

## **5 DISKUSSION**

### **5.1 Einfluß der T-Lymphozyten auf Neurodegeneration und Neuroprotektion**

Das ZNS ist ein immunprivilegiertes Organ, in dem die lokale Immunantwort stark begrenzt ist (Streilein et al., 1993, 1995). Zum einen soll dadurch das Risiko einer Schädigung durch neuroinflammatorische Erkrankungen so gering wie möglich gehalten werden, da sich bereits minimalste Verletzungen im Bereich des ZNS nachteilig auswirken können. Zudem sind die Fähigkeiten zur neuronalen Regeneration stark begrenzt (Faden und Salzman, 1992; Faden 1993; McIntosh, 1993). Andererseits ist jedoch auch im ZNS das Eingreifen des Immunsystems notwendig, um Heilungsprozesse nach Verletzungen herbeizuführen (Ben-Nun et al., 1982; Burns et al., 1983; Ota, 1990; Hickey et al., 1991; Rapalino, 1993; Lazarov-Spiegler et al., 1996; Martin, 1997). Es konnte bereits gezeigt werden, daß sowohl im physiologischen Zustand des Körpers als auch bei pathologischen Veränderungen ein Austausch zwischen den Zellen des Immun- und des Nervensystems stattfindet. So sind z.B. aktivierte T-Lymphozyten in der Lage, auch unter physiologischen Bedingungen in geringer Anzahl die Blut-Hirn-Schranke zu passieren, auf diesem Weg ins Hirngewebe einzudringen (Wekerle et al., 1986; Hickey et al., 1991; Lassmann, 1997) und dieses bei fehlender Antigenpräsentation auch wieder zu verlassen (Hart und Fabry, 1995; Lassmann, 1997). Bei akuten Hirnschädigungen oder chronischen Erkrankungen können diese aktivierten T-Lymphozyten jedoch in größerer Anzahl, auch bei nicht geschädigter Blut-Hirnschranke, ins ZNS einwandern (Brown, 2001). Welche Signalmoleküle diese Vorgänge anschalten oder fördern, ist Gegenstand intensiver Forschung.

Aktivierte T-Lymphozyten spielen somit eine entscheidende Rolle bei Verletzungen im ZNS, wobei sie sowohl neurodegenerative als auch neuroprotektive Wirkungen entfalten können. So führen T-Zellen bei neuroinflammatorischen Erkrankungen, wie der MS, zur Demyelinisierung der Axone und sind somit an der primären neuronalen Schädigung sowie an der Ausbildung der sekundären Degeneration beteiligt (Fee et al., 2003). Diese Invasion von T-Zellen in das Hirngewebe stellt z.B. eines der Hauptmerkmale der MS und ihrem experimentellen Modell, der EAE, dar (Raine, 1991, 1994; Brosnan und Raine, 1996). Im Gegensatz dazu können T-Zellen nach einer mechanischen Schädigung des ZNS durchaus auch neuroprotektiv wirken, indem sie verletzte Nervenzellen vor einer Ausbreitung des Primärschadens schützen (Moalem et al., 1999; Schwartz, 2001).

Die Hintergründe dieser konträren Wirkungsweisen sind bisher noch nicht vollständig geklärt. Es gibt jedoch – zum Teil kontrovers diskutierte – Hinweise, daß die gegensätzlichen Effekte auf verschiedene Subtypen von T-Helferzellen zurückzuführen sind, welche unterschiedliche Zytokinmuster aufweisen. Während Th1-Zellen IFN- $\gamma$ , Lymphotoxin, TNF- $\alpha$  und IL-2 produzieren, exprimieren Th2-Zellen IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13. Die Erkenntnisse bezüglich dieses Zytokin-Expressionsmusters konnten in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe von ELISA-Analysen sowohl für ZNS-spezifische als auch ZNS-unspezifische Th1- und Th2-Zellen bestätigt werden. Die Untersuchungen der letzten Jahre lassen vermuten, daß die neurodegenerativen Effekte eher durch Th1-Zellen hervorgerufen werden und die neuroprotektiven Effekte eher auf der Wirkung der Th2-Zellen beruhen (Liblau et al., 1995; Kroemer et al., 1996; Nicholson und Kuchroo, 1996; Romagnani, 1996; Del Prete, 1998; Lafaille, 1998).

## **5.2 Einfluß der T-Lymphozyten auf Neuroregeneration**

In der vorliegenden Arbeit wurde die Beteiligung dieser T-Zellen an Reorganisationsvorgängen im ZNS näher untersucht. Ausgehend von den bisherigen Ergebnissen sollte geklärt werden, ob T-Zellen akut verletzte Neurone nicht nur vor einer Ausbreitung des Primärschadens schützen, sondern sogar das Auswachsen von Axonen aus dem geschädigten Hirngewebe beeinflussen können.

Zur Untersuchung dieses axonalen Wachstums wurde ein klassisches neurobiologisches Kokulturmodell entwickelt bzw. modifiziert (Steup et al., 2000). Hierbei wurden unterschiedliche primäre T-Zellen mit entorhinalen Kortex-Explantaten in einer dreidimensionalen Kollagenmatrix kokultiviert, wobei die akuten Hirnschnitte als Modell für einen mechanisch gesetzten Primärschaden dienten. Die Analyse des axonalen Wachstums erfolgte nun dahingehend, daß die in die Kollagenmatrix eingewachsenen Neuriten in Bezug auf ihre Dichte und Länge ausgewertet wurden. Ob es sich bei dem beobachteten axonalen Wachstum jedoch um Regeneration geschädigter Axone oder um reaktives Sprouting intakter Axonendigungen handelt, ist in diesem Modell nicht eindeutig feststellbar. Beide Vorgänge können nach einer Verletzung im ZNS parallel stattfinden und tragen zur Reorganisation bzw. Reinnervation des geschädigten Hirngewebes bei (Frotscher et al., 1997).

