

# **1 EINLEITUNG**

Das zentrale Nervensystem (ZNS) galt lange Zeit als immunprivilegiertes Organ, in dem kein Austausch zwischen den Zellen des Nervensystems und den Zellen des Immunsystems stattfindet (Streilein et al., 1993, 1995). Mittlerweile ist jedoch bekannt, daß Wechselwirkungen zwischen dem Immunsystem und dem ZNS bestehen, die allerdings durch das Vorhandensein einer Blut-Hirn-Schranke streng kontrolliert werden (Hickey et al., 1991; Lassmann, 1997). Dadurch soll zum einen das Risiko einer Schädigung durch neuroinflammatorische Erkrankungen so gering wie möglich gehalten werden, da sich bereits geringste Verletzungen im Bereich des ZNS nachteilig auswirken können und die Fähigkeiten zur neuronalen Regeneration stark begrenzt sind (Faden und Salzman, 1992; Faden, 1993; McIntosh, 1993). Andererseits erweist sich jedoch auch im ZNS das Eingreifen des Immunsystems als äußerst sinnvoll und notwendig, um Heilungsprozesse nach Verletzungen herbeizuführen (Ben-Nun et al., 1982; Hickey et al., 1991; Rapalino, 1993; Lazarov-Spiegler et al., 1996; Martin, 1997).

Ziel der derzeitigen Forschung ist einerseits die Suppression inflammatorischer Prozesse im ZNS, andererseits soll bei bereits bestehenden neuroinflammatorischen Erkrankungen oder traumatischen Verletzungen des ZNS die Ausbreitung des Schadens minimiert und neuronale Regeneration gefördert werden.

## **1.1 Zentrales Nervensystem**

### **1.1.1 Allgemeine Einführung**

Das zentrale Nervensystem setzt sich aus Nervenzellen (Neurone) und Gliazellen zusammen. Während Neurone für die Reizaufnahme, Erregungsleitung und Reizverarbeitung zuständig sind, werden Gliazellen als eine Art Bindegewebe mit vielfältigen Aufgaben, z.B. bei der Aufrechterhaltung der Homöostase, der Immunabwehr und der Isolierung von Nervenfasern, verstanden.

Ein Neuron besteht aus einem Zellkörper, der den Zellkern enthält, sowie aus einem oder mehreren Fortsätzen. Die Fortsätze werden in Dendriten, die der Erregungsaufnahme dienen, und ein Axon, welches für die Reizweiterleitung verantwortlich ist, unterteilt. Aufgrund dieser morphologischen Merkmale und spezieller Strukturen, den Synapsen, stehen die Neurone untereinander in Verbindung und ermöglichen die Funktionen und Arbeitsweisen des ZNS (Zilles und Rehkämper, 1998; Trepel, 2003).

An den Synapsen findet die Erregungsübertragung vom Axon der einen Nervenzelle zu den Dendriten der nachfolgenden Nervenzelle mit Hilfe chemischer Botenstoffe, den Neurotransmittern, statt. Die Transmitter, z.B. Glutamat, GABA oder Glycin, binden an der Erfolgszelle an spezifische Rezeptoren, was zu Veränderungen der Erregbarkeit der postsynaptischen Membran führt. Dabei kommt es durch das Öffnen von liganden- und/oder spannungsgesteuerten Kanälen zu einer Änderung in der Permeabilität für Ionen (Einstrom/Ausstrom). Neben diesen schnellen Signalübertragungswegen gibt es im ZNS auch eine langsame Signalübertragung durch Second-messenger-Mechanismen mit oft sehr langanhaltender Wirkung.

Die axonalen Fortsätze einer Nervenzelle sind meist von einer mehrschichtigen, unterschiedlich dicken Hülle aus phospholipidhaltigen Gliazellmembranen, der Myelinscheide, umgeben. Diese Myelinscheide dient der elektrischen Isolierung, weist jedoch in bestimmten Abständen Einschnürungen (Ranvier-Schnürringe) auf, an denen die Erregung der Zellmembran erfolgen kann. Die Bedeutung der Myelinscheide liegt letztendlich darin, daß eine sprunghaft von Schnürring zu Schnürring ablaufende saltatorische, also wesentlich schnellere Erregungsleitung möglich ist. Werden Axone von Nervenzellen durch eine Verletzung geschädigt, kommt es in Abhängigkeit vom direkten Ort der Schädigung entweder zum Absterben der gesamten Nervenzelle oder nur zum Absterben des distalen Axonteils (Zilles und Rehkämper, 1998).

Am Aufbau des ZNS sind neben den Neuronen auch Gliazellen beteiligt. Sie stellen 90 % aller Zellen im Gehirn. Dazu gehören: Astrozyten, Mikrogliazellen, Oligodendrozyten und Ependymzellen.

Die sternförmigen Astrozyten ähneln in ihrer Morphologie den Neuronen. Ihr Zellkörper ist jedoch wesentlich kleiner und die zahlreichen Fortsätze verzweigen sich nicht so stark wie neuronale Fortsätze. Sie erfüllen hauptsächlich die Aufgaben des Bindegewebes, haben also generelle strukturgebende Stützfunktionen im ZNS. Entsprechend wird auch zugrunde gegangenes Gewebe im Gehirn zum Teil durch Proliferation von Astrozyten ersetzt. Es bildet sich eine sogenannte Glianarbe. Weiterhin sind Astrozyten maßgeblich am Austausch von Nährstoffen und Stoffwechselprodukten zwischen Neuronen und Blut sowie an der Modulation der interneuronalen Signalübertragung und an der Ausbildung der Blut-Hirn-Schranke beteiligt (Zilles und Rehkämper, 1998).

Die Mikrogliazellen weisen eine große Formenvariation auf, die abhängig von ihrem Aktivierungszustand ist. Sie unterscheiden sich von den anderen Zellen zum einen durch ihre Beweglichkeit im ZNS und zum anderen durch ihre Entwicklung aus ins ZNS eingewanderten

Makrophagen. Mikrogliazellen werden daher auch als intrinsische Gehirnmakrophagen bezeichnet und sind primär für Entzündungsreaktionen verantwortlich. Sie spielen eine wichtige Rolle bei Abwehr- und Abräumvorgängen im ZNS, indem sie Reste untergegangenen Gewebes ebenso wie Antigen-Antikörper-Komplexe phagozytieren. Sie helfen bei der Geweberegeneration und können ins ZNS eingedrungene Mikroorganismen direkt zerstören (Trepel, 2003).

Die Oligodendrozyten besitzen wenige kurze und kaum verzweigte Fortsätze. Sie sind an der Ausbildung der Myelinscheide beteiligt, indem sie mit ihren Fortsätzen die Axone von Nervenzellen umhüllen (Trepel, 2003).

Die letzte Gruppe bilden die Ependymzellen, welche die inneren Liquorräume mit einer Zellschicht auskleiden, die den Liquor vom unmittelbaren Hirngewebe trennt (Trepel, 2003).

### **1.1.2 Neurotrophine und Neurotrophin-Rezeptoren**

Am Überleben bzw. an der Differenzierung von Neuronen sind unterschiedliche Faktoren beteiligt. Hierzu gehören auch die Neurotrophinen Faktoren. Sie werden von Neuronen und Gliazellen, aber auch von anderen Zellen, wie z.B. T-Zellen und Muskelzellen, synthetisiert und wirken sowohl auf Neurone als auch auf nicht-neuronale Zellen. Dabei kann ihre Wirkungsweise entweder Zielzell-vermittelt, parakrin oder autokrin sein. Diese Neurotrophinen Faktoren lassen sich noch einmal in drei Untergruppen unterteilen: die Neurotrophine Nerve growth factor (NGF), Brain-derived neurotrophic factor (BDNF), Neurotrophin-3 (NT-3) und Neurotrophin-4/5 (NT-4/5), die neuropoetischen Zytokine Ciliary neurotrophic factor (CNTF) und Interleukin-6 (IL-6) sowie die Fibroblasten-Wachstumsfaktoren Acidic fibroblast growth factor (aFGF) und Basic fibroblast growth factor (bFGF). Im folgenden wird ausschließlich auf die Untergruppe der Neurotrophine eingegangen.

Neurotrophine sind endogene Polypeptide, die die Entwicklung, Differenzierung und Plastizität des Nervensystems sowie das Überleben von peripheren und zentralen Neuronen steuern. Während diese Moleküle in frühen Entwicklungsstadien hauptsächlich die Vernetzung des Nervensystems regulieren, sind sie in späteren Phasen der Entwicklung sowie im adulten Zustand maßgeblich am Überleben und am Schutz von Nervenzellen beteiligt (Lindsay et al., 1994). So können sie beispielsweise nicht nur einer Degeneration entgegenwirken, sondern auch Regeneration nach einer Verletzung herbeiführen. Sie werden von Zielgebieten in geringen Konzentrationen ausgeschüttet und regulieren so die Anzahl der innervierenden Neurone (Oppenheim, 1991). Jedes Neurotrophin weist dabei ein individuelles, zeitliches und populationsabhängiges Wirkungsspektrum auf.

NGF wurde als erstes Mitglied dieser Gruppe von Rita Levi-Montalcini entdeckt (Levi-Montalcini et al., 1987, 1998, 2004). Es folgten BDNF (Barde et al., 1982; Leibrock et al., 1982; Rosenthal et al., 1991), NT-3 (Hohn et al., 1990; Maisonpierre et al., 1990a; Rosenthal et al., 1990) und NT-4/5 (Berkemeier et al., 1991; Hallbook et al., 1991; Ibanez, 1996). Diese Neurotrophine bestehen aus ca. 250 Aminosäuren, sind als Dimere aus zwei identischen Untereinheiten aufgebaut und weisen große strukturelle Homologien (50 %) auf. Sie binden selektiv an verschiedene Unterformen der Tyrosin-Kinase (Trk)-Rezeptorfamilie. Diese Rezeptoren weisen untereinander ebenfalls strukturelle Ähnlichkeiten auf. Sie bestehen jeweils aus drei Abschnitten: einer rezeptiven extrazellulären Komponente, die teilweise Ähnlichkeiten mit Immunglobulinen aufweist, einer Transmembrankomponente und einem intrazellulären Anteil mit Tyrosin-Kinase-Funktion.

Die Neurotrophine binden zum einen mit hoher Affinität und Spezifität an ihre Rezeptoren TrkA, TrkB und TrkC. Zum anderen sind sie aber auch in der Lage, mit geringerer Affinität an eine jeweils andere Trk-Unterfamilie zu binden (Barbacid, 1994; Maness et al., 1994). Darüber hinaus existieren von TrkB und TrkC Isoformen, denen die Tyrosin-Kinase-Aktivität fehlt. Diese Rezeptoren sind nicht in der Lage, auf die Neurotrophinbindung zu antworten (Klein et al., 1990; Valenzuela et al., 1993). Ein weiterer Rezeptor, an den NGF, BDNF, NT-3 und NT-4/5 binden können, ist p75NTR. Dieser Rezeptor wird aufgrund seiner strukturellen Ähnlichkeit zur Tumornekrosefaktor (TNF)-Rezeptorfamilie gezählt, weist jedoch Unterschiede bezüglich seiner Funktionen und Wirkmechanismen auf. Die Rolle von p75 als Neurotrophin-Rezeptor wird bis heute kontrovers diskutiert. Einerseits konnte eine Beteiligung am Überleben von Nervenzellen nachgewiesen werden, wobei p75NTR nach älterer Auffassung als „low affinity“-Rezeptor für NGF, BDNF, NT-3 und NT-4/5 fungiert. Derzeit wird jedoch vermutet, daß alle Neurotrophine mit der gleichen Affinität sowohl an die Trk-Rezeptoren als auch an p75NTR binden. Erst durch die Anlagerung von p75 an Trk wird die Affinität der Neurotrophine zu ihren Trk-Rezeptoren erhöht. p75NTR wird daher auch als Korezeptor der Trk-Rezeptoren bezeichnet (Bibel et al., 1999; Brennan et al., 1999; Barker, 2004). Andererseits kann p75NTR auch als apoptotischer Rezeptor während der Entwicklung und nach einer Verletzung agieren. Hierbei wird zum einen die These vertreten, daß TrkA und p75NTR als funktionelle Antagonisten konkurrieren. Kommt es zur Bindung von NGF an TrkA, überlebt die neuronale Zelle. Ist jedoch die verfügbare NGF-Konzentration und dadurch auch die TrkA-Aktivierung zu gering, kommt es zur Bindung anderer Neurotrophine, wie z.B. BDNF, an p75NTR und Apoptose wird ausgelöst (Miller, 1998; Yoon et al., 1998; Madjan und Miller, 1999). Neuere Untersuchungen lassen vermuten, daß proNGF, eine

