2008). "Evidence for a cytokine model of cognitive function." Neurosci Biobehav Rev.
- McGuire, S. O., et al. (2001). "Tumor necrosis factor alpha is toxic to embryonic mesencephalic dopamine neurons." Exp Neurol **169**(2): 219-30.
- Meberg, P. J., et al. (1998). "Actin depolymerizing factor and cofilin phosphorylation dynamics: response to signals that regulate neurite extension." Cell Motil Cytoskeleton **39**(2): 172-90.
- Mehler, M. F. and J. A. Kessler (1997). "Hematolymphopoietic and inflammatory cytokines in neural development." Trends Neurosci **20**(8): 357-65.
- Miller, F. D. and D. R. Kaplan (2001). "Neurotrophin signalling pathways regulating neuronal apoptosis." Cell Mol Life Sci **58**(8): 1045-53.
- Molliver, D. C. and W. D. Snider (1997). "Nerve growth factor receptor TrkA is down-regulated during postnatal development by a subset of dorsal root ganglion neurons." J Comp Neurol **381**(4): 428-38.
- Morga, E. and P. Heuschling (1996). "Interleukin-4 down-regulates MHC class II antigens on cultured rat astrocytes." Glia **17**(2): 175-9.
- Mosmann, T. (1983). "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays." J Immunol Methods **65**(1-2): 55-63.
- Munoz-Fernandez, M. A., et al. (1994). "Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha), interferon-gamma, and interleukin-6 but not TNF-beta induce differentiation of neuroblastoma cells: the role of nitric oxide." J Neurochem **62**(4): 1330-6.
- Munoz-Fernandez, M. A. and M. Fresno (1998). "The role of tumour necrosis factor, interleukin 6, interferon-gamma and inducible nitric oxide synthase in the development and pathology of the nervous system." Prog Neurobiol **56**(3): 307-40.
- Nagano, S., et al. (2001). "Cytokine-induced cell death in immortalized Schwann cells: roles of nitric oxide and cyclic AMP." J Neurochem **77**(6): 1486-95.
- Neumann, H., et al. (1997). "Interferon gamma gene expression in sensory neurons: evidence for autocrine gene regulation." J Exp Med **186**(12): 2023-31.
- Neumann, H., et al. (2002). "Tumor necrosis factor inhibits neurite outgrowth and branching of hippocampal neurons by a rho-dependent mechanism." J Neurosci **22**(3): 854-62.