Mit Hilfe dieses Kollagen-Kokulturmodells konnte bestätigt werden, daß akut verletzte Hirnschnitte *in vitro* axonales Wachstum aufweisen. Darüber hinaus wurde in dieser Arbeit erstmals gezeigt, daß T-Zellen in der Lage sind, axonales Wachstum zu beeinflussen. Eine wichtige Voraussetzung dafür war, daß die T-Zellen mit einem Antigen stimuliert, d.h.

aktiviert wurden und somit in der Lage waren, Zytokine zu sezernieren. Dabei spielte es jedoch keine Rolle, ob die Aktivierung der T-Zellen antigenspezifisch oder unspezifisch erfolgte. In diesem Modell war allein die Eigenschaft der Zytokin-Sekretion ausschlaggebend. Die aktivierten T-Zellen unterschieden sich lediglich in der Höhe ihrer sezernierten Zytokinkonzentrationen, was jedoch charakteristisch für eine primäre T-Zellkultur ist. Im Gegensatz dazu übten naive T-Zellen, die nicht mit einem Antigen stimuliert wurden, d.h. unaktiviert blieben und somit keine Zytokine sezernierten, auch keinen Einfluß auf das axonale Wachstum verletzter Hirnschnitte aus. Unter Berücksichtigung dieser Aspekte waren subtypspezifische Unterschiede in der Beeinflussung axonaler Auswachs Vorgänge zu beobachten. Während MBP-spezifische Th1-Zellen eine signifikante Inhibition und OVA-spezifische sowie unspezifisch mit ConA aktivierte Th1-Zellen zumindest eine tendenzielle Inhibition des axonalen Wachstums hervorriefen, zeigten sowohl die antigenspezifischen als auch unspezifischen Th2-Zellen eine signifikante Stimulation des axonalen Wachstums. Diese Daten bestätigen die Vermutung, daß Th2-Zellen nicht nur neuroprotektiv wirken, sondern sogar axonales Auswachsen nach einer Verletzung fördern. Untersuchungen bezüglich der Neuroprotektion in dieser Arbeitsgruppe zeigten vergleichbare Resultate. So induzierten Th2-Zellen im Gegensatz zu Th1-Zellen neuronales Überleben und verringerten gleichzeitig die sekundäre Degeneration des primär geschädigten Hirngewebes (Wolf et al., 2002). In den Versuchen der vorliegenden Arbeit stimulierten Th2-Zellen im Vergleich zu Th1-Zellen das axonale Auswachsen dieses primär verletzten Hirngewebes. Dabei traten die beschriebenen Effekte in beiden Versuchsansätzen unabhängig von der Antigen-spezifität der T-Zellen auf. Sowohl ZNS-spezifische (MBP) als auch ZNS-unspezifische (OVA) Th2-Zellen wirkten neuroprotektiv und förderten axonales Wachstum. In den Neuroprotektionsuntersuchungen hatten dabei jedoch die MBP-spezifischen Th2-Zellen ein deutlich höheres protektives Potential als die OVA-spezifischen Th2-Zellen. Im Gegensatz dazu lag der in dieser Arbeit beschriebene Effekt MBP- und OVA-spezifischer Th2-Zellen ungefähr auf gleichem Niveau. Während sowohl unspezifisch aktivierte Th1- als auch Th2-Zellen denselben protektiven Effekt auf das neuronale Überleben zeigten, bewirkten nur unspezifisch mit ConA aktivierte Th2-Zellen im Gegensatz zu den Th1-Zellen eine Stimulation des axonalen Wachstums. Diese Ergebnisse machen deutlich, daß der wachstumsfördernde Effekt der Th2-Zellen tatsächlich vom Subtyp und dem Aktivierungszustand, nicht aber von der Antigen-spezifität der T-Zellen abhängig ist. Alle untersuchten CD4<sup>+</sup> Th2-Zellen sind somit – unabhängig von ihrer Antigen-spezifität – in der Lage, die für die Stimulation des axonalen Wachstums notwendigen Faktoren zu exprimieren. Das verwendete Kollagen-Kokulturmodell

verdeutlicht außerdem, daß es sich dabei allein um einen Effekt sezernierter Faktoren handeln muß, da kein direkter Zell-Zell-Kontakt zwischen T-Lymphozyten und verletztem Hirngewebe bestand. Die Kollagenmatrix diente hierbei lediglich als Verbindung zwischen den T-Zellen und den Hirnschnitten und stellte ein geeignetes Milieu und physikalisches Substrat für wachsende Axone dar. Untersuchungen zur Neuroprotektion, bei denen der Einfluß von T-Zellen auf neuronales Überleben an verletzten Hirnschnitten evaluiert wurde, bestätigen diese Vermutungen. Auch hier waren neuroprotektive Effekte nur bei den Experimenten ohne direkten Zell-Zell-Kontakt zu beobachten (Wolf et al., 2002). Um zu beweisen, daß es sich tatsächlich um einen Effekt löslicher Faktoren handelt, wurden T-Zellkulturüberstände anstelle der T-Lymphozyten in dem Kollagen-Kokulturmodell eingesetzt und das Auswachsen von Nervenfasern aus den entorhinalen Kortex-Explantaten erfaßt. In diesen Versuchsansätzen zeigten jedoch weder die Th1- noch die Th2-Überstände die erwarteten Effekte. Da eine Kultivierung der Hirnschnitte nur in einem für sie spezifischen Inkubationsmedium und nicht in den T-Zellkulturüberständen erfolgen konnte, wurden die Überstände in diesem Versuch direkt in das Kollagen eingebracht. Hierbei durfte jedoch nur soviel Überstand eingesetzt werden, daß die Polymerisationsfähigkeit des Kollagens unbeeinträchtigt blieb. Die auf diese Weise limitierte Konzentration an T-Zell-Zytokinen war um ein Vielfaches geringer als die Konzentration, die von den in das Kollagen eingebrachten T-Zellen sezerniert wurde. Diese Konzentrationsdifferenzen könnten zu dem Ausbleiben der zuvor beschriebenen Effekte geführt haben. Außerdem besteht in den Kokulturen mit T-Lymphozyten die Möglichkeit, daß es zu Interaktionen zwischen verschiedenen sezernierten Substanzen, Oberflächenmolekülen sowie intrazellulären Bestandteilen der T-Zellen, aber auch zu einem wechselseitigen Austausch zwischen den T-Zellen und dem verletzten Hirngewebe kommt. All diese Interaktionen, die bei der Kokultivierung mit T-Zellkulturüberständen jedoch fehlen, könnten zu den beobachteten Effekten bezüglich des axonalen Auswachsens beigetragen haben.