Vorstufe des NGFs, mit hoher Affinität an p75NTR und nicht an TrkA bindet und auf diese Weise Apoptose induziert wird. Das transmembranäre Protein Sortilin kommt hierbei als Korezeptor für p75NTR in Betracht (Lee et al., 2001; Barker, 2004; Nykjaer et al., 2004; Kalb, 2005). *In vivo* konnte auch gezeigt werden, daß die Oligodendrozytenapoptose nach einer Rückenmarksverletzung von einer verstärkten proNGF-Synthese begleitet wird (Beattie et al., 2002) und daß die Apoptose geschädigter kortikospinaler Neurone ebenfalls proNGF-vermittelt ist (Harrington et al., 2004). Neben den Funktionen als Trk-Korezeptor und Apoptose-Regulator wird p75NTR außerdem eine entscheidende Rolle in der Regulation neuronalen Wachstums zugeschrieben (Barker, 2004; Kalb, 2005). p75NTR ist in der Lage, zusammen mit dem Nogo-Rezeptor und Lingo-1 einen dreiteiligen Rezeptorkomplex auszubilden, welcher wachstumshemmende Faktoren des ZNS bindet. Zu diesen Myelin-based growth inhibitors (MBGIs) gehören Nogo, Myelin-associated glycoprotein (MAG) und Oligodendrocyte myelin glycoprotein (OmgP). Die *in vivo* Untersuchungen zur Rolle von p75NTR bei der Regeneration nach Läsion zeigen jedoch widersprüchliche Resultate (Boyd und Gordon, 2003; Dubreuil et al., 2003; Gschwendtner et al., 2003; Song et al., 2004).

Die Annahme, daß Neurotrophine ihre Zellüberlebens-Aktivität über Trk-Rezeptoren und ihre Zelltod-Aktivität über p75NTR vermitteln (Madjan und Miller, 1999; Yoon et al., 1998), scheint somit durch aktuelle Befunde widerlegt. Ob ein Neuron überlebt oder apoptotisch wird, hängt von zahlreichen Faktoren, wie z.B. der Ausbildung von Rezeptorkomplexen, der Lokalisation dieser Rezeptorkomplexe (Neurit oder Zellkörper), der Art der Liganden, der Zelltyp-Spezifität, aber auch dem Ort der neuronalen Schädigung sowie dem Entwicklungsstatus der Zelle, ab. All diese Faktoren tragen zur Auslösung unterschiedlicher Signalkaskaden innerhalb des Neurons bei. So können beide Ereignisse, Zellüberleben und Zelltod, sowohl über Trk-Rezeptoren als auch über p75NTR vermittelt werden (Kalb, 2005).

Tab. 1.1 gibt einen Überblick über die Funktionen der Neurotrophine sowie über ihre Rezeptoren.

Neurotrophin	Rezeptoren		Wirkungen
	High affinity	Low affinity	
NGF	TrkA	p75	Entwicklung sympathischer, sensorischer und cholinergischer Neurone; Schutz vor neuronalem Zelltod; Proliferation von Mastzellen; Entwicklung von B-Zellen, T-Zellen und Granulozyten; Bindeglied zwischen Nerven-, Immun- und Hormonsystem

BDNF	TrkB	TrkA, p75	Entwicklung sensorischer, cholinergischer und dopaminergischer Neurone sowie retinaler Ganglienzellen; Schutz vor Zelltod spinaler Motoneurone; Beeinflussung der neuromuskulären Synapsenaktivität
NT-3	TrkC	TrkA, TrkB, p75	Entwicklung peripherer sensorischer Neurone; Schutz vor Zelltod spinaler Motoneurone; Beeinflussung der neuromuskulären Synapsenaktivität; Axonales Wachstum des corticospinalen Traktes während der Entwicklung und nach einer Verletzung
NT-4/5	TrkB	TrkA, p75	Entwicklung von Motoneuronen, Schutz vor Zelltod retinaler Ganglienzellen, Axonales Wachstum

**Tabelle 1.1:** Übersicht über die wichtigsten Funktionen der Neurotrophine und ihre Rezeptoren.

### 1.1.3 Beteiligung der Neurotrophine an Regenerationsprozessen

In den letzten Jahren wurden zahlreiche Studien durchgeführt, die sich mit dem Einfluß der Neurotrophine auf neuronales Überleben befassen und die Rolle der Neurotrophine in der Entwicklung des zentralen und peripheren Nervensystems klären sollen (Hofer et al., 1990; Maisonpierre et al., 1990b; Wetmore et al., 1990; Oppenheim, 1991). Besonderes Interesse gilt bis heute der Fragestellung, ob und wie Neurotrophine an neuronaler Regeneration und funktionellen Heilungsprozessen nach einer Verletzung beteiligt sind (Caroni, 1998; Bähr, 2000; Behar et al., 2000; Goldberg und Barres, 2000). Im PNS wurde bereits gezeigt, daß Neurotrophine sowohl *in vitro* als auch *in vivo* einen fördernden Einfluß auf axonale Regenerationsprozesse ausüben (Tucker et al., 2001; Markus et al., 2002; Boyd und Gordon, 2003) und daß die Neurotrophin-Expression nach Läsion hochreguliert wird. Demgegenüber ist axonale Regeneration im ZNS nur sehr begrenzt möglich. Dennoch haben die experimentellen Untersuchungen der letzten Jahre gezeigt, daß auch im ZNS Regeneration induziert werden kann. Am *in vitro* Modell der retinalen Ganglienzellen wurde nachgewiesen, daß die Neurotrophine sowohl axonales als auch dendritisches Wachstum stimulieren (Cohen et al., 1994; Sawai et al., 1996; Lentz et al., 1999; McAllister et al., 1999; Goldberg et al., 2002). In organotypischen entorhino-hippokampalen Schnittkulturen konnte gezeigt werden, daß NT-4 und andere Wachstumsfaktoren die Regeneration durchtrennter entorhinaler Fasern in Abhängigkeit vom Alter der Tiere sowie vom Alter der Kulturen fördern können (Prang et al., 2001). Auch *in vivo* konnte ein Neurotrophin-vermittelter, fördernder Einfluß auf regeneratives axonales Wachstum nach einer Rückenmarksläsion nachgewiesen werden

(Bregman et al., 1997). Zusätzlich wird die Rolle der Neurotrophine bei neuroinflammatorischen Erkrankungen, wie der Multiplen Sklerose (MS), intensiv analysiert (Althaus, 2004).

## **1.1.4 Die Hippokampusformation**

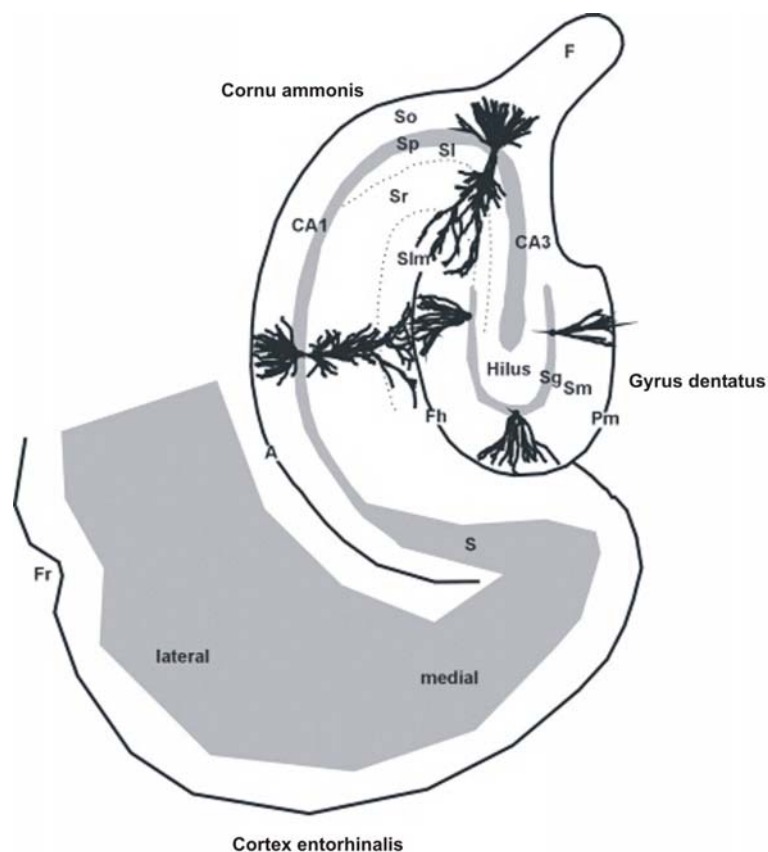
### **1.1.4.1 Aufbau und Funktion der Hippokampusformation**

Die Hippokampusformation dient als ein weit verbreitetes Modellsystem dazu, die Entstehung neurodegenerativer Erkrankungen sowie neuroprotektive und neuroregenerative Prozesse zu untersuchen. Die Gründe dafür sind zum einen die klinische Relevanz, da sich neuronale Schädigungen sehr früh in diesem Hirnareal zeigen und zu unwiderruflichen kognitiven und amnestischen Ausfällen führen können. Zum anderen weist sie eine relativ einfache Zytoarchitektur auf, die charakteristische Eigenschaften der kortikalen Organisation beinhaltet (Cotmann et al., 1990; Stoppini et al., 1991; Frotscher et al., 1995b).

Die Hippokampusformation ist eine phylogenetisch sehr alte Hirnstruktur, die sich aus dem Archipallium entwickelt hat und dem limbischen System zugeordnet wird. Sie ist in beiden Temporallappen der Großhirnhemisphären lokalisiert und erstreckt sich dabei längs vom septalen Kerngebiet des basalen Vorderhirns bis zum ventrokaudalen Pol des Temporallobens. Zur Hippokampusformation gehören der Hippokampus mit den Bereichen Gyrus dentatus, Cornu ammonis, Subiculum, Präsubiculum und Parasubiculum sowie der sich daran angrenzende sechsschichtige entorhinale Kortex. Dieser wird vom Isokortex durch die rhinale Fissur abgegrenzt (Amaral und Witter, 1989).

Die zellulären Elemente des Hippokampus zeigen eine spezielle Anordnung und weisen ebenso sehr spezielle Funktionen auf. Man unterscheidet generell Prinzipalneurone, die ein dichtes Zellband bilden und aus exzitatorischen Neuronen mit langen axonalen Fasern bestehen, von Nichtprinzipalneuronen bzw. Interneuronen, die nicht exzitatorisch und nur lokal projizierend sind. Ein Querschnitt durch den Hippokampus senkrecht zu seiner Längsachse zeigt auffällig zwei u-förmig gebogene, ineinandergreifende Hirnwindungen, den Gyrus dentatus (DG) und das Cornu ammonis (CA) (Abb. 1.1). Zum Gyrus dentatus gehören die am nächsten zur hippokampalen Fissur gelegene Molekularschicht, die sich daran anschließende Körnerzellschicht und der Hilus. Die zellarme Molekularschicht gliedert sich in eine äußere (OML), eine mittlere (MML) und eine innere (IML) Schicht und stellt eine wichtige Verbindungsstelle für Neurone innerhalb und außerhalb des Hippokampus dar. Die Prinzipalneurone des DG werden als Körnerzellen bezeichnet. Diese Neurone sind klein und in einer schmalen Schicht angeordnet, wobei die Dendriten ausschließlich apikal in der

Molekularschicht lokalisiert sind (Amaral und Witter, 1995). Die Körnerzellen sind von Korbzellen (Interneurone) umgeben. Diese bilden hemmende Synapsen um die Zellkörper der Körnerzellen, treten im Zellverband oder vereinzelt auf und sind mit speziellen kalziumbindenden Proteinen (Pavalbumin, Kalbindin oder Kalretinin) kolokalisiert. Die Körnerzellschicht umfaßt eine polymorphe Schicht, den Hilus, in der in geringer Dichte die Somata von inhibitorischen Interneuronen und exzitatorischen Mooszellen liegen. Im Cornu ammonis sind die Körnerzellen durch Pyramidenzellen ersetzt, welche ein schmales Band von großen glutamatergen Neuronen mit basalen und apikalen Dendriten bilden. Aufgrund der unterschiedlichen Morphologie und Verschaltung werden diese Prinzipalneurone in drei Regionen, CA1 bis CA3, eingeteilt. Während sich in der CA3-Region die apikalen Dendriten direkt nach dem Abgang vom Soma teilen, gabeln sie sich in der CA1-Region nicht (Vinogradova, 2001).