- Neumann, S. and C. J. Woolf (1999). "Regeneration of dorsal column fibers into and beyond the lesion site following adult spinal cord injury." Neuron **23**(1): 83-91.
- Nikolic, M. (2002). "The role of Rho GTPases and associated kinases in regulating neurite outgrowth." Int J Biochem Cell Biol **34**(7): 731-45.
- Nimnual, A. S., et al. (1998). "Coupling of Ras and Rac guanosine triphosphatases through the Ras exchanger Sos." Science **279**(5350): 560-3.
- Nishimura, T., et al. (2008). "Potentiation of nerve growth factor-induced neurite outgrowth by flvoxamine: role of sigma-1 receptors, IP3 receptors and cellular signaling pathways." PLoS ONE **3**(7): e2558.
- Nolan, Y., et al. (2005). "Role of interleukin-4 in regulation of age-related inflammatory changes in the hippocampus." J Biol Chem **280**(10): 9354-62.
- Ohtori, S., et al. (2004). "TNF-alpha and TNF-alpha receptor type 1 upregulation in glia and neurons after peripheral nerve injury: studies in murine DRG and spinal cord." Spine **29**(10): 1082-8.
- Okada, S., et al. (2004). "Blockade of interleukin-6 receptor suppresses reactive astrogliosis and ameliorates functional recovery in experimental spinal cord injury." J Neurosci Res **76**(2): 265-76.
- Oren, A., et al. (2004). "Production of neuroprotective NGF in astrocyte-T helper cell cocultures is upregulated following antigen recognition." J Neuroimmunol **149**(1-2): 59-65.
- Osamura, N., et al. (2005). "Induction of interleukin-6 in dorsal root ganglion neurons after gradual elongation of rat sciatic nerve." Exp Neurol **195**(1): 61-70.
- Oudega, M. and T. Hagg (1996). "Nerve growth factor promotes regeneration of sensory axons into adult rat spinal cord." Exp Neurol **140**(2): 218-29.
- Pan, W., et al. (1997). "Tumor necrosis factor-alpha: a neuromodulator in the CNS." Neurosci Biobehav Rev **21**(5): 603-13.
- Park, K. W., et al. (2005). "Neuroprotective role of microglia expressing interleukin-4." J Neurosci Res **81**(3): 397-402.
- Patapoutian, A. and L. F. Reichardt (2001). "Trk receptors: mediators of neurotrophin action." Curr Opin Neurobiol **11**(3): 272-80.
- Pawlinski, R. and K. Janeczko (1997). "Intracerebral injection of interferon-gamma inhibits the astrocyte proliferation following the brain injury in the 6-day-old rat." J Neurosci Res **50**(6): 1018-22.
- Pearson, G., et al. (2001). "Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions." Endocr Rev **22**(2): 153-83.
- Penkowa, M., et al. (2003). "Astrocyte-targeted expression of IL-6 protects the CNS against a focal brain injury." Exp Neurol **181**(2): 130-48.
- Pringle, A. K., et al. (2001). "Interleukin-1beta exacerbates hypoxia-induced neuronal damage, but attenuates toxicity produced by simulated ischaemia and excitotoxicity in rat organotypic hippocampal slice cultures." Neurosci Lett **305**(1): 29-32.
- Profyris, C., et al. (2004). "Degenerative and regenerative mechanisms governing spinal cord injury." Neurobiol Dis **15**(3): 415-36.
- Qiu, J., et al. (2002). "Spinal axon regeneration induced by elevation of cyclic AMP." Neuron **34**(6): 895-903.
- Raivich, G. and M. Makwana (2007). "The making of successful axonal regeneration: genes, molecules and signal transduction pathways." Brain Res Rev **53**(2): 287-311.
- Ramer, M. S., et al. (2000). "Functional regeneration of sensory axons into the adult spinal cord." Nature **403**(6767): 312-6.
- Reichardt, L. F. (2006). "Neurotrophin-regulated signalling pathways." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **361**(1473): 1545-64.
- Rotshenker, S., et al. (1992). "Interleukin-1 activity in lesioned peripheral nerve." J Neuroimmunol **39**(1-2): 75-80.
- Rozenfeld, C., et al. (2003). "Soluble factors released by Toxoplasma gondii-infected astrocytes down-modulate nitric oxide production by gamma interferon-activated microglia and prevent neuronal degeneration." Infect Immun **71**(4): 2047-57.