## **5.3 Analyse der sezernierten Faktoren**

### **5.3.1 Neurotrophine**

Im nächsten Schritt sollte herausgefunden werden, welche sezernierten Faktoren an der Modulation des axonalen Wachstums, insbesondere der beobachteten Stimulation durch Th2-Zellen, beteiligt sind. Zunächst wurde der Frage nachgegangen, welche bekannten Faktoren bei axonalen Auswachsvorgängen sowie bei Reorganisationsprozessen im ZNS eine Rolle

spielen. In zahlreichen Veröffentlichungen wird dabei auf die Gruppe der Neurotrophen Faktoren, insbesondere auf die Untergruppe der Neurotrophine (NGF, BDNF, NT-3 und NT-4), hingewiesen (Wetmore et al., 1990; Barde, 1997; Bailey und Gibbson, 2002). Ihnen wird eine wichtige Rolle bei der Entwicklung, Differenzierung und Plastizität des Nervensystems zugeschrieben (Hofer et al., 1990; Maisonpierre et al., 1990b; Oppenheim, 1991; Thoenen, 1995; Lewin und Barde, 1996). Von besonderer Bedeutung ist hierbei das Wachstum von Nervenzellen sowie die Fähigkeit, auf Verletzungen von Hirngewebe mit neuronalem Überleben zu reagieren. Obwohl Regenerationsprozesse nach einer Verletzung im ZNS normalerweise nur begrenzt möglich sind, konnte ein positiver, regenerationsfördernder Einfluß der Neurotrophine sowohl *in vitro* (Lentz et al., 1999; McAllister et al., 1999; Prang et al., 2001; Goldberg et al., 2002) als auch *in vivo* (Bregman et al., 1997) bestätigt werden.

Auch T-Zellen sind bekanntermaßen in der Lage, Neurotrophine zu exprimieren (Erhard et al., 1993; Santambrogio et al., 1994; Kerschensteiner et al., 1999; Muhallab et al., 2002). In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals gezeigt, daß es neben einem subtypspezifischen Zytokinprofil auch subtypspezifische Unterschiede in der Sekretion von Neurotrophinen gibt. So produzierten Th2-Zellen signifikant größere Mengen an NGF, NT-3 und NT-4 als Th1-Zellen. Auch dieser Effekt war antigenunabhängig, da sowohl MBP- als auch OVA-spezifische Th2-Zellen dazu in der Lage waren. Im Gegensatz zu den Angaben in der Literatur, welche sich auf humanes Gewebe beziehen (Kerschensteiner et al., 1999), konnte BDNF in dem hier verwendeten Mausmodell weder für Th1- noch für Th2-Zellen auf Proteinebene nachgewiesen werden, obwohl die mRNA in beiden T-Zell-Subtypen detektierbar war.

Die bisherigen Untersuchungen ergaben somit einerseits eine Th2-induzierte Stimulation des axonalen Wachstums aus entorhinalen Kortex-Explantaten *in vitro*. Gleichzeitig wiesen diese Th2-Zellen eine gegenüber den Th1-Zellen gesteigerte Sekretion von Neurotrophinen auf.

Ausgehend von diesen Ergebnissen und der Hypothese, daß T-Zellen durch die Sekretion von Neurotrophinen neuroprotektiv wirken können (Kerschensteiner et al., 1999; Hohlfeld et al., 2000; Moalem et al., 2000), sollte geklärt werden, ob die durch Th2-Zellen hervorgerufene Stimulation des axonalen Wachstums auf den von ihnen sezernierten Neurotrophinen beruht.

Um die beteiligten Neurotrophine zu identifizieren, wurde der Effekt funktionsblockierender Antikörper gegen NGF, NT-3 und NT-4 bzw. eine gleichzeitige Blockierung aller drei Neurotrophine in den Kollagen-Kokulturen analysiert. Die Blockierungen mit spezifischen Antikörpern ergaben sowohl bei den Kontroll-Explantaten als auch bei den Kokultivierungen

mit Th1- oder Th2-Zellen eine signifikante Reduktion des axonalen Wachstums auf ca. 60 bis 70 % im Vergleich zu unspezifischen Kontroll-Antikörpern. Die Th2-induzierte Stimulation des axonalen Auswachsens konnte somit bereits durch die Inhibierung eines einzelnen Neurotrophins stark reduziert werden. Die gleichzeitige Blockierung aller drei Faktoren führte mit einer Reduktion des axonalen Wachstums auf ca. 40 % sogar zu einem leichten synergistischen Inhibierungseffekt im Vergleich zu den Einzelblockierungen. Da in den Blockierungsansätzen jedoch keine vollständige Aufhebung des axonalen Auswachsens erreicht wurde, waren weitere Untersuchungen zur Identifikation zusätzlicher Faktoren notwendig. Diese Befunde werden unter Punkt 5.3.1.2 diskutiert.