**Abbildung 1.1:** Schematische Darstellung der Hippokampusformation in einem horizontalen Schnitt durch den temporalen Pol. Graue Flächen beinhalten vor allem Zellkörper. Weiße Flächen kennzeichnen die Bereiche, in denen hauptsächlich Zellfortsätze vorkommen. Im Gyrus dentatus und im Cornu ammonis ist beispielhaft die Morphologie der Dendriten von Projektionsneuronen dargestellt. **A** Alveus, **CA1** Cornu ammonis Region 1, **CA3** Cornu ammonis Region 3, **F** Fimbria, **Fh** Fissura hippocampi, **Fr** Fissura rhinalis, **Pm** Pia mater, **S** Subiculum, **Sg** Stratum granulosum, **Sl** Stratum lucidum, **Slm** Stratum lacunosum moleculare, **Sm** stratum moleculare, **So** Stratum oriens, **Sp** Stratum pyramidale, **Sr** Stratum radiatum.



Die Funktion der Hippokampusformation besteht unter anderem in der Beteiligung an Lernvorgängen und an der Gedächtnisbildung. Im Vordergrund stehen hierbei Verbindungen und Schaltkreise, die für die Weiterleitung von Informationen von einer kurzfristigen zu einer permanenten Speicherung verantwortlich sind. Verletzungen dieser Bereiche haben erhebliche Störungen der Merkfähigkeit zur Folge. Neue Informationen können nicht mehr länger als einige Wochen oder Monate behalten werden. Dagegen bleiben alte, bekannte Dinge im Gedächtnis erhalten, da sie nicht mehr vom Kurzzeit- in das Langzeitgedächtnis überführt werden müssen. Der Hippokampus besitzt drei große synaptische Schaltstellen, wobei jede von ihnen Langzeitpotenzierungen (LTP) erzeugen kann. Von diesem Vorgang nimmt man an, daß er am Speicherungsprozeß beteiligt ist. Eine alternative Hypothese zur Funktion des Hippokampus besagt, daß dort keine Speicherung von Informationen stattfindet, sondern daß der Hippokampus lediglich die Speicherung von der im inferior-temporalen Kortex verarbeiteten Informationen an andere Orte des Gehirns vermittelt. Der Hippokampus ist also entweder ein Zwischenlager des Langzeitgedächtnisses oder ein Hilfssystem, das für die Abspeicherung von Informationen in anderen Bereichen des Gehirns notwendig ist (Kandel et al., 1996). Neben dieser Funktion für die Gedächtnisbildung wird die Hippokampusformation als Bestandteil des limbischen Systems mit endokrinen, viszeralen und emotionalen Vorgängen in Zusammenhang gebracht (Trepel, 2003).

#### **1.1.4.2 Afferenzen und Efferenzen der Hippokampusformation**

Am Seitenventrikel des Hippokampus angrenzend befindet sich der sogenannte Alveus. Diese Lamina beinhaltet axonale Fortsätze efferenter und afferenter Systeme. Der Alveus setzt sich in der Fimbria hippocampi fort, die in die Commissura fornicis übergeht. Das Fimbria-Fornix-System verbindet den Hippokampus sowohl ipsi- als auch kontralateral mit kortikalen und subkortikalen Gebieten (Zilles und Rehkämper, 1998).

Die wichtigste entorhinale Projektion zum Hippokampus ist der Tractus perforans. Dieser Fasertrakt stellt eine der Hauptafferenzen des Hippokampus dar und wurde erstmals von Ramón y Cajal (1901) beschrieben. Der Tractus perforans entspringt im entorhinalen Kortex aus den Schichten II und III und seine Axone enden auf den Körnerzellen im Hilus des Gyrus dentatus, wobei die Axone vom medialen entorhinalen Kortex in die MML, vom lateralen entorhinalen Kortex in die OML projizieren, sowie im Stratum lacunosum-moleculare der CA1-Region (Insausti et al., 1997). Die Axone der Körnerzellen (Moosfasern) bilden nun ihrerseits ein Faserbündel und laufen durch den Hilus, wo sie zahlreiche Kollateralen an Interneurone und Mooszellen abgeben, zu den Pyramidenzellen in der CA3-Region.

Schließlich entspringen aus den Pyramidenzellen der CA3-Region erregende Axonkollaterale (Schaffer-Kollaterale) und ziehen zu den Pyramidenzellen der CA1-Region. Die Pyramidenzellen in dieser Region projizieren über das Subiculum zurück zum entorhinalen Kortex in die tiefer gelegenen Schichten V und VI (Amaral und Witter, 1989). Diese Verbindungen werden auch trisynaptischer Schaltkreis genannt (Andersen et al., 1971). Neben den Afferenzen aus dem ipsilateralen entorhinalen Kortex erreichen auch kontralaterale entorhinale Fasern die äußere Molekularschicht des Gyrus dentatus. Zusätzlich zu diesen entorhinalen Afferenzen existieren assoziative und kommissurale Fasersysteme. Die ipsilateralen Projektionen von CA3 nach CA3, von CA3 in den Gyrus dentatus sowie vom Hilus in die innere Molekularschicht des Gyrus dentatus werden als Assoziationsfasern bezeichnet. Die kontralateral nach CA1-3 und dem Gyrus dentatus ziehenden Fasern werden kommissurale Projektionen genannt. Weitere Afferenzen in die hippocampale Formation stammen aus dem medialen Septum und terminieren in allen Regionen des Hippokampus und der Molekularschicht des DG.

Über den Fornix verlassen die Efferenzen den Hippokampuskomplex. Wichtig ist hierbei die efferente Verbindung vom Subiculum zum Corpus mamillare im kaudalen Teil des Hippokampus. Vom Corpus mamillare zieht dann der Fasciculus mamillothalamicus zum Nucleus anterior des Thalamus, der als spezifischer Thalamuskern für limbische Kortextbereiche wiederum in den Gyrus cinguli projiziert. Der Gyrus cinguli sendet Fasern zurück zum Hippokampus, wodurch sich der Kreis schließt. Das System Hippokampus – Corpus mamillare – Nucleus anterior – hinterer Gyrus cinguli wird unter dem Begriff Papez-Neuronenkreis zusammengefasst. Das Corpus mamillare ist über den Tractus mamillogementalis und Pedunculus mamillaris reziprok mit limbischen Kerngebieten, die in der Formatio reticularis des Mesencephalons liegen, verbunden. Eine weitere wichtige Efferenz des Hippokampus gelangt über den präkommissuralen Fornix zum Septum (Zilles und Rehkämper, 1998; Trepel, 2003).

### **1.1.4.3 Anwendung der Hippokampusformation**

Die entorhino-hippocampale Formation stellt aufgrund ihrer relativ einfachen und detailliert beschriebenen Zytoarchitektur und Konnektivität ein interessantes und geeignetes Modell für *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen zur Klärung neurowissenschaftlicher Fragestellungen dar. Im folgenden sollen ein *in vitro* und ein *in vivo* Modell, die in dieser Arbeit ihre Anwendung fanden, näher vorgestellt werden.

### *Die organotypische entorhino-hippokampale Schnittkultur*

Organotypische Schnittkulturen stellen ein weitverbreitetes *in vitro* Modell für Untersuchungen sowohl neurodegenerativer als auch neuroprotektiver und neuroregenerativer Prozesse nach einer Verletzung des ZNS dar (Heimrich und Frotscher, 1993; Gähwiler et al., 1997; Stoppini et al., 1997; Prang et al., 2001; Noraberg et al., 2005).

Es konnte gezeigt werden, daß es bereits 6 bis 9 Tage nach der Präparation auch in Bezug auf nicht-neuronale Zellen zu einer Wiederherstellung organotypischer Bedingungen in den inneren Zonen der Hirnschnitte kommt (Hailer et al., 1996). Explantationsbedingt finden sich zunächst noch amöboide, aktivierte Mikrogliazellen. Diese zeigen jedoch nach 9 Tagen in der intakten Schnittkultur eine ramifizierte Mikroglia. Außerdem weist die entorhino-hippokampale Formation zu diesem Zeitpunkt eine deutliche Intaktheit des Tractus perforans auf. Die Schnittkulturen entsprechen somit in ihrem Verhalten unverletztem Gewebe und eignen sich bevorzugt zur Untersuchung von Neuroinflammation und Neurodegeneration.

Werden die organotypischen Hirnschnitte jedoch unmittelbar nach ihrer Präparation zu Untersuchungszwecken herangezogen, stellen sie als Akutschnitte ein geeignetes Modell für einen durch die Präparation mechanisch gesetzten Primärschaden im Hirngewebe dar. Die Schnittkulturen eignen sich dann zur Untersuchung von Neuroprotektion und Neuroregeneration. Während unter Neuroprotektion eine Verminderung des neuronalen Schadens oder des Zelltods verstanden wird, beziehen sich neuroregenerative Vorgänge auf die Wiederherstellung bereits geschädigter neuronaler Zellen und ihrer Fortsätze. Das reaktive Aussprossen intakter Axone trägt ebenfalls zur Reorganisation des geschädigten Hirngewebes bei und wird daher oft als funktionelle Regeneration bezeichnet (Frotscher et al., 1997). Zur Analyse des axonalen Auswachsens erfolgt die präparative Trennung von entorhinalem Kortex und Hippokampus, wodurch gleichzeitig eine gezielte Durchtrennung des Tractus perforans erreicht wird. Das axonale Auswachsen kann dann an den entorhinalen Schnittkulturen untersucht werden.

### *Die entorhinale Kortex-Läsion*

Die entorhinale Kortex-Läsion (ECL) stellt ein gut etabliertes *in vivo* Modell zur Analyse von postläsionalen Veränderungen im ZNS dar (Lynch et al., 1975; Frotscher et al., 1997). Sie weist außerdem Parallelen zur Reaktion des menschlichen ZNS auf die Degeneration von Neuronen bei der Alzheimerschen Erkrankung auf (Hyman et al., 1984).