- Saha, R. N., et al. (2006). "Up-regulation of BDNF in astrocytes by TNF-alpha: a case for the neuroprotective role of cytokine." J Neuroimmune Pharmacol **1**(3): 212-22.
- Saliba, E. and A. Henrot (2001). "Inflammatory mediators and neonatal brain damage." Biol Neonate **79**(3-4): 224-7.
- Santos, X., et al. (1999). "Local administration of neurotrophic growth factor in subcutaneous silicon chambers enhances the regeneration of the sensory component of the rat sciatic nerve." Microsurgery **19**(6): 275-80.
- Schafer, M., et al. (1996). "Disruption of the gene for the myelin-associated glycoprotein improves axonal regrowth along myelin in C57BL/Wlds mice." Neuron **16**(6): 1107-13.
- Scherbel, U., et al. (1999). "Differential acute and chronic responses of tumor necrosis factor-deficient mice to experimental brain injury." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(15): 8721-6.
- Schneider-Schaulies, J., et al. (1991). "Down-regulation of myelin-associated glycoprotein on Schwann cells by interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha affects neurite outgrowth." Neuron **7**(6): 995-1005.
- Schneider, R. and M. Schweiger (1991). "A novel modular mosaic of cell adhesion motifs in the extracellular domains of the neurogenic trk and trkB tyrosine kinase receptors." Oncogene **6**(10): 1807-11.
- Schnell, L., et al. (1994). "Neurotrophin-3 enhances sprouting of corticospinal tract during development and after adult spinal cord lesion." Nature **367**(6459): 170-3.
- Schroeter, M. and S. Jander (2005). "T-cell cytokines in injury-induced neural damage and repair." Neuromolecular Med **7**(3): 183-95.
- Schultzberg, M., et al. (2007). "Inflammation in the nervous system--physiological and pathophysiological aspects." Physiol Behav **92**(1-2): 121-8.
- Serpe, C. J., et al. (1999). "Exacerbation of facial motoneuron loss after facial nerve transection in severe combined immunodeficient (scid) mice." J Neurosci **19**(11): RC7.
- Serpe, C. J., et al. (2000). "Kinetics of facial motoneuron loss following facial nerve transection in severe combined immunodeficient mice." J Neurosci Res **62**(2): 273-8.
- Serpe, C. J., et al. (2002). "Functional recovery after facial nerve crush is delayed in severe combined immunodeficient mice." Brain Behav Immun **16**(6): 808-12.
- Shamash, S., et al. (2002). "The cytokine network of Wallerian degeneration: tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1alpha, and interleukin-1beta." J Neurosci **22**(8): 3052-60.
- Sherer, T. B., et al. (1998). "Mechanisms of increased NGF production in vascular smooth muscle of the spontaneously hypertensive rat." Exp Cell Res **241**(1): 186-93.
- Shohami, E., et al. (1996). "Inhibition of tumor necrosis factor alpha (TNFalpha) activity in rat brain is associated with cerebroprotection after closed head injury." J Cereb Blood Flow Metab **16**(3): 378-84.
- Shohami, E., et al. (1999). "Dual role of tumor necrosis factor alpha in brain injury." Cytokine Growth Factor Rev **10**(2): 119-30.
- Sholl-Franco, A., et al. (2001). "Interleukin-2 and interleukin-4 increase the survival of retinal ganglion cells in culture." Neuroreport **12**(1): 109-12.
- Sholl-Franco, A., et al. (2002). "IL-4 increases GABAergic phenotype in rat retinal cell cultures: involvement of muscarinic receptors and protein kinase C." J Neuroimmunol **133**(1-2): 20-9.
- Snider, W. D., et al. (2002). "Signaling the pathway to regeneration." Neuron **35**(1): 13-6.
- Soiampornkul, R., et al. (2008). "Interleukin-1beta interferes with signal transduction induced by neurotrophin-3 in cortical neurons." Brain Res **1188**: 189-97.
- Song, J. H., et al. (2005). "Interferon gamma induces neurite outgrowth by up-regulation of p35 neuron-specific cyclin-dependent kinase 5 activator via activation of ERK1/2 pathway." J Biol Chem **280**(13): 12896-901.
- Stoll, G., et al. (1989). "Wallerian degeneration in the peripheral nervous system: participation of both Schwann cells and macrophages in myelin degradation." J Neurocytol **18**(5): 671-83.
- Stoll, G., et al. (2002). "Degeneration and regeneration of the peripheral nervous system: from Augustus Waller's observations to neuroinflammation." J Peripher Nerv Syst **7**(1): 13-27.