Die Ergebnisse zeigen jedoch, daß die Neurotrophine NGF, NT-3 und NT-4 parallel zu den Literaturangaben (Lentz et al., 1999; McAllister et al., 1999; Prang et al., 2001; Goldberg et al., 2002; Bregman et al., 1997) auch in dem hier verwendeten Modell eine wichtige Rolle bei axonalen Auswachsvorgängen im ZNS spielen. Die beschriebenen Effekte belegen, daß nicht nur axonales Auswachsen, sondern auch die Th2-induzierte Stimulation des axonalen Wachstums Neurotrophin-vermittelt sind. Inwieweit dieser Effekt auf der direkten Wirkung von Th2-Neurotrophinen beruht, ist noch unklar. Die Annahme, daß Th2-Zellen Neurotrophine sezernieren und diese auf direktem Weg das Wiederauswachsen verletzter Nervenfasern veranlassen, wird derzeit kontrovers diskutiert. Sie erscheint zunehmend unwahrscheinlich, da die Anzahl der in ein Läsionsgebiet einwandernden T-Zellen sehr gering ist und die von T-Lymphozyten im Vergleich zu den Zellen des Nervensystems freigesetzten Neurotrophinmengen ebenfalls relativ niedrig sind. Diese Feststellungen werfen die Frage auf, wie und weshalb solch vergleichsweise geringe Neurotrophinmengen für die Regeneration geschädigter Neurone verantwortlich sein sollten. Plausibler erscheint daher eine andere Hypothese, die von einem indirekten Einfluß der Th2-Zellen auf das axonale Wachstum im Sinne von Regeneration oder Sprouting ausgeht. Hierbei kommt besonders eine indirekte Modulation der astrozytären sowie mikroglialen Neurotrophin-Sekretion in Betracht. So konnte bereits gezeigt werden, daß es nach einer entorhinalen Läsion zur Aktivierung von Astrozyten und Mikroglia (Gehrmann et al., 1991; Steward et al., 1993; Deller et al., 1997) sowie zur vermehrten Sekretion von Wachstumsfaktoren und Zytokinen (Kar et al., 1993; Lapchak et al., 1993; Morgan et al., 1993) im deafferenzierten Hippokampus kommt. Die astrozytäre NGF-Produktion kann dabei durch T-Zellen sowie deren Zytokine entscheidend beeinflusst werden. So bewirkten beispielsweise die Th2-Markerzytokine IL-4, IL5 und IL-10 einen Anstieg der astrozytären NGF-Sekretion (Awatsuji et al., 1993; Brodie, 1996; Brodie et al., 1998), während das Th1-Zytokin IFN- $\gamma$  die NGF-

Produktion der Astrozyten hemmte (Awatsuji et al., 1995; Brodie, 1996). Auch die direkte Kokultivierung von Astrozyten mit Th2-Zellen führte zu einer gesteigerten astrozytären NGF-Produktion (Øren et al., 2004). Zusätzlich können Neurotrophine und inflammatorische T-Zell-Zytokine, wie IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$ , die mikrogliale NGF-Produktion stimulieren (Fallon und Loughlin, 1993; Heese et al., 1998).

In der vorliegenden Arbeit stand jedoch die Hypothese von der indirekten Beeinflussung des axonalen Wachstums über eine Modulation der astrozytären Neurotrophin-Sekretion im Vordergrund, da Mikroglia im Vergleich zu Astrozyten und Neuronen eine untergeordnete Rolle in der NGF-Produktion spielen. Es wurde davon ausgegangen, daß auch in dem hier verwendeten Kokulturmodell bestimmte lösliche Th2-Faktoren die astrozytäre NGF-Sekretion steigern und das von Astrozyten produzierte NGF wiederum Neurone zum axonalen Auswachsen veranlaßt. Welche sezernierten Th2-Faktoren letztendlich für diese Stimulation des axonalen Wachstums verantwortlich sind und in welcher Art und Weise sie ihre Wirkung vermitteln, wurde im späteren Teil der Arbeit untersucht. Als mögliche Faktoren kommen hierbei in erster Linie die Th2-Markerzytokine IL-4, IL-5 und IL-10, aber auch IL-6 und IL-13 sowie die Neurotrophine NGF, BDNF, NT-3 und NT-4 in Betracht.

### **5.3.1.1 Neurotrophin-Expression**

Zunächst sollten jedoch Veränderungen der Neurotrophinlevel im Medium nach Kokultivierung der verletzten Hirnschnitte mit T-Zellen erfaßt werden. Dabei sollte insbesondere überprüft werden, ob die Kokultivierung mit Th2-Zellen auch in diesen Experimenten zu einer gesteigerten NGF-Sekretion führt. Die Analyse des Kollagen-Kokulturüberstandes ergab jedoch keine auswertbaren Meßergebnisse, da das Kollagen selbst einen Einfluß auf die Proteinbestimmungen ausübte und somit eine Verfälschung der Meßwerte bewirkte. Aus diesem Grund erfolgte der Einsatz eines weiteren Kokulturmodells, welches die Analyse kollagenfreier Überstände erlaubte. Auch in diesem Modell wurden verschiedene primäre T-Zellen mit mechanisch verletzten organotypischen entorhino-hippokampalen Gewebeschnitten kokultiviert, wobei die T-Zellen durch eine Membran physikalisch von den Explantaten getrennt waren. Die Analyse dieses Membran-Kokulturmediums bezüglich der NGF-, NT-3 sowie der NT-4-Konzentrationen ergab jedoch keinerlei Veränderungen der Neurotrophinlevel. Weder Th1- noch Th2-Zellen beeinflussten die Neurotrophin-Sekretion der verletzten Hirnschnitte im Medium. Die erwartete Hochregulation der NGF-Produktion durch Th2-Zellen konnte nicht bestätigt werden.