Initial wird bei einer ECL der Tractus perforans, die entorhinale axonale Projektion zum Gyrus dentatus, durchtrennt. Dies führt zu einer anterograden Degeneration der Axone im

Terminationsgebiet des Tractus perforans, d.h. in der MML und der OML des Gyrus dentatus sowie im Stratum lacunosum-moleculare der CA1- und CA3-Region (Lynch et al., 1975; Jensen et al., 1994). Daraus resultiert ein massiver Verlust von 80 bis 90 % der Synapsen in der äußeren Molekularschicht (Steward und Vinsant, 1983; Fagan und Gage, 1994). Infolge der ECL kommt es außerdem zu einer mikroglialen und astroglialen Reaktion in der deafferenzierten OML des Gyrus dentatus (Gehrmann et al., 1991; Steward et al., 1993; Deller et al., 1997; Hailer et al., 1999; Bechmann und Nitsch, 2000). Mikrogliazellen ändern ihre typische ramifizierte Form, werden amöboid und migrieren in das denervierte Gebiet (Gall et al., 1979; Bechmann und Nitsch, 2000). Während es postläsional sehr früh zur Mikrogliareaktion kommt, erfolgt die Aktivierung von Astrozyten verzögert (Gall et al., 1979; Jensen et al., 1994). Sie weisen eine Verdickung ihrer Fortsätze und eine gesteigerte Immunreaktivität für Glial fibrillary acidic protein (GFAP), einem Markerprotein für Astrozyten, auf. Diese sogenannte reaktive Gliose wird in der OML drei Tage nach Läsion beobachtet und erreicht ihren Höhepunkt vier bis sieben Tage nach Läsion (Lynch et al., 1975; Rose et al., 1976; Gage et al., 1988; Jensen et al., 1994). Entorhinale Deafferenzierungen resultieren außerdem in einer gesteigerten glialen Expression von Wachstumsfaktoren und Zytokinen im Hippokampus (NGF, BDNF, bFGF, IGF, TGF- $\beta$ 1; Kar et al., 1993; Lapchak et al., 1993; Morgan et al., 1993). Die Expression dieser Faktoren ist ebenfalls selektiv in der Deafferenzierungszone konzentriert. Innerhalb von 30 Tagen nach Läsion werden die degenerierten Synapsen zu 70 % des Ausgangswertes durch Aussprossen (reaktives Sprouting) nicht geschädigter Axone ersetzt (Steward und Vinsant, 1983).

## **1.2      Immunsystem**

### **1.2.1    Allgemeine Einführung**

Das Immunsystem verteidigt den Organismus gegen Infektionen. Die angeborene Immunität dient der ersten Abwehr, kann jedoch Krankheitserreger nicht spezifisch erkennen und daher auch keinen gezielten Schutz gegen eine erneute Infektion bieten. Die erworbene (adaptive) Immunität basiert hingegen auf der klonalen Selektion von Lymphozyten mit hochspezifischen Rezeptoren, welche es dem Immunsystem ermöglichen, die meisten körperfremden Antigene zu erkennen. Diese antigenspezifischen Lymphozyten vermehren sich und differenzieren zu Effektorzellen, die aufgrund ihres breiten Spektrums an Effektormechanismen Krankheitserreger vernichten. Die adaptive Immunantwort kann jedoch nicht nur Krankheitserreger beseitigen, sondern führt auch zur Ausbildung eines

immunologischen Gedächtnisses, welches bei einer erneuten Infektion eine schnellere und effizientere Reaktion ermöglicht. Die Regulation dieser Immunantworten, d.h. sie zu unterdrücken, wenn sie unerwünscht sind, oder sie zur Vorbeugung einer Infektionskrankheit zu stimulieren, ist ein wichtiges Ziel der medizinischen Forschung (Janeway, 1997).

## 1.2.2 Entwicklung und Aktivierung der T-Lymphozyten

Immunreaktionen werden durch Leukozyten, die ihren Ursprung im Knochenmark haben, vermittelt. Während sich aus der myeloiden Vorläuferzelle die polymorphkernigen Granulozyten und die Makrophagen entwickeln, gehen aus der allgemeinen lymphatischen Vorläuferzelle die Lymphozyten hervor. Dabei werden zwei Hauptgruppen von Lymphozyten unterschieden: B-Lymphozyten, die im Knochenmark reifen und nach ihrer Aktivierung zu antikörperfreisetzenden Plasmazellen differenzieren und T-Lymphozyten, deren Reifung im Thymus stattfindet. B-Zellen sind durch ihre antikörperbildende Eigenschaft an der Beseitigung extrazellulärer Krankheitserreger beteiligt und für die humorale Immunantwort verantwortlich. T-Lymphozyten, die in CD8<sup>+</sup> zytotoxische T-Zellen und CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen unterteilt werden, sind an der Bekämpfung intra- und extrazellulärer Krankheitserreger beteiligt und deshalb sowohl für die humorale als auch für die zellvermittelte adaptive Immunantwort von entscheidender Bedeutung.

Bei ihrer Entwicklung im Thymus durchlaufen die T-Lymphozyten eine positive und eine negative Selektion. Während die positive Selektion sicherstellt, daß alle reifen T-Zellen auf Fremdan Antigene antworten können, die von Selbst-MHC-Molekülen auf antigenpräsentierenden Zellen vorgezeigt werden, eliminiert die negative Selektion autoreaktive Zellen. Nach ihrer Reifung verlassen die Lymphozyten den Thymus und zirkulieren kontinuierlich zwischen Blut, Gewebe und peripheren lymphatischen Organen, zu denen Lymphknoten, Milz und die lymphatische Gewebe der Schleimhäute gehören. Tritt in der Peripherie des Körpers eine Infektion auf, nehmen phagozytierende Zellen große Mengen der Antigene auf und wandern vom Infektionsherd durch die afferenten Lymphgefäße in die peripheren lymphatischen Organe. Dort treffen sie auf naive T-Lymphozyten, denen sie die Antigene präsentieren. Die T-Zellen erkennen die Antigene spezifisch, werden aktiviert und gelangen nach anschließender Proliferation und Differenzierung zu Effektorzellen über die Lymphgefäße wieder in den Blutkreislauf zurück.

Diese Aktivierung naiver T-Zellen in den peripheren lymphatischen Organen ist der entscheidende erste Schritt in der adaptiven Immunantwort. Für eine vollständige Aktivierung der T-Zellen mit klonaler Proliferation und Differenzierung sind zwei Signale notwendig. Das

erste Signal erhält eine T-Zelle über ihren spezifischen T-Zell-Rezeptor, welcher Antigene in Form von Peptidfragmenten erkennt (Auchincloss und Sultan, 1996). Diese Peptide sind an Haupthistokompatibilitätskomplexe (MHC) gebunden, wobei man zwei Klassen von MHC-Molekülen unterscheidet. MHC Klasse I-Moleküle werden auf allen kernhaltigen Zellen exprimiert und präsentieren den zytotoxischen CD8+ T-Zellen zytosolische Peptide, was zur Eliminierung der infizierten Zellen führt. Die MHC Klasse II-Moleküle kommen hingegen vorwiegend auf der Oberfläche von antigenpräsentierenden Zellen (APCs), aber auch auf aktivierten Endothelzellen vor. Sie präsentieren den CD4+ T-Helferzellen Peptide von Krankheitserregern, die sich in Vesikeln von Makrophagen befinden oder von B-Zellen aufgenommen wurden, was eine Aktivierung dieser Zellen zur Folge hat. Während die Aktivierung der Makrophagen zur Zerstörung der intravesikulären Krankheitserreger führt, werden die B-Zellen zur Proliferation und Antikörperbildung angeregt, was wiederum zur Bekämpfung extrazellulärer Krankheitserreger beiträgt. Als professionelle APCs fungieren hierbei dendritische Zellen, B-Lymphozyten und Makrophagen. Das zweite, nicht-antigen-spezifische, kostimulatorische Signal erhält die T-Zelle von derselben antigenpräsentierenden Zelle, auf der sie ihr spezifisches Antigen erkennt. Am besten charakterisiert ist die Wechselwirkung zwischen den Molekülen B7.1 und B7.2 auf den APCs und dem entsprechenden Rezeptor CD28 auf den T-Zellen. Weitere kostimulatorische Signale resultieren aus den Interaktionen zwischen CD40/CD40L sowie zwischen den Adhäsionsmolekülen LFA-1 und ICAM-1/-2/-3. Sind beide Bedingungen, Rezeptorbindung (1. Signal) und Kostimulation (2. Signal), erfüllt, kommt es zur Aktivierung der T-Zellen. Ihre anschließende Proliferation und Differenzierung wird dabei durch den Wachstumsfaktor Interleukin-2 (IL-2) über einen autokrinen Wirkmechanismus verstärkt (Waldmann, 1993; Shannon et al., 1995). Bleibt jedoch das zweite kostimulatorische Signal aus, produzieren diese T-Zellen kein IL-2, sondern werden anergisch. Durch die Expression von regulatorisch wirkenden kostimulatorischen Molekülen, wie z.B. CTLA-4, kann die Immunantwort der T-Lymphozyten kontrolliert werden. So besitzt der CTLA-4 Rezeptor auf den T-Zellen eine höhere Affinität zu B7.1 und B7.2 als CD28 und verhindert auf diesem Weg als negativer Regulator eine chronische Stimulation der T-Zellen (Perez et al., 1997).

### **1.2.3 Effektorfunktionen der T-Lymphozyten**

Nach ihrer Differenzierung zu Effektorzellen verlassen die aktivierten T-Zellen die peripheren lymphatischen Organe und gelangen über Chemotaxis im Blut zu den Orten der Infektion. Die CD8+ zytotoxischen T-Zellen sind in der Lage, infizierte Zellen zu töten. Welche Funktion

jedoch eine CD4<sup>+</sup> T-Zelle erfüllt, hängt von ihrem ersten Kontakt mit einem Antigen ab. Es wird davon ausgegangen, daß sich die proliferierenden CD4<sup>+</sup> T-Zellen in einen Zelltyp umwandeln, der als Th0 bezeichnet wird. Die unreife Th0-Zelle entwickelt sich dann entweder zu einer Th1- oder zu einer Th2-Zelle, die eine Vielzahl von Funktionen ausüben können. Die wichtigsten sind die Aktivierung von Makrophagen durch Th1-Zellen (zellvermittelte Immunität) sowie die Aktivierung von B-Zellen sowohl durch Th1- als auch Th2-Zellen, damit diese spezifische Antikörper für die humorale Immunantwort bilden können (Janeway, 1997). Diese Effektorzellen haben nur eine begrenzte Lebensdauer. Wenn das Antigen nicht mehr vorhanden ist, durchlaufen die meisten antigenspezifischen T-Zellen den programmierten Zelltod (Apoptose). Einige Zellen können jedoch überleben und bilden somit die Grundlage des immunologischen Gedächtnisses, das eine schnellere und wirksamere Reaktion auf eine erneute Infektion mit demselben Krankheitserreger ermöglicht. Die Gedächtniszellen, wie auch die Effektorzellen, zeichnen sich insbesondere dadurch aus, daß sie bei einem späteren Zusammentreffen mit ihrem spezifischen Antigen keine Kostimulation mehr benötigen.

### **1.2.3.1 Zytokine und Zytokin-Rezeptoren**

T-Effektorzellen beeinflussen ihre Zielzellen durch die gerichtete Freisetzung und/oder Expression von Effektormolekülen. Hierbei werden zwei große Gruppen von Effektormolekülen unterschieden: Zytotoxine, die in speziellen lytischen Granula gespeichert und von zytotoxischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen freigesetzt werden und Zytokine sowie verwandte membran-gebundene Proteine, die von allen T-Effektorzellen synthetisiert werden und die entscheidenden Mediatoren der CD4<sup>+</sup> T-Effektorzellen sind. Sie können aber auch von anderen Zellen, nicht nur denen des Immunsystems, freigesetzt werden. Im folgenden wird jedoch ausschließlich auf die von CD4<sup>+</sup> T-Zellen produzierten Zytokine eingegangen.

Zytokine sind kleine, lösliche oder membrangebundene Proteine, die von einer Zelle gebildet werden und das Verhalten oder die Eigenschaften dieser oder einer anderen Zelle verändern. Hierbei kommt es durch Bindung der Zytokine an spezifische Rezeptoren der Zielzellen zur Vermittlung der Effektorfunktionen. Einerseits wirken Zytokine pleiotrop, d.h. ein Zytokin kann an verschiedene Rezeptoren binden und somit unterschiedliche Funktionen ausüben. Andererseits wirken Zytokine aber auch redundant, d.h. unterschiedliche Zytokine können an denselben Rezeptor binden und somit die gleichen Funktionen ausüben. Die Zytokine werden aufgrund ihrer Struktur in vier verschiedene Familien unterteilt: die Hämatopoetine, Interferone, Chemokine und die Mitglieder der Tumornekrosefaktor (TNF)-Familie.

Die Proteine der Tumornekrosefaktoren werden auch als membrangebundene Effektormoleküle bezeichnet. Die Zytokin-Rezeptoren können aufgrund genetischer, struktureller und funktioneller Ähnlichkeiten ebenfalls in entsprechende Familien eingeteilt werden. In Tab. 1.2 sind die wichtigsten T-Zell-Zytokine, ihre Funktionen sowie die entsprechenden Rezeptoren, an die sie binden, zusammengefaßt.