- Streit, W. J., et al. (2000). "Comparative evaluation of cytokine profiles and reactive gliosis supports a critical role for interleukin-6 in neuron-glia signaling during regeneration." J Neurosci Res **61**(1): 10-20.
- Strijbos, P. J. and N. J. Rothwell (1995). "Interleukin-1 beta attenuates excitatory amino acid-induced neurodegeneration in vitro: involvement of nerve growth factor." J Neurosci **15**(5 Pt 1): 3468-74.
- Strohmaier, C., et al. (1996). "A splice variant of the neurotrophin receptor trkB with increased specificity for brain-derived neurotrophic factor." Embo J **15**(13): 3332-7.
- Swartz, K. R., et al. (2001). "Interleukin-6 promotes post-traumatic healing in the central nervous system." Brain Res **896**(1-2): 86-95.
- Takano, N., et al. (2005). "Effects of anti-nerve growth factor antibody on symptoms in the NC/Nga mouse, an atopic dermatitis model." J Pharmacol Sci **99**(3): 277-86.
- Taskinen, H. S., et al. (2000). "Peripheral nerve injury induces endoneurial expression of IFN-gamma, IL-10 and TNF-alpha mRNA." J Neuroimmunol **102**(1): 17-25.
- Temporin, K., et al. (2008). "IL-1beta promotes neurite outgrowth by deactivating RhoA via p38 MAPK pathway." Biochem Biophys Res Commun **365**(2): 375-80.
- Temporin, K., et al. (2008a). "Interleukin-1 beta promotes sensory nerve regeneration after sciatic nerve injury." Neurosci Lett **440**(2): 130-3.
- Thier, M., et al. (1999). "Interleukin-6 (IL-6) and its soluble receptor support survival of sensory neurons." J Neurosci Res **55**(4): 411-22.
- Tong, L., et al. (2008). "Interleukin-1 beta impairs brain derived neurotrophic factor-induced signal transduction." Neurobiol Aging **29**(9): 1380-93.
- Toran-Allerand, C. D., et al. (1999). "Novel mechanisms of estrogen action in the brain: new players in an old story." Front Neuroendocrinol **20**(2): 97-121.
- Trepel, M., (2008) "Neuroanatomie. Struktur und Funktion." 4.Auflage, Urban & Fischer Verlag
- Turnley, A. M., et al. (2001). "SOCS1 regulates interferon-gamma mediated sensory neuron survival." Neuroreport **12**(16): 3443-5.
- Ulupinar, E., et al. (2000). "Differential effects of NGF and NT-3 on embryonic trigeminal axon growth patterns." J Comp Neurol **425**(2): 202-18.
- Urfer, R., et al. (1995). "An immunoglobulin-like domain determines the specificity of neurotrophin receptors." Embo J **14**(12): 2795-805.
- Vaillant, A. R., et al. (1999). "Depolarization and neurotrophins converge on the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway to synergistically regulate neuronal survival." J Cell Biol **146**(5): 955-66.
- Vitkovic, L., et al. (2000). ""Inflammatory" cytokines: neuromodulators in normal brain?" J Neurochem **74**(2): 457-71.
- Viviani, B., et al. (2003). "Interleukin-1beta enhances NMDA receptor-mediated intracellular calcium increase through activation of the Src family of kinases." J Neurosci **23**(25): 8692-700.
- von Bartheld, C. S. and B. Fritsch (2006). "Comparative analysis of neurotrophin receptors and ligands in vertebrate neurons: tools for evolutionary stability or changes in neural circuits?" Brain Behav Evol **68**(3): 157-72.
- von Boyen, G. B., et al. (2006). "Nerve growth factor secretion in cultured enteric glia cells is modulated by proinflammatory cytokines." J Neuroendocrinol **18**(11): 820-5.
- Vosshenrich, C. A. and J. P. Di Santo (2002). "Interleukin signaling." Curr Biol **12**(22): R760-3.
- Walport, M., et al. (2008). "Janeway's Immunobiology" 7th Revised edition, Taylor & Francis Ltd
- Wang, X., et al. (2007). "Interleukin-1beta mediates proliferation and differentiation of multipotent neural precursor cells through the activation of SAPK/JNK pathway." Mol Cell Neurosci **36**(3): 343-54.
- Wertz, I. E. and V. M. Dixit (2008). "Ubiquitin-mediated regulation of TNFR1 signaling." Cytokine Growth Factor Rev **19**(3-4): 313-24.