Dennoch schließen diese Ergebnisse eine indirekte Modulation der astrozytären Neurotrophin-Sekretion keinesfalls aus, sondern machen noch einmal deutlich, daß es sich bei der Th2-induzierten Stimulation des axonalen Wachstums um einen komplexen und viele Faktoren einschließenden Vorgang handeln muß. So ergab sich beispielsweise aus dem fehlenden Anstieg der Neurotrophin-Sekretion im Kokulturmedium die Frage nach einer Beeinflussung der Neurotrophin-Empfänglichkeit neuronaler Zellen, d.h. inwiefern die Modulation der Neurotrophin-Rezeptor-Expression in diesem Zusammenhang eine Rolle spielt. Unter anderem könnte solch eine Hochregulation der Neurotrophin-Rezeptor-Expression eine gesteigerte Bindung der Neurotrophine an ihre spezifischen Rezeptoren zur Folge haben, sodaß erhöhte Neurotrophinkonzentrationen im Kokulturmedium aus diesem Grund nicht mehr zu detektieren sind.

### **5.3.1.2 Neurotrophin-Rezeptor-Expression**

Um diese Vorgänge besser zu verstehen, wurde zusätzlich zur Neurotrophin-Sekretion im Kokulturmedium die Neurotrophin-Rezeptor-Expression an den verletzten Hirnschnitten immunhistochemisch analysiert. Auch diese Untersuchungen erfolgten an den Membran-Kokulturen, da eine immunhistochemische Aufarbeitung der Kollagen-Kokulturen nicht möglich war.

Ausgegangen wurde dabei von der Tatsache, daß Neurotrophine an spezifische Neurotrophin-Rezeptoren der Trk-Familie sowie an p75NTR binden und auf diese Weise ihre zahlreichen Wirkungen, insbesondere neuronales Überleben nach einer Verletzung, vermitteln (Barbacid, 1994; McDonald und Chao, 1995). Daraufhin konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, daß die Mehrzahl aller Neurone die Neurotrophin-Rezeptoren TrkA, TrkB, TrkC und p75NTR exprimieren und somit die Neurotrophin-Empfänglichkeit neuronaler Zellen gegeben ist. Anschließend wurde untersucht, ob es bei der Kokultivierung von verletzten Hirnschnitten mit T-Zellen zu einer Beeinflussung eben dieser Neurotrophin-Rezeptor-Expression kommt. Insbesondere sollte überprüft werden, ob Th2-Zellen die Neurotrophin-Empfänglichkeit neuronaler Zellen steigern können. Die immunhistochemische Analyse ergab einen signifikanten Anstieg der Neurotrophin-Rezeptor-Expression unter dem Einfluß von Th2-Zellen. Während die Rezeptoren TrkA, TrkB und TrkC ausschließlich von Th2-Zellen hochreguliert wurden, konnte die Expression von p75NTR sowohl von Th1- als auch von Th2-Zellen gesteigert werden. Diese Hochregulation des p75 Neurotrophin-Rezeptors durch beide T-Zell-Subtypen ist durchaus verständlich, da p75NTR nach neueren Erkenntnissen sowohl am Überleben von Nervenzellen als auch an apoptotischen Vorgängen

nach einer Verletzung beteiligt ist. Außerdem wird p75NTR eine bedeutende Rolle in der Regulation des neuronalen Wachstums zugeschrieben. Dabei ist p75NTR einerseits in der Lage, sich als Korezeptor an die Trk-Rezeptoren anzulagern und somit die Affinität der Neurotrophine gegenüber ihren spezifischen Trk-Rezeptoren zu steigern (Bibel et al., 1999; Brennan et al., 1999; Barker, 2004). Die gleichzeitige Hochregulation der Trk-Rezeptoren durch Th2-Zellen läßt eine gesteigerte Wirkung der Neurotrophine vermuten und kommt daher als Erklärung für die Th2-induzierte Stimulation des axonalen Wachstums in Betracht. Andererseits ist p75NTR im Kontext mit dem transmembranären Protein Sortilin aber auch in der Lage, mit hoher Affinität Vorstufen der Neurotrophine zu binden und auf diesem Wege neuronale Apoptose zu induzieren (Lee et al., 2001; Nykjaer et al., 2004; Barker, 2004; Kalb, 2005). Weiterhin kann p75NTR unter Ausbildung eines dreiteiligen Rezeptorkomplexes mit dem Nogo-Rezeptor und Lingo-1 wachstumshemmende Faktoren des ZNS binden und auf diesem Weg das neuronale Auswachsen regulieren (Barker, 2004). Im Zusammenhang mit der fehlenden Trk-Aktivierung bei der Kokultivierung mit Th1-Zellen ließe sich somit die Th1-induzierte Inhibition des axonalen Wachstums erklären.