<b>Familie</b>	<b>Zytokin</b>	<b>Produzierende T-Zellen</b>	<b>Rezeptoren</b>	<b>Wirkungen</b>
Hämatopoetine	<b>IL-2</b>	Th1	CD25 ( $\alpha$ )	Proliferation von T-Zellen
	<b>IL-3</b>	Th1, Th2	CD123	Wachstumsfaktor für Vorläufer von hämatopoetischen Zellen
	<b>IL-4</b>	Th2	CD124	Aktivierung von B-Zellen; erhöhte MHC II-Expression; Wachstum und Überleben von T-Zellen; anti-inflammatorisch
	<b>IL-5</b>	Th2	CD125	Wachstum und Differenzierung von eosinophilen Granulozyten
	<b>IL-6</b>	Th2	CD126, CD130	Wachstum und Differenzierung von T- und B-Zellen; Proteinproduktion der akuten Phase
	<b>IL-13</b>	Th2	IL-13R	Wachstum und Differenzierung der B-Zellen; Inhibitor von Makrophagenfunktionen
	<b>GM-CSF</b>	Th1, Th2	CD116	Wachstum und Differenzierung von Granulozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen
Interferone	<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Th1	CD119	Aktivierung von Makrophagen; erhöhte MHC I/II-Expression; pro-inflammatorisch
TNF-Familie	<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Th1, Th2	p55, p75, CD120a, CD120b	Aktivierung von Makrophagen; pro-inflammatorisch
	<b>TNF-<math>\beta</math></b>	Th1	p55, p75, CD120a, CD120b	Aktivierung von Makrophagen; zytotoxisch
	CD40-L	Th1, Th2	CD40	Aktivierung von B-Zellen und Makrophagen
	Fas-L	Th1	Fas (CD95)	Apoptose



nicht zugeordnet	<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Th1, Th2		Hemmung des Zellwachstums; anti-inflammatorisch
	<b>IL-10</b>	Th2		Inhibitor von Makrophagenfunktionen

**Tabelle 1.2:** Übersicht über die wichtigsten Funktionen gut charakterisierter Zytokine und ihre Rezeptoren.

Th1-Zellen unterscheiden sich somit in ihrem Zytokinmuster von den Th2-Zellen, worauf die unterschiedlichen Funktionen und Wirkungen im Rahmen entzündlicher Erkrankungen zurückzuführen sind. In Tab. 1.3 sind diese speziellen Unterschiede noch einmal dargestellt. Besonders hervorzuheben sind hierbei IFN- $\gamma$ , das Markerzytokin der Th1-Zellen, welches die wichtigste Rolle in der Makrophagenaktivierung einnimmt und IL-4, das Markerzytokin der Th2-Zellen, das an der B-Zell-Aktivierung beteiligt ist.

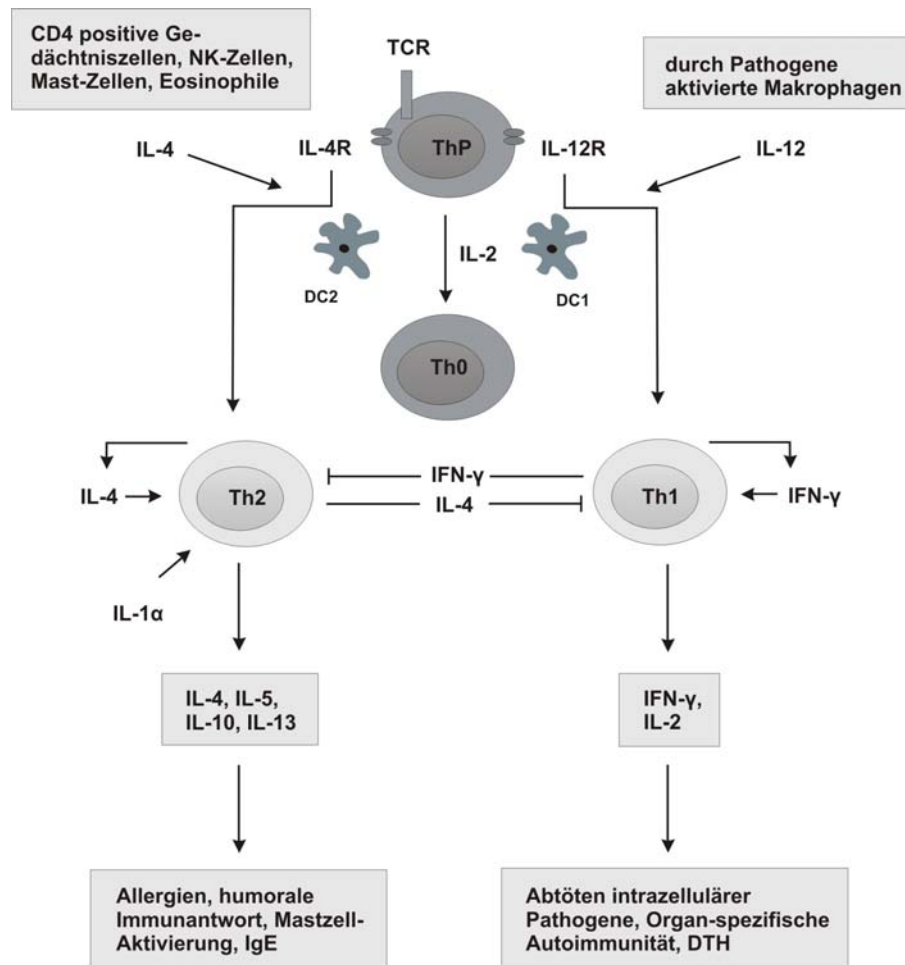
Th1-Zellen		Th2-Zellen	
Makrophagen-aktivierende Effektormoleküle	andere	B-Zell-aktivierende Effektormoleküle	andere
IFN- $\gamma$	IL-3	IL-4	IL-3
GM-CSF	TNF- $\beta$	IL-5	GM-CSF
TNF- $\alpha$	IL-2	CD40-L	IL-10
CD40-L			TGF- $\beta$
Fas-L			

**Tabelle 1.3:** Effektormoleküle der Th1- und Th2-Zellen.

### 1.2.3.2 Zytokinmilieu der Th1- und Th2-Lymphozyten

Die zwei Subtypen von T-Helferzellen, Th1 und Th2, wurden basierend auf ihrer unterschiedlichen Zytokinproduktion erstmals von Mosmann und Coffman beschrieben (1986) und bilden eine Grundlage für das Verständnis verschiedener Krankheitspathogenesen. Welche Mechanismen jedoch zur Ausbildung einer Th1- bzw. Th2-Immunantwort führen, ist bisher nicht vollständig geklärt. Da die Entscheidung, Th1- oder Th2-Zellen zu werden, aber bereits in den Anfangsstadien der Immunantwort fällt, ist vor allem die Fähigkeit der Pathogene, die Zytokinproduktion durch Zellen des nicht-angeborenen, nicht-adaptiven Immunsystems zu stimulieren, für die Form der nachfolgenden adaptiven Antwort

entscheidend. Einen großen Einfluß auf die funktionelle Differenzierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen scheinen dabei das Zytokinmilieu, in welchem die T-Zell-Aktivierung stattfindet, die Konzentration des Antigens, die beteiligten kostimulatorischen Faktoren sowie die Art der APCs, aber auch die Affinität des T-Zell-Rezeptors zu dem Peptid/MHC-Ligand zu haben (Abbas et al., 1996; Romagnani, 1997). So stimulieren große Peptidmengen, die eine hohe Dichte auf der Oberfläche einer antigenpräsentierenden Zelle erreichen und stark an den T-Zell-Rezeptor binden, bevorzugt eine Th1-Immunantwort. Hingegen ruft die Präsentation von Peptiden in niedriger Dichte mit schwacher Bindung an den T-Zell-Rezeptor eher eine Th2-Immunantwort hervor (Janeway, 1997). Außerdem konnte gezeigt werden, daß einige Th1- und Th2-Zytokine eine autokrine Wirkung als Wachstumsfaktoren auf die eigene Zellpopulation ausüben und gleichzeitig eine Inhibition des anderen Zellsubtyps bewirken. So produzieren Th1-Zellen beispielsweise IFN- $\gamma$ , welches autokrin die Th1-Zellen zur weiteren Proliferation anregt, die Proliferation und Differenzierung der Th2-Zellen hingegen hemmt. Im Gegensatz dazu stimuliert das Th2-Zytokin IL-4 die Proliferation der eigenen Zellpopulation, wirkt der der Th1-Zellen jedoch entgegen (Gajewski et al., 1988). Das von aktivierten Makrophagen oder dendritischen Zellen gebildete IL-12 spielt im Kontext mit der Aktivierung des T-Zell-Rezeptors eine entscheidende Rolle bei der Ausbildung einer Th1-Immunantwort (Hsieh et al., 1993; Rincon et al., 1997). Dagegen ist das von Gedächtnis-T-Zellen, NK-Zellen, Mastzellen und eosinophilen Granulozyten gebildete IL-4 essentiell für die Entwicklung antigenspezifischer Th2-Zellen aus naiven Vorläuferzellen (Swain et al., 1990; Abbas et al., 1993; Coffman und Von der Weid, 1997). Neuere Untersuchungen zeigen jedoch, daß die Entwicklung einer Th2-Immunantwort *in vivo* in kompletter Abwesenheit von IL-4 möglich ist (Finkelmann et al., 2000; Ouyang et al., 2000). Inwieweit Th2-Zytokine regulativ oder suppressiv auf die Zytokin-Expression der Th1-Zellen und umgekehrt einwirken können und welche anderen Zellpopulationen daran beteiligt sind, wird zum heutigen Zeitpunkt kontrovers diskutiert und bleibt deshalb noch zu klären. Abb. 1.2 gibt einen Überblick über die Differenzierung einer Vorläufer-T-Helferzelle ThP bzw. einer aktivierten T-Helferzelle Th0 in die Subtypen Th1 und Th2 und den daran beteiligten Faktoren.



**Abbildung 1.2:** Th1- und Th2- Immunantwort verändert nach Liew, Nature Rev Immunol, 2002. **ThP** Vorläufer T-Helferzelle, **Th0** aktivierte, nicht-polarisierte T-Helferzelle, **TCR** T-Zell-Rezeptor, **DC** dendritische Zelle.

## 1.2.4 Autoimmunreaktionen

Infektionen, Verletzungen oder lokale Immunreaktionen können Entzündungsreaktionen verursachen. Diese Entzündungsreaktionen dienen dem Körper als Schutz gegen innere und äußere Angriffe. Ziel einer Entzündung ist es, den Körper in eine erhöhte Abwehrbereitschaft zu versetzen, was mit einer gesteigerten Immunantwort verbunden ist und letztendlich dazu führen soll, die Integrität des Organismus wieder herzustellen. Außerdem soll der Zerstörung des Gewebes entgegengewirkt und diese durch Reparaturprozesse wieder rückgängig gemacht werden. Im allgemeinen hat eine Entzündungsreaktion einen akuten Verlauf und kommt in einigen Tagen oder innerhalb weniger Wochen wieder zum Stillstand. Chronische Entzündungen treten dann auf, wenn das auslösende Agens nicht eliminiert werden kann, die Infektion also persistiert oder sich die Immunantwort in Form einer Autoimmunreaktion verselbständigt (Gemsa et al., 1991). Das Phänomen der Autoimmunität, das durch Paul Ehrlich als *horror autotoxicus* erstmals beschrieben wurde (1899), stellt eine Ausnahme des

Immunsystems bezüglich der Erkennung körperfremder/körpereigener Bestandteile dar. Unter einer Autoimmunreaktion versteht man eine erworbene Immunantwort, die gegen körpereigene Bestandteile gerichtet ist. Dies ist auch der Fall bei der Multiplen Sklerose (MS) und ihrem Tiermodell, der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE).