- Wirjatijasa, F., et al. (2002). "Interleukin-4, interleukin-10, and interleukin-1-receptor antagonist but not transforming growth factor-beta induce ramification and reduce adhesion molecule expression of rat microglial cells." J Neurosci Res **68**(5): 579-87.
- Wong, G., et al. (2004). "Interferon-gamma but not TNF alpha promotes neuronal differentiation and neurite outgrowth of murine adult neural stem cells." Exp Neurol **187**(1): 171-7.
- Wu, Y. Y. and R. A. Bradshaw (1996). "Induction of neurite outgrowth by interleukin-6 is accompanied by activation of Stat3 signaling pathway in a variant PC12 cell (E2) line." J Biol Chem **271**(22): 13023-32.
- Yamada, M., et al. (1997). "Insulin receptor substrate (IRS)-1 and IRS-2 are tyrosine-phosphorylated and associated with phosphatidylinositol 3-kinase in response to brain-derived neurotrophic factor in cultured cerebral cortical neurons." J Biol Chem **272**(48): 30334-9.
- Yamaguchi, J., et al. (2008). "Semaphorin3A alleviates skin lesions and scratching behavior in NC/Nga mice, an atopic dermatitis model." J Invest Dermatol **128**(12): 2842-9.
- Yin, Q., et al. (2001). "Neurotrophin-4 delivered by fibrin glue promotes peripheral nerve regeneration." Muscle Nerve **24**(3): 345-51.
- York, R. D., et al. (2000). "Role of phosphoinositide 3-kinase and endocytosis in nerve growth factor-induced extracellular signal-regulated kinase activation via Ras and Rap1." Mol Cell Biol **20**(21): 8069-83.
- Yune, T. Y., et al. (2003). "Increased production of tumor necrosis factor-alpha induces apoptosis after traumatic spinal cord injury in rats." J Neurotrauma **20**(2): 207-19.
- Zhao, W., et al. (2006). "Protective effects of an anti-inflammatory cytokine, interleukin-4, on motoneuron toxicity induced by activated microglia." J Neurochem **99**(4): 1176-87.
- Zheng, J., et al. (2008). "Clathrin-dependent endocytosis is required for TrkB-dependent Akt-mediated neuronal protection and dendritic growth." J Biol Chem **283**(19): 13280-8.
- Zhong, J., et al. (1999). "Sensory impairments and delayed regeneration of sensory axons in interleukin-6-deficient mice." J Neurosci **19**(11): 4305-13.
- Zhou, F. Q., et al. (2004). "NGF-induced axon growth is mediated by localized inactivation of GSK-3beta and functions of the microtubule plus end binding protein APC." Neuron **42**(6): 897-912.
- Zweifel, L. S., et al. (2005). "Functions and mechanisms of retrograde neurotrophin signalling." Nat Rev Neurosci **6**(8): 615-25.

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. R. Nitsch dafür, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, meine Promotion im Institut für Zell- und Neurobiologie an der Charité durchzuführen, die notwendigen Mittel für das Forschungsprojekt bereitgestellt hat und die Arbeit begutachtet hat.

Ebenso danke ich Herrn Prof. Dr. G. Multhaupt für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Herrn Prof. Dr. S. Hendrix danke ich für die Betreuung dieser Arbeit, der mit seiner Fürsprache maßgeblich zur Entstehung dieses Projekts beigetragen hat.

Dr. Christine Brandt danke ich für die vielen fachlichen und auch darüber hinausgehenden Gespräche. Ihre wertvollen Anregungen und Ratschläge habe ich immer sehr geschätzt, genauso wie die vielen schönen Momente mit ihr, die meinen Arbeitsalltag bereichert haben.