Ob Th2-Zellen neben dieser Modulation der Neurotrophin-Empfänglichkeit auch die astrozytäre Neurotrophin-Sekretion steigern oder ob ein Th2-vermittelter Anstieg der astrozytären Neurotrophin-Produktion sogar erst der Auslöser für die beobachtete Rezeptor-Hochregulation ist, läßt sich nicht eindeutig sagen. Eine durch Th2-Zellen gesteigerte Expression neuronaler Neurotrophin-Rezeptoren könnte ihrerseits auch einen Anstieg der astrozytären Neurotrophin-Sekretion zur Folge haben. Es ist bisher also noch nicht vollständig geklärt, ob ein Zusammenhang zwischen der Neurotrophin-Rezeptor-Modulation und einer gesteigerten astrozytären Neurotrophin-Produktion besteht und in welcher Art und Weise sie sich gegenseitig beeinflussen.

Aufgrund dieser Befunde wurde anschließend überprüft, welche Rolle die Neurotrophin-Rezeptoren bei axonalen Auswachs Vorgängen in dem hier verwendeten Kollagen-Kokulturmodell spielen und ob ein Zusammenhang zwischen den bisher beobachteten Effekten besteht. Dabei sollte untersucht werden, ob das axonale Auswachsen, insbesondere die Förderung durch Th2-Zellen, über Neurotrophin-Rezeptoren vermittelt wird. Deshalb wurden mögliche Effekte des Neurotrophin-Rezeptorblockers K252a (Koizumi et al., 1988; Berg et al., 1992; Nye et al., 1992; Tapley et al., 1992; Ross et al., 1995) in den Kollagen-Kokulturen analysiert. Obwohl K252a ein nicht-selektiver Inhibitor der Tyrosin-Kinase-Aktivität ist, konnte davon ausgegangen werden, daß er in den hier verwendeten niedrigen Konzentrationen eine spezifische Blockierung der Neurotrophin-Rezeptoren TrkA, TrkB und

TrkC bewirkte und andere, ebenfalls über die Tyrosin-Kinase oder auch über die Protein-Kinase-C vermittelten Signaltransduktionen unbeeinflusst blieben (Moalem et al., 2000). Die Blockierungsversuche ergaben sowohl bei den Kontroll-Explantaten als auch bei den Kokultivierungen mit Th1- bzw. Th2-Zellen eine vollständige Eliminierung des axonalen Auswachsens. Diese Daten deuten darauf hin, daß das axonale Wachstum sowie die Th2-induzierte Stimulation dieses axonalen Auswachsens über die Neurotrophin-Rezeptoren der Trk-Familie reguliert werden. Sie machen außerdem noch einmal deutlich, daß die Neurotrophine NGF, BDNF, NT-3 und NT-4 maßgeblich an diesen axonalen Auswachs-vorgängen beteiligt sind, da sie ihre Wirkungen über die Tyrosin-Kinase-Rezeptoren vermitteln. Diese Befunde bestätigen die aus den Neurotrophin-Blockierungsexperimenten gewonnenen Erkenntnisse und liefern einen weiteren Beweis für die Beteiligung der Neurotrophine an axonalen Auswachs-vorgängen.

Die funktionsblockierende Wirkung von K252a wurde auch im visuellen System nach einer Sehnervquetschung bereits beschrieben (Moalem et al., 2000). Neuroprotektive Effekte autoimmuner MBP-spezifischer T-Zellen wurden durch die lokale Blockade der Tyrosin-Kinase-Rezeptoren mit K252a aufgehoben. Ob der neuroprotektive Effekt dabei auf der direkten Wirkung der T-Zell-Neurotrophine oder einer indirekten Beeinflussung der astroglialen sowie mikroglialen Neurotrophin-Sekretion durch T-Zell-Neurotrophine beruht, konnte auch in diesem Modell nicht eindeutig geklärt werden (Canossa et al., 1997; Kruttgen et al., 1998; Moalem et al., 2000).

Zusammenfassend zeigten die bisherigen Untersuchungen, daß nicht nur neuroprotektive sondern auch neuroregenerative Effekte, wie axonales Auswachsen nach einer Verletzung, über die Bindung der Neurotrophine an ihre spezifischen neuronalen Trk-Rezeptoren vermittelt werden und daß die Th2-induzierte Stimualtion des axonalen Wachstums auf eine Hochregulation dieser Neurotrophin-Rezeptor-Expression zurückzuführen ist. Die Zugabe von K252a resultiert jedoch in einer gleichzeitigen Blockierung aller Trk-Rezeptoren. Eine selektive Blockierung von TrkA, TrkB, TrkC und p75NTR war nicht Teil der vorliegenden Arbeit, ist aber Gegenstand weiterer Untersuchungen in dieser Arbeitsgruppe.

### **5.3.2. Zytokine**

Im nächsten Schritt sollte herausgefunden werden, welche löslichen T-Zell-Faktoren an den beobachteten Effekten bezüglich des axonalen Auswachsens nach einer Verletzung beteiligt sind. Zuerst wurde der Einfluß der T-Zell-Markerzytokine in den Kollagen-Kokulturen analysiert. Weder die Inkubation der entorhinalen Kortex-Explantate mit dem Th1-Zytokin

IFN- $\gamma$  noch mit dem Th2-Zytokin IL-4 wiesen jedoch eine meßbare Beeinflussung des axonalen Wachstums auf. Dabei spielte es keine Rolle, ob sich die rekombinanten Proteine anstelle der T-Zellen im Kollagen oder direkt im Inkubationsmedium befanden und in welcher Konzentration sie eingesetzt wurden. Auch die Neurotrophin-Rezeptor-Expression in den Membran-Kokulturen blieb bei der Zugabe von IFN- $\gamma$  und IL-4 in den angegebenen Konzentrationen unbeeinflusst. Somit ließen sich die Effekte der T-Zellen in Bezug auf das axonale Wachstum und die Neurotrophin-Rezeptor-Expression mit den Markerzytokinen IFN- $\gamma$  und IL-4 nicht reproduzieren. Auch in anderen Versuchen wurden bereits ähnliche Effekte beobachtet. So konnte IFN- $\gamma$  in organotypischen entorhino-hippokampalen Schnittkulturen nicht denselben Mikroglia-aktivierenden und Phagozytose-induzierenden Effekt wie Th1-Zellen erzielen (Wolf et al., 2002).