#### **1.2.4.1 Multiple Sklerose**

Die Multiple Sklerose (MS), eine Autoimmunerkrankung des ZNS, ist durch chronisch-entzündliche Entmarkungsherde im Hirngewebe gekennzeichnet. Der Begriff Sklerose stammt aus dem Griechischen und steht für Verhärtung, die als Folge der Entzündungsreaktionen in Form von Vernarbungen durch Gliazellen auftritt. Die Entzündungen können dabei an vielen Stellen im ZNS gleichzeitig auftreten, vorwiegend in der weißen Substanz, im Bereich der Sehnerven, der Ventrikel, im Hirnstamm und im oberen Teil des Rückenmarks. Die Läsionen sind charakterisiert durch ein entzündliches Zellinfiltrat, bestehend aus aktivierten autoreaktiven T-Zellen, B-Zellen, Plasmazellen und Mikrogliazellen/Makrophagen. Aktivierte Mikrogliazellen kommen hier als primär antigenpräsentierendes Element in Betracht (Benveniste, 1997a; Olson et al., 2001; Carson, 2002), da auf ihnen sowohl MHC II als auch kostimulatorische Moleküle, wie B7, in den Läsionsbereichen gefunden wurden (Ulvestad et al., 1994; De Simone et al., 1995). Welche Faktoren jedoch die entscheidenden ersten Impulse bei der Entstehung der Erkrankung geben, ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Fest steht, daß es infolge der Wechselwirkungen zwischen allen beteiligten immunkompetenten Zellen zur Erkennung von körpereigenen Myelin-komponenten, zur Präsentation dieser körpereigenen Antigene und somit letztendlich zur Phagozytose des degenerierten Myelins und/oder der geschädigten Oligodendrozyten kommt. Die entzündlichen Vorgänge führen zu einer Zerstörung der die Axone von Nervenzellen umgebenden Myelinscheiden bzw. zu einer Schädigung von Oligodendrozyten. Diese Demyelinisierung stellt das Hauptmerkmal der MS dar. Durch die fortschreitende Demyelinisierung kommt es schließlich zu einer gestörten neuronalen Signalübertragung und einem ausgeprägten Krankheitsbild mit Sensibilitäts- und Sehstörungen, Paresen und Ataxie. Die klinischen Symptome sind hierbei abhängig von der Lage der Entzündungsherde. Der Krankheitsverlauf der MS ist höchst variabel, weist jedoch meist einen schubartigen Charakter auf. Weltweit sind ca. 1,2 Millionen Menschen von der Krankheit betroffen. Dabei leiden doppelt so viele Frauen wie Männer an der MS, die normalerweise zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr auftritt. Sie kommt nicht in allen Ländern der Welt in gleicher Häufigkeit vor, sondern ist z.B. in Mittel- und Nordeuropa weiter verbreitet als in Südeuropa und Afrika.

Die eigentlichen Ursachen der MS sind bisher nicht bekannt. Vieles spricht dafür, daß nicht geklärte äußere Faktoren, z.B. eine Viruserkrankung, aber auch eine genetische Prädisposition einwirken und zusammentreffen müssen, damit MS ausgelöst wird. Fraglich ist auch, ob neuroinflammatorische Prozesse eine Folge der Krankheit sind, oder ob die Neuroinflammation erst zu der Erkrankung führt und somit letztendlich die Ursache ist (Perry, 1998).

Therapeutische Maßnahmen konzentrieren sich zum einen auf die symptomatische Behandlung sowie auf die Behandlung des akuten Schubes, zum anderen aber auch auf eine Langzeitbehandlung der Erkrankung. Im Vordergrund steht in erster Linie eine Verkürzung der Schubdauer. Als gesichert gilt dabei die anti-inflammatorische Wirksamkeit von Glukokortikoiden und des Adrenocorticotropen Hormons (ACTH), welches die Synthese und Ausschüttung der Glukokortikoide fördert. In der Langzeittherapie werden zur Verringerung der Schubfrequenz vor allem Immunsuppressiva, wie Azathioprin, eingesetzt. Weitere Anwendungen finden auch Interferon- $\beta$ , Glatirameracetat, Immunglobuline und Statine (Aharoni et al., 2000; Johnson und Baringer, 2001; Neuhaus et al., 2001; Aktas et al., 2003). Hierbei sind besonders die anti-inflammatorischen sowie spezifisch-immunsuppressiven Eigenschaften der Medikamente von Bedeutung. Die Hauptziele zukünftiger Therapien müssen jedoch die Verhinderung der Demyelinisierung und die Förderung der Remyelinisierung sowie die Vermeidung eines axonalen Schadens und gegebenenfalls dessen Reparatur sein.

#### **1.2.4.2 Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis**

In der Forschung zur Genese der MS spielt das Modell der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) eine bedeutende Rolle. In Abhängigkeit von den Peptiden des Myelins, welche für die Auslösung der EAE in Nagetieren verwendet werden (MBP, PLP, MOG, MAG), können Ähnlichkeiten zur Symptomatik der MS beobachtet werden. Durch Immunisierung mit MOG können die Läsionspathologie der MS mit Entzündung, Demyelinisierung und neuronalem Verlust reproduziert und verschiedene klinische Verläufe ausgelöst werden, die mit den unterschiedlichen Formen der MS korrelieren. Eine Immunisierung mit MBP weist hingegen lediglich monophasische Verläufe auf. Die Läsionen im ZNS sind hier zwar durch eine Infiltration von T-Zellen und Makrophagen charakterisiert, die MS-typische Demyelinisierung und der axonale Verlust treten jedoch nicht auf. Die genannten Parallelen haben die EAE zu einem weit verbreiteten Modell mit hoher Wertigkeit für die MS gemacht.

## **1.3 Wechselwirkungen zwischen zentralem Nervensystem und Immunsystem**

### **1.3.1 Immunprivileg des zentralen Nervensystems**

Das ZNS galt lange Zeit als immunprivilegiertes Organ. Es wurde angenommen, daß kein Austausch zwischen den Zellen des Immunsystems und des ZNS stattfindet (Medawar, 1948). Zum einen, weil es kein lymphatisches System innerhalb des Gehirns gibt, wobei die Arachnoidea und der Virchow-Robin-Raum eine Ausnahme bilden. Zum anderen, weil sich das Gehirn von anderen Organen durch das Vorhandensein einer sehr effektiven und anatomisch besonders gestalteten Blut-Hirn-Schranke unterscheidet. Bei Wirbeltieren mit geschlossenem Blutkreislaufsystem ist diese Barriere aus drei Schichten aufgebaut: den Endothelzellen der Kapillaren, der darunterliegenden Basalmembran und schließlich den Fortsätzen der Astrozyten. Die Endigungen dieser Fortsätze liegen eng aneinandergereiht an der Basalmembran der Hirnkapillaren und bilden so die äußere Schicht der Blut-Hirn-Schranke. Die eigentliche Filterschicht ist jedoch das innenliegende Endothel, das im Gegensatz zu den Kapillarendothelien anderer Organe kaum transzelluläre Poren besitzt und untereinander mit Tight junctions verbunden ist. Durch diese besonders dichten Interzellularverbindungen wird eine Barriere für alle sonst kapillargängigen Stoffe gebildet (Wehner und Gehring, 1990; Trepel, 2003). Lipidlösliche Substanzen können durch die Endothelschranke diffundieren. Metabolite, wie Glucose und einige Aminosäuren werden von Transportproteinen in der inneren und äußeren Endothelzellmembran durch die Blut-Hirn-Schranke geschleust. Serumbestandteile, Antikörper und immunkompetente Zellen aus der Körperperipherie haben dagegen nur einen extrem eingeschränkten Zutritt zum Hirngewebe (Lassmann et al., 1991; Fabry et al., 1994).

Zum heutigen Zeitpunkt kann gesagt werden, daß sowohl im physiologischen Zustand des Körpers als auch bei pathologischen Prozessen eine Kommunikation zwischen dem Immunsystem und dem ZNS stattfindet (Tabakman et al., 2004). Unter den peripheren T-Lymphozyten wurden auch ZNS-spezifische autoreaktive T-Zellen gefunden (Schlüsener und Wekerle, 1985; Anderson et al., 2000). Außerdem konnte gezeigt werden, daß aktivierte autoreaktive T-Zellen die Blut-Hirn-Schranke passieren (Wekerle et al., 1986; Hickey et al., 1991) und daß ein Abflußweg vom Gehirn in das Lymphsystem besteht (Cserr und Knopf, 1992). Trotz dieser Ergebnisse bleibt die Auffassung vom immunprivilegierten Status des ZNS erhalten, wobei dieses Privileg als Toleranz zu verstehen ist. Durch diese strenge Selektion der das ZNS überwachenden Immunzellen soll das Risiko einer Schädigung durch entzündliche Reaktionen so gering wie möglich gehalten werden. Dies ist im Bereich des

ZNS besonders wichtig, da sich bereits geringste Schädigungen nachteilig auswirken können und die Möglichkeiten der neuronalen Regeneration stark begrenzt sind (siehe 1.3.2). Auf der anderen Seite kann das Eingreifen des Immunsystems nach traumatischen Schäden im ZNS durchaus auch nützlich sein, wie in den folgenden Kapiteln näher erläutert wird.

### **1.3.2 Neurodegeneration**

Trotz des Immunprivilegs des ZNS und den erhöhten Schutzmechanismen können jedoch auch im Gehirn inflammatorische Prozesse im Rahmen neurologischer Erkrankungen oder nach Verletzungen beobachtet werden. Werden Neurone geschädigt, erfolgt eine Kaskade von Ereignissen, die zum neuronalen Zelltod führen kann. Auslöser dieser Neurodegeneration können dabei Störungen der ionalen Homöostase sowie massive Freisetzungen von Neurotransmittern sein, was wiederum die Bildung reaktiver toxischer Sauerstoffradikale begünstigt (Halliwell, 2001; Koutsilieri et al., 2002). Im Anschluß an diesen Primärschaden setzen die in dem betroffenen Gebiet geschädigten Neurone verschiedene Faktoren, wie Nukleoside, Nukleotide, Glutamat und Kalzium in den extrazellulären Raum frei (Inoue, 2002; Hansson und Rönnbäck, 2003). Diese Moleküle verändern das physiologische Gleichgewicht im geschädigten Hirnareal und bewirken unter anderem eine schnelle Aktivierung immunkompetenter Zellen (Gehrmann et al., 1995). Zu diesen Zellen gehören insbesondere Mikrogliazellen und Astrozyten. Bei neuroinflammatorischen Prozessen ist jedoch nicht nur die Einwanderung dieser Zellen in das geschädigte Hirngewebe entscheidend (Hailer et al., 1999), sondern auch, daß sie dort aktiv werden (Banati et al., 1993; Kreutzberg, 1995; Campanella et al., 2002). Mikroglia und Astrozyten sind in der Lage, eine Vielzahl von Substanzen, wie Zytokine (Hanisch, 2002), Chemokine (Ransohoff, 2002), Adhäsionsmoleküle (Raivich et al., 1999), Sauerstoffradikale (Floyd, 1999; Koutsilieri et al., 2002) und Stickstoffoxid (Liu et al., 2002), zu produzieren und mit infiltrierenden Lymphozyten in vielfältigster Weise in Wechselwirkung zu treten. Mikroglia fungieren dabei als lokale antigenpräsentierende Zellen des ZNS (Shrikant und Benveniste, 1996; Ma und Streilein, 1999). Sie können zu Makrophagen-ähnlichen Zellen reifen und sind dann zur Phagozytose und Antigenpräsentation sowie zur Produktion pro-inflammatorischer Zytokine (IL-1, IL-2, TNF- $\alpha$ ), anti-inflammatorischer Zytokine (IL-10, TGF- $\beta$ , Prostaglandin E2) sowie Leukozyten-attraktierender Chemokine fähig (Merrill und Benveniste, 1996; Ransohoff, 1997; Minghetti und Levi, 1998). Durch die Hochregulation von MHC II-Komplexen, Adhäsions- und kostimulatorischen Molekülen (LFA-1, VLA-4; ICAM-1, CD40, B7.1 und B7.2) können Mikrogliazellen zur weiteren Aktivierung von autoreaktiven