Allen Kolleginnen und Kollegen aus der AG Hendrix danke ich für die gute Zusammenarbeit. Ganz besonderer Dank gilt Dr. Stephanie Sallach und Daniel Hechler sowie Doreen Lüdecke und Nora Weihe, auf deren Unterstützung ich mich nicht nur im Laboralltag stets verlassen konnte. In der angenehmen Arbeitsatmosphäre sind Freundschaften entstanden, die mir sehr wichtig sind, und die mich auch über meine Tätigkeit am Institut hinaus begleiten.

Für die produktive wissenschaftliche Zusammenarbeit und die wertvollen Diskussionen danke ich den Mitarbeitern des Instituts. Im Besonderen danke ich Dr. Nicola Brandt, Dr. Thorsten Trimbuch, Beate Geist, Leslie Schlüter, Dr. Lena Smirnova, Dr. Antje Diestel, Daniel Richter, Prof. Dr. Seija Lehnardt und Prof. Dr. Anja Bräuer für ihre Unterstützung. Auch die organisatorische Unterstützung von André Gronau, Marni Pollrich, Peter Köhler und Karl Roth hat mir sehr geholfen – ohne sie wäre der erfolgreiche Abschluss dieser Arbeit so nicht möglich gewesen.

Meiner Familie und meinen Freunden danke herzlich ich für ihre fortwährende Unterstützung und ihr Interesse an meiner Arbeit.

Meinem Freund Moritz Aleithe danke ich von ganzem Herzen für seine unermüdliche Unterstützung und Motivation.

Publikationen

Sven Hendrix*, Daniel Hechler*, Stephanie Sallach*, Greta Gölz*, Francesco Boato, Karen Rosenberger, Thomas Kammertöns, Lisa Schnell, Johannes Vogt, Doreen Lüdecke, Christine Brandt, Fred Lühder, Volker Siffrin, Ralf Gold, Thomas Blankenstein, Martin Schwab, Herbert Schwegler, Frauke Zipp, and Robert Nitsch

T helper cells stimulate axon regeneration via interleukin-4 by modulating neurotrophin signaling; Nature Medicine (in Revision 2008)

*These authors contributed equally to this work

Greta Gölz, Lars Uhlmann, Doreen Lüdecke, Nora Markgraf, Robert Nitsch and Sven Hendrix

The Cytokine/ Neurotrophin axis in peripheral axon outgrowth; EJM 24: 2721-2730 (2006)

Peters EMJ, Hendrix S, Gölg G, Klapp BF, Arck PC, Paus R

Nerve Growth Factor and its Precursor Differentially Regulate Hair Cycle Progression in Mice. Brain Behav Immun 53: 1-14 (2005)

Poster

S. Hendrix, D. Hechler, S. Sallach, G. Gölg, F. Boato, K. Rosenberger, T. Kammertöns, L. Schnell, J. Vogt, D. Lüdecke, C. Brandt, F. Lühder, V. Siffrin, R. Gold, T. Blankenstein, M. Schwab, H. Schwegler, F. Zipp, and R. Nitsch

T helper cells stimulate axon regeneration via interleukin-4 in an Akt/MAPK-dependent manner. 104th Annual Meeting of the Anatomical Societies, Antwerp, 2009

Gölg G., Nitsch R. & Hendrix S.

The Cytokine/Neurotrophin Axis in Peripheral Axon Outgrowth. 5th Forum of European Neuroscience, Vienna, Austria, 2006

Greta Gölg, Nora Markgraf, Robert Nitsch, Sven Müller-Röver

A model for investigating the influence of T helper cell cytokines on dorsal root ganglia. 1st International PhD Student Symposium (Berlin Brain Days), Berlin, Germany, 2004

Aus Datenschutzrechtlichen Gründen wurde der Lebenslauf entfernt.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Greta Gölz, geboren am 08.01.1976, an Eides statt, dass ich die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unzulässige Hilfe angefertigt habe.

Berlin, den