Dies läßt vermuten, daß die genannten Proteine nicht allein für die beobachteten Effekte verantwortlich sind, sondern daß es sich um ein Zusammenspiel mehrerer Faktoren handeln muß. Wie schon die Kokultivierungen der Hirnschnitte mit den T-Zellkulturüberständen gezeigt haben, scheint die Anwesenheit der T-Zellen von unerläßlicher Bedeutung zu sein. Auf welche Art und Weise die T-Zellen jedoch mit dem verletzten Hirngewebe kommunizieren und welche Interaktionen an den beobachteten Effekten beteiligt sind, ist noch nicht verstanden.

Die Rolle rekombinanter Zytokine bei degenerativen, protektiven und regenerativen Prozessen im ZNS wird derzeit kontrovers diskutiert. Neben dem neuronalen Entwicklungsstatus scheinen dabei die Zytokine selbst, ihre eingesetzte Konzentration sowie die Dauer ihrer Kokultivierung mit den Neuronen von großer Bedeutung zu sein (Araujo und Cotman, 1993). So konnte für IL-1 in niedrigen Konzentrationen (nM-Bereich) ein neuroprotektiver und in hoher Dosierung ( $\mu$ M-Bereich) ein neurodegenerativer Effekt sowohl *in vitro* als auch *in vivo* nachgewiesen werden (Rothwell und Strijbos, 1995). Die Zytokine IL-4, IL-5, IL-7 und IL-8 konnten in niedrigen Konzentrationen (nM/ $\mu$ M-Bereich) das Überleben primärer Neuronenkulturen unabhängig von der Dauer der Kokultivierung fördern. Im Gegensatz dazu wirkten sie in hoher Dosierung (mM-Bereich) und längerer Exposition neurodegenerativ (Araujo, 1992; Araujo und Cotman, 1993). Die Zytokine IL-6 und IL-13 zeigten hingegen unabhängig von ihrer Konzentration über einen kurzen Zeitraum keinen Einfluß auf das neuronale Überleben, bei langer Kokultivierungsdauer reduzierten sie jedoch das neuronale Überleben (Araujo und Cotman, 1993).

Obwohl die in dieser Arbeit eingesetzten IL-4-Konzentrationen den eben beschriebenen neuroprotektiv wirkenden Konzentrationen (pM/nM-Bereich) entsprachen, konnte in den hier

verwendeten Modellen kein neuroregenerativer Effekt beobachtet werden. Auch eine Kokultivierung mit rekombinanten Neurotrophinen in diesen Konzentrationen übte keinen Einfluß auf das axonale Wachstum und die Neurotrophin-Rezeptor-Expression aus. Bei diesen Vergleichen sollte jedoch nicht außer acht gelassen werden, daß sich die in den zitierten Veröffentlichungen beschriebenen neuroprotektiven bzw. neurodegenerativen Effekte auf die Quantifizierung überlebender Neurone in Dissoziationskulturen beschränkten. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen daher vermuten, daß die Kokultivierung entorhinaler bzw. entorhino-hippokampaler Gewebeschnitte mit rekombinanten Proteinen weitaus komplexere Systeme als die Kokultivierung der Proteine mit primären Neuronen darstellen. Andererseits kann aber davon ausgegangen werden, daß neuronales Überleben eine wichtige Grundvoraussetzung und somit von großer Bedeutung für die weitere Beurteilung axonalen Wachstums im Sinne einer Neuroregeneration oder Sprouting ist.

Eine Beteiligung der T-Zell-Markerzytokine an axonalen Auswuchsvorgängen kann dennoch nicht vollständig ausgeschlossen werden. Möglicherweise waren die eingesetzten Zytokin- und Neurotrophinkonzentrationen zu gering. So konnte von Prang und Mitarbeitern (2001) gezeigt werden, daß NT-4 in einer noch höheren Konzentration von 500 ng/ml die Regeneration entorhinaler Fasern in den organotypischen entorhino-hippokampalen Schnittkulturen fördert. Erste Hinweise liefern diesbezüglich auch Beobachtungen aus der eigenen Arbeitsgruppe. Diese belegen positive Effekte von IL-4 in einer Konzentration von 500 ng/ml auf das axonale Einwachsen entorhinaler Fasern in den Hippokampus (persönliche Mitteilung von Daniel Hechler). Bei der Beurteilung des Auswachsens oder Einwachsens von Nervenfasern sollte jedoch berücksichtigt werden, daß die organotypischen Schnittkulturmodelle ihrerseits strukturelle Unterschiede aufweisen. So sind in den entorhino-hippokampalen Gewebeschnitten sowohl die Ursprungsneurone des Tractus perforans im EC als auch seine Terminationsgebiete im Hippokampus enthalten. Bei den entorhinalen Schnittkulturen wurde hingegen der EC vom Hippokampus getrennt, sodaß hier die Zielzellen des Tractus perforans im Hippokampus fehlen.

Um allerdings eine wirklich eindeutige Aussage über die Beteiligung der T-Zell-Markerzytokine an axonalen Auswuchsvorgängen treffen zu können, müßte außerdem eine funktionelle Blockade von IFN- $\gamma$  und IL-4 sowohl in den Kollagen- als auch in den Membran-Kokultivierungen mit T-Zellen erfolgen.