T-Lymphozyten beitragen (Gerritse et al., 1996; Kreutzberg, 1996; Hailer et al., 1997b; Aloisi et al. 2000a, b). So phagozytieren sie beispielsweise durch die Verletzung degeneriertes Myelin (Bechmann und Nitsch 1997a, b) und können dieses über MHC II-Komplexe (Konno et al., 1989; Stoll et al., 1989; Popovich et al., 1997; Beyer et al., 2000; Bechmann et al., 2001) den einwandernden autoreaktiven ZNS-spezifischen T-Zellen präsentieren. Mikroglia sind somit in der Lage, diese antigenspezifischen T-Zellen zu stimulieren, ihre Proliferation zu induzieren und neue Lymphozyten aus der Peripherie durch Sekretion von Chemokinen zu rekrutieren. Astrozyten spielen ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Immunantwort nach einer Schädigung im ZNS. Sie können MHC II-Komplexe sowie die kostimulatorischen Moleküle B7.1, B7.2 und CD40, die für die Antigenpräsentation notwendig sind, exprimieren und werden daher auch als nicht-professionelle antigenpräsentierende Zellen bezeichnet. Astrozyten sind zwar selbst nicht in der Lage, T-Zell-Proliferation zu stimulieren (Matsumoto et al., 1992; Meinel et al., 1994; Weber et al., 1994), sie können jedoch T-Zellantworten unterstützen und aktiv die Inhibition oder Apoptose von CD4<sup>+</sup> T-Zellen induzieren (Matsumoto et al., 1992; Gold et al., 1996). Andererseits wurde gezeigt, daß Astrozyten T-Lymphozyten nur im Zusammenspiel mit Mikrogliazellen oder IL-1 aktivieren können (Sedgwick et al., 1991; Williams et al., 1995). Darüber hinaus sezernieren sie ebenfalls eine Vielzahl von Chemokinen und Zytokinen (Benveniste, 1997b).

Im Rahmen solch einer neuronalen Schädigung beschränken sich die Wechselwirkungen zwischen den einzelnen immunkompetenten Zellen aber nicht nur auf die Beeinflussung der T-Lymphozyten durch Mikrogliazellen und Astrozyten. Die T-Zellen sind ihrerseits ebenfalls in der Lage, durch Zytokine oder Kostimulation antigenpräsentierende Zellen zu aktivieren und in ihrer Funktion zu modulieren (Kreuzberg, 1996; Hailer et al., 1997a; Aloisi et al., 1999b, 2000a, b, c).

Diese Darstellung macht deutlich, daß es sich um sehr komplexe Vorgänge handelt, die nach einer Verletzung im ZNS ablaufen. Mikrogliazellen, Astrozyten sowie T-Lymphozyten greifen dabei in alle Stadien der Neuroinflammation ein und sind maßgeblich an der Auslösung, Regulation, aber auch an der Suppression der Immunantwort beteiligt. Infolge der zahlreichen Faktoren, die im Prozeß der Inflammation von Mikrogliazellen und anderen infiltrierenden Immunzellen, wie peripheren Leukozyten und den T-Lymphozyten, gebildet werden können, entsteht zeitlich versetzt eine sekundäre Neurodegeneration, wobei sublethale Neurone, die den Primärschaden initial überlebt haben, abgetötet werden. Obwohl Immunzellen, die in die Entzündungsstelle einwandern, in erster Linie dazu dienen, die Entzündung einzudämmen und zur Regeneration des Gewebes beizutragen (Streit et al.,



1999), kann es durch ein inflammatorisches Geschehen ebenso zu Ausfallerscheinungen und Schädigungen von neuronalem Gewebe kommen (Kalb, 1995; Schwab und Bartholdi, 1996). Dieser Funktionsausfall resultiert zum einen daraus, daß Nervenzellen schlecht regenerieren und zum anderen aus der Produktion zytotoxischer Komponenten durch infiltrierende Immunzellen im Gebiet der neuronalen Schädigung (Faden, 1993; Povlishock und Jenkins, 1995; Morganti-Kossmann et al., 2002). Der Verlauf einer Neuroinflammation bzw. einer Neurodegeneration ist daher immer von dem auslösenden Reiz, der Anzahl der eingewanderten und aktivierten Mikrogliazellen/Makrophagen sowie von der Gewebeart abhängig. Ebenso spielen die Anzahl und die Art aller anderen mitbeteiligten Immunzellen, wie der T-Lymphozyten, eine entscheidende Rolle (Piehl und Lindmann, 2001; Schwartz, 2003).

### **1.3.3 Neuroprotektion**

Nach einer Verletzung des ZNS kommt es wie oben beschrieben zu einem primären Schaden der direkt betroffenen Neurone, der meist mit einem graduellen, sekundären Verlust benachbarter, nicht primär geschädigter Neurone einhergeht (Faden und Salzman, 1992; Faden, 1993; McIntosh, 1993; Yoles und Schwartz, 1998). Die Beteiligung von T-Zellen bei Verletzungen des ZNS sowie bei neuroinflammatorischen Erkrankungen wurde über einen langen Zeitraum allein als Ausdruck solch einer destruktiven autoimmunen Reaktion verstanden. Es gibt jedoch zunehmend Hinweise, die eine protektive Rolle von Makrophagen und T-Zellen nach einer mechanischen Schädigung des ZNS vermuten lassen (Schwartz und Cohen, 2000). So können autoimmune T-Zellen, die spezifisch für einen Teil des Myelins (MBP) sind, verletzte Nervenzellen vor einem sekundären Fortschreiten des Primärschadens schützen (Moalem et al., 1999; Hauben et al., 2000a). Durch den adoptiven Transfer von autoimmunen MBP-spezifischen T-Zellen konnte eine posttraumatische Ausbreitung des Schadens im Nervus opticus verhindert werden. Auch eine Immunisierung mit Copaxone-1, dem Myelin-ähnlichen Polypeptid Glatiramer und in der Therapie der MS als immunmodulatorische Substanz eingesetzt, und Adjuvans sowie der adoptive Transfer von Copaxone-1-spezifischen T-Zellen verringerten den Sekundärschaden nach einer Quetschläsion des Nervus opticus (Kipnis et al., 2000). Die aktive und passive Immunisierung mit Peptiden des Myelins (MBP, PLP, MOG) schützten sowohl bei einer Rückenmarksverletzung (Hauben et al., 2000b) als auch im Modell der Sehnervquetschung (Fisher et al., 2001) vor einem Fortschreiten des Primärschadens. Ob es sich bei diesen beobachteten neuroprotektiven Prozessen um unterdrückte Entzündungsreaktionen und/oder

um eine gesteigerte neuronale Regeneration handelt, ist bisher noch nicht geklärt. Außerdem bleibt noch zu untersuchen, ob die erzielten Resultate tatsächlich reproduzierbar sind. Da in unabhängigen Versuchen widersprüchliche Ergebnisse erzielt wurden, werden diese Befunde derzeit kritisch diskutiert. So konnten die Daten bezüglich der neuroprotektiven Rolle Myelinreaktiver T-Zellen in der Arbeitsgruppe von Phillip Popovich nicht bestätigt werden (Popovich et al., 1996; Jones et al., 2002, 2004). Andere Arbeitsgruppen berichten hingegen auch von neuroprotektiven bzw. neuroregenerativen Effekten nach einer Immunisierung mit ZNS-spezifischen Peptiden im geschädigten ZNS (Huang et al., 1999; Hofstetter et al., 2003; Sicotte et al., 2003).

Nach einer entorhinalen Kortex-Läsion (ECL) wandern T-Zellen in die Zonen anterograder und retrograder Degeneration im Hippokampus ein und treffen dort auf Myelinphagozytierende MHC II-positive Mikrogliazellen, die das kostimulatorische Molekül B7.2, nicht jedoch B7.1 exprimieren (Bechmann et al., 2001). Auch hier wird eine neuroprotektiv wirkende Immunität vermutet. Ob die Expression des B7.2-Moleküls auf Mikrogliazellen die Ursache oder die Wirkung der Neuroprotektion ist, bleibt noch zu klären.

Weiterhin konnte in verschiedenen Hirntraumamodellen eine starke T-Zell-Akkumulation in den Zonen der primären Degeneration und der sekundären Regeneration beobachtet werden (Hirschberg et al., 1998; Raivich et al., 1998; Moalem et al., 1999; Butovsky et al., 2001). Da T-Zellen Neurotrophine exprimieren (Erhard et al., 1993; Santambrogio et al., 1994; Kerschensteiner et al., 1999; Muhallab et al., 2002) wurde die Hypothese aufgestellt, daß T-Zellen durch die lokale Sekretion von Neurotrophinen im Läsionsgebiet neuroprotektiv wirken können (Kerschensteiner et al., 1999; Hohlfeld et al., 2000; Moalem et al., 2000).

Außerdem konnte gezeigt werden, daß der von Astrozyten freigesetzte Faktor TGF- $\beta$  eine Ramifizierung und damit Deaktivierung von Mikrogliazellen induziert (Hailer et al., 1998; Eder et al., 1999). Die Ramifizierung ist begleitet von einer reduzierten Expression des MHC II-Komplexes sowie der Adhäsionsmoleküle LFA-1 und ICAM-1, die eine wichtige Rolle bei der Mikroglia migration spielen. Die Deaktivierung der Mikrogliazellen führte zu einer Stabilisierung von Dendriten der deafferenzierten hippocampalen Neurone und zu einem gesteigerten axonalen Sprouting (Eyüpoglu et al., 2003).

Neuroprotektive Effekte konnten auch in lädierten entorhino-hippokampalen Schnittkulturen nachgewiesen werden. Dieses Modell erlaubt es, Schädigungen des myelinisierten Fasertraktes zwischen entorhinalem Kortex und Hippokampus, dem Tractus perforans zu untersuchen. Die Versuche belegen, daß MBP-spezifische T-Zellen und Copaxone-1-spezifische T-Zellen neuronales Überleben induzieren und sekundäre Degeneration

verhindern (Fisher et al., 2001; Wolf et al., 2002). Die T-Zellen sind in der Lage, in die Schnittkulturen einzuwandern und dort Mikrogliazellen zu aktivieren, um eine optimale Wechselwirkung zwischen ihnen zu erreichen. Als Folge exprimieren Mikrogliazellen den MHC II-Komplex, das kostimulatorische Adhäsionsmolekül ICAM-1 sowie das regulatorische Molekül CD40. Auf diese Weise können die Antigene, die bei einer Verletzung freigesetzt werden, den neu einwandernden T-Lymphozyten präsentiert werden. Es kommt zur Ausweitung der Immunreaktion, die durch eine wechselseitige Beeinflussung von Mikroglia und T-Lymphozyten gekennzeichnet ist. Die stärkste Aktivierung der Mikrogliazellen zeigte sich auch hier bei der Invasion von MBP-spezifischen T-Zellen. Weitere Versuche haben ergeben, daß vormarkierte Mikrogliazellen nach einer experimentell induzierten neuronalen Schädigung durch NMDA spezifisch zum Ort dieser neuronalen Schädigung migrieren (Heppner et al., 1998) und durch die Freisetzung großer Mengen freier Radikale und zytotoxischer Zytokine sowohl an der sekundären Schädigung von Neuronen als auch an der Schädigung der Mikrogliazelle selbst beteiligt sind (Diestel et al., 2003). Die Versuche haben gezeigt, daß aktivierte Mikrogliazellen aktiv vor oxidativem Schaden geschützt werden (Ullrich et al., 2001a) und daß Mikroglia durch die Expression von CD11a in ihrem Migrationsverhalten kontrolliert werden. Die Expression dieser migrationsrelevanten Untereinheit CD11a des  $\beta_2$ -Integrins und Adhäsionsmoleküls LFA-1 wird von dem nukleären Enzym Poly(ADP-Ribose)-Polymerase-1 (PARP-1) durch Bildung eines PARP-NF- $\kappa$ B-Proteinkomplexes reguliert. Durch die Hemmung der PARP-1 oder von CD11a konnten Mikrogliazellen nicht mehr regionenspezifisch in die Gebiete der neuronalen Schädigung einwandern und somit Neurone in lebendem Hirngewebe komplett vor einem Sekundärschaden schützen (Ullrich et al., 2001b). Dennoch muß gesagt werden, daß die Mikrogliazellen neben ihrer Beteiligung an neurodegenerativen Prozessen durchaus auch neuroprotektive Eigenschaften aufweisen. Sie sezernieren neben entzündungsfördernden Produkten auch entzündungshemmende Substanzen (TGF- $\beta$ , IL-10) und Wachstumsfaktoren (NGF, NT-3), die eine entscheidende Rolle bei der Suppression der Immunantwort und der Wundheilung spielen (Streit, 2002).

Neurodegeneration und Neuroprotektion sind auch im Verlauf der MS Prozesse, die bei dem phasischen Verlauf der Erkrankung möglicherweise eine wichtige Rolle spielen (Trapp et al., 1998; Bitsch et al., 2000). Es ist daher denkbar, daß auch die Remission im Verlauf neuroinflammatorischer Erkrankungen, wie der MS oder der EAE, auf eine neuroprotektiv wirkende Autoimmunität zurückzuführen ist (Hohlfeld et al., 2000).

Therapeutische Maßnahmen nach einer Verletzung des ZNS oder bei neuroinflammatorischen Erkrankungen konzentrieren sich daher zum einen auf die Stimulation der neuronalen Regeneration (Caroni und Schwab, 1988; Neumann und Woolf, 1999) und zum anderen auf die Neuroprotektion initial überlebender Neurone, indem die Immunantwort von den in das Schadensgebiet infiltrierenden Zellen unterdrückt werden soll (Benveniste, 1997a; Emsley und Tyrrell, 2002; Morganti-Kossmann et al. 2002).

#### **1.3.4 Einfluß der T-Lymphozyten auf neuropathologische Prozesse**

Autoreaktive T-Zellen können eine entscheidende Rolle bei Verletzungen oder Erkrankungen des ZNS spielen, wobei jedoch nahezu konträr erscheinende Effekte beobachtet werden. Auf der einen Seite gelten sie im Kontext einer neuroinflammatorischen Erkrankung, wie der MS oder der EAE, als pathogen und sind sowohl an der primären neuronalen Schädigung als auch an der Ausbildung der sekundären Degeneration maßgeblich beteiligt (Fee et al., 2003). Andererseits wirken sie nach einer mechanischen Schädigung des ZNS durchaus auch neuroprotektiv, indem sie verletzte Nervenzellen vor einem sekundären Fortschreiten des Primärschadens schützen (Schwartz, 2001). Diese gegensätzlichen Effekte werden möglicherweise durch verschiedene Subtypen von T-Helferzellen, den Th1- und Th2-Zellen, hervorgerufen. Die Subtypen unterscheiden sich vor allem in ihrem Zytokinmuster. Während Th1-Zellen IFN- $\gamma$ , Lymphotoxin, TNF- $\alpha$  und IL-2 produzieren, exprimieren Th2-Zellen IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13. Im Rahmen chronischer inflammatorischer Autoimmunerkrankungen konnte gezeigt werden, daß sich die destruktiven Effekte eher den Th1-Zellen zuschreiben lassen und die neuroprotektiven Effekte eher auf der Wirkung von Th2-Zellen beruhen (Liblau et al., 1995; Lafaille, 1998).

Untersuchungen bezüglich der Zytokin-Expression EAE-auslösender MBP-spezifischer T-Zellen haben ergeben, daß diese T-Zellen dem Subtyp Th1 zuzuordnen sind (Ando et al., 1989). Während also MBP-spezifische Th1-Zellen EAE auslösen können, sind MBP-spezifische Th2-Zellen dazu nicht in der Lage (Cua et al., 1995). Weiterhin wurde überprüft, ob Th2-Zellen sich protektiv gegenüber einer Th1-induzierten EAE verhalten. Hier konnte gezeigt werden, daß die Th2-Zellen auf eine passive Immunisierung mit MBP- bzw. PLP-spezifischen Th1-Zellen nicht protektiv reagieren (Khoruts et al., 1995). Im Gegensatz dazu wurden nach einer aktiven Immunisierung mit MBP bzw. PLP durchaus protektive Effekte der Th2-Zellen auf die EAE beobachtet (Chen et al., 1994; Kuchroo et al., 1995). Bei einer etablierten EAE wird außerdem von einem Shift von Th1 zu Th2 berichtet, der entweder mit einer Remission der Krankheit (Chen et al., 1998) oder mit einer krankheitsverbesserten

Behandlung mit Copaxone-1 (Aharoni et al., 1997; Neuhaus et al., 2001) und Linomide (Karussis et al., 1999) einhergeht.

In diesem Zusammenhang werden auch die Th2-Zytokine IL-4 (Racke et al., 1994; Santambrogio et al., 1995; Shaw et al., 1997) und IL-10 (Moore et al., 1993) genannt, welche sich ebenfalls positiv in der EAE auswirkten. Außerdem wird die Rolle regulatorischer T-Zellen bei neuroinflammatorischen Erkrankungen diskutiert, da auch ihnen ein protektiver Einfluß bei der EAE nachgewiesen werden konnte (Chen et al., 1994).

In entorhino-hippokampalen Hirnschnittkulturen wurde gezeigt, daß die T-Zell-induzierte Neuroprotektion (Bechmann und Nitsch, 2001; Kwidzinski et al., 2002) vom Subtyp der T-Helferzellen abhängig ist. MBP-spezifische Th2-Zellen besaßen hierbei den stärksten neuroprotektiven Effekt, indem sie neuronales Überleben förderten und die sekundäre Degeneration verringerten (Wolf et al., 2002). In der organotypischen Schnittkultur wurden ebenfalls die Interaktionen zwischen autoreaktiven MBP-spezifischen Th1- bzw. Th2-Lymphozyten, Mikrogliazellen sowie Astrozyten analysiert. Die Daten weisen darauf hin, daß Mikroglia und Astrozyten unterschiedlich auf Th1- bzw. Th2-Zellen reagieren. So führen beide T-Zell-Subtypen zur Expression des regulatorischen Moleküls CD40, aber nur Th1-Zellen induzieren die Expression des kostimulatorischen Moleküls B7.1 auf Mikrogliazellen. Demgegenüber wird die Expression von B7.2 durch Th1-Zellen unterdrückt, durch Th2-Zellen gefördert (Gimsa et al., 2001; Wolf et al., 2001). Während Th1-Zellen das Adhäsionsmolekül ICAM-1 auf Mikrogliazellen induzieren, sind Th2-Zellen hingegen in der Lage, diese ICAM-1 Induktion zu verhindern und sogar rückgängig zu machen. Th2-Zellen können somit Th1-induzierte inflammatorische Mikrogliaereaktionen reduzieren und unterstützen damit die Ramifizierung der Mikroglia (Gimsa et al., 2001). Dies könnte neben der Fas/Fas-Ligand-vermittelten T-Zell-Apoptose durch Astrozyten ein zentraler Th2-vermittelter neuroprotektiver Mechanismus im Rahmen neuroinflammatorischer Prozesse sein (Bechmann et al., 1999, 2000, 2002).

Weitere Untersuchungen weisen darauf hin, daß Mikrogliazellen und Astrozyten auch unterschiedlich auf die Zytokine der Th1- und Th2-Zellen reagieren. Beispielsweise bewirkt das Th1-Zytokin IFN- $\gamma$  eine Expression von MHC II-Komplexen auf Mikrogliazellen und Astrozyten (Panek und Benveniste, 1995). Weiterhin induziert IFN- $\gamma$  die Expression der kostimulatorischen Moleküle B7 auf Mikrogliazellen, jedoch nicht auf Astrozyten (Aloisi et al., 1999b). Dabei wurde interessanterweise gefunden, daß kultivierte Mikrogliazellen nach Behandlung mit INF- $\gamma$  B7.2, nicht aber B7.1 exprimieren (Menendez Iglesias et al., 1997).

Außerdem konnte gezeigt werden, daß auch die T-Lymphozyten in unterschiedlicher Art und Weise von Mikrogliazellen und Astrozyten beeinflusst werden. Während Mikrogliazellen IL-12 produzieren, welches den Hauptstimulus zur Th1-Differenzierung darstellt und Th2-Zellen unterdrückt, sind Astrozyten dazu nicht in der Lage. Astrozyten hemmen hingegen die mikrogliale IL-12 Produktion (Aloisi et al., 1997), wodurch Th2-Zellen durch Astrozyten indirekt gefördert werden (Aloisi et al., 1999b). Th1-Zellen können von Mikrogliazellen effektiver stimuliert werden als von Astrozyten. Th2-Zellen werden besser von Astrozyten als von Mikrogliazellen stimuliert (Aloisi et al., 1999a). Astrozyten sind ferner in der Lage, die antigenabhängige T-Zell-Aktivierung durch Induktion des inhibitorischen Proteins CTLA-4 zu reduzieren (Gimsa et al., 2004).

In welcher Art und Weise T-Helferzellen die beobachteten neuroprotektiven Effekte regulieren, ist noch weitgehend unverstanden. Neben der Hypothese, daß die von den T-Zellen sezernierten Neurotrophine an der Neuroprotektion beteiligt sind, gibt es bereits Belege für eine Modulation der astrozytären Neurotrophin-Sekretion durch Th2-Zellen bzw. durch deren Zytokine. Astrozyten stellen die Hauptquelle für den Wachstumsfaktor NGF dar, der nach einer Verletzung im ZNS vermehrt exprimiert wird. Die astrozytäre NGF-Produktion kann durch die Th2-Zytokine IL-4, IL-5 und IL-10 sowie durch die Präsenz von Th2-Zellen gesteigert werden (Awatsuji et al., 1993; Brodie, 1996; Brodie et al., 1998; Øren et al., 2004). Im Gegensatz dazu hemmt das Th1-Zytokin IFN- $\gamma$  die IL-10 induzierte NGF-Produktion von Astrozyten (Awatsuji et al., 1995; Brodie, 1996).

## 1.4 Zielsetzungen

In der vorliegenden Arbeit sollte die Beteiligung immunkompetenter Zellen an Reorganisationsvorgängen im ZNS untersucht werden. Besonderes Interesse galt hierbei dem Einfluß von T-Zellen auf axonales Wachstum nach einem mechanisch gesetzten Primärschaden. Es sollte geklärt werden, ob T-Zellen akut verletzte Neurone nicht nur vor einer Ausbreitung dieses Schadens schützen, sondern sogar das Auswachsen geschädigter Axone bzw. das reaktive Sprouting intakter Axonendigungen stimulieren können.

In dieser Arbeit fanden zellbiologische, molekularbiologische und immunhistochemische Methoden ihre Anwendung. Zur Beantwortung der unten aufgeführten Fragen wurden spezielle *in vitro* Kokulturmodelle entwickelt, die die Kokultivierung von organotypischen entorhino-hippokampalen Hirnschnitten mit verschiedenen T-Zellen und rekombinanten Faktoren sowie den Einsatz funktionsblockierender Antikörper ermöglichten. Zur Ergänzung dieser Untersuchungen wurden zusätzlich *in vivo* Läsionsexperimente mit injizierten T-Zellen durchgeführt.

Es sollten folgende experimentelle Fragestellungen beantwortet werden:

1. Zeigen akut verletzte Hirnschnitte *in vitro* axonales Wachstum?
2. Beeinflussen T-Zellen das axonale Wachstum und gibt es subtypspezifische Unterschiede?
3. Welche Einfluß haben ausgewählte Zytokine und Neurotrophine bei der Regulation des axonalen Wachstums?
4. Modulieren T-Zellen die Expression neuronaler Neurotrophin-Rezeptoren und/oder die astrozytäre Neurotrophin-Sekretion und sind subtypspezifische Unterschiede zu beobachten?
5. Führt die Injektion von T-Zellen in die Läsionsstelle einer ECL zu einer Beeinflussung des axonalen Wachstums *in vivo* und gibt es subtypspezifische Unterschiede?