#### 5.4. Einfluß der T-Lymphozyten auf Reorganisationsprozesse *in vivo*

Im letzten Teil der Arbeit sollte überprüft werden, ob sich die Ergebnisse dieser *in vitro* Kokulturmodelle bezüglich des axonalen Wachstums auch auf *in vivo* Situationen übertragen lassen. Deshalb wurde das axonale Auswachsen unter dem Einfluß von T-Zellen am Modell der entorhinalen Kortex-Läsion (ECL) näher untersucht.

Verletzungen des ZNS können in dem überlebenden Gewebe nicht nur zur Ausbildung eines Sekundärschadens, sondern auch zu Reorganisationsprozessen, wie der Regeneration geschädigter Nervenfasern und reaktivem Sprouting intakter Axonendigungen sowie zur Errichtung neuer synaptischer Verbindungen führen (Steward, 1991; Frotscher et al., 1997). Diese Phänomene lassen sich *in vivo* besonders gut an dem bereits etablierten Modellsystem des Tractus perforans, der Hauptprojektion des entorhinalen Kortex zum Hippokampus, vereinfacht betrachten. Fasern dieses Traktes haben ihren Ursprung in den Schichten II und III des EC und terminieren spezifisch an den distalen Körnerzeldendriten des Gyrus dentatus in der äußeren Molekularschicht sowie im Stratum lacunosum-moleculare der CA1- und CA3-Region (Amaral und Witter, 1995). Bei einer ECL wird dieser Tractus perforans mechanisch durchtrennt, was zu einer schichtenspezifischen Denervierung des Hippokampus führt. Diese Durchtrennung resultiert in einer massiven Rückbildung der distalen Dendritenabschnitte denervierter Neurone in der OML (Nitsch und Frotscher, 1992; Einstein et al., 1994; Diekmann et al., 1996) und beschränkt außerdem die Fähigkeit der überlebenden wiederauswachsenden Axone zur Ausbildung neuer und funktioneller synaptischer Verbindungen während der Synaptogenese (Clusmann et al., 1994). Im Gegensatz dazu bleibt die innere Molekularschicht des Gyrus dentatus, in welcher die Assoziations- und Kommissurenfasern endigen und dort auf die proximalen Dendritenabschnitte der Körnerzellen treffen, intakt. Es konnte bereits gezeigt werden, daß die ECL auch von einem Sprouting dieser intakten Axonendigungen begleitet wird (Deller et al., 1995; Savaskan und Nitsch, 2001). Dabei sind die klassischen glutamergen C/A-Fasern in der Lage, innerhalb ihrer Terminationszone Axonkollaterale auszubilden und die IML zu vergrößern. Gleichzeitig wurde aber auch ein verstärktes, ebenfalls schichtenspezifisches Sprouting von GABAergen kommissuralen Fasern in der OML beobachtet (Deller et al., 2001). Trotz dieser Befunde kann auch ein translaminares Sprouting der C/A Fasern von der IML in die OML nicht vollständig ausgeschlossen werden. Die Axone sind somit nicht nur während der Entwicklung (Super und Soriano, 1994; Goodman, 1996), sondern auch während des axonalen Sproutings (Cotman et al., 1977; Frotscher et al., 1997) in der Lage, unter dem Einfluß von Wegweiser-molekülen (Stein und Tessier-Lavigne, 2001) über lange Distanzen ihr Ziel zu

finden (Tessier-Lavigne und Goodman, 1996). Auf diese Weise trägt reaktives Sprouting nach einer ECL zur Reinnervation denervierter Neurone des Hippokampus bei und kann daher auch als funktionelle Regeneration bezeichnet werden (Frotscher et al., 1997).

Zu den an diesen Vorgängen maßgeblich beteiligten Molekülen gehört auch GAP43 (Benowitz und Routtenberg, 1997). GAP43 ist ein Membranprotein, welches vor allem von sich entwickelnden und regenerierenden Neuronen exprimiert wird und somit eine wichtige Rolle bei den beschriebenen axonalen Auswuchsvorgängen und der Ausbildung neuer synaptischer Verbindungen spielt. Die höchste Expression von GAP43 wurde im ZNS während der ersten 2 Wochen nach der Geburt ermittelt. Dies trifft zeitlich genau mit der Ausbildung der axonalen Verzweigungen und synaptischen Verbindungen (Holtmaat et al., 1995) sowie der Plastizität der Nervenzellen zusammen (Harris und Teyler, 1984). Einige Neuronenpopulationen sind jedoch in der Lage, die Fähigkeit zur GAP43-Expression auch über jenen Zeitraum hinaus beizubehalten (Jacobsen et al., 1986; Oestreicher und Gipsen, 1986; McGuire et al., 1988; Meberg und Routtenberg, 1991) und auf diesem Wege an den Reorganisationsprozessen nach einer Verletzung im ZNS mitzuwirken. So konnte bereits gezeigt werden, daß die im ZNS stark begrenzte neuronale Regeneration von einer massiven GAP43-Hochregulation begleitet wird (Campbell et al., 1991; Schaden et al., 1994). Insbesondere kommt es nach einer Läsion des Tractus perforans neben dem beobachteten Sprouting intakter Neurone (Lynch et al., 1975) zu einer verstärkten GAP43-Expression (Benowitz et al., 1990; Lin et al., 1992; Meberg et al., 1993). Die Analyse dieser GAP43-Expression eignet sich daher besonders gut als axonaler Sprouting-Marker und wurde deshalb auch in der vorliegenden Arbeit zur Beurteilung neuronaler Reorganisationsprozesse nach einer ECL herangezogen.

In dieser Arbeit wurden direkt in die Läsionsstelle der ECL zusätzlich Th1- oder Th2-Zellen im Vergleich zu PBS injiziert, um deren Einfluß auf das axonale Auswachsen zu untersuchen. Die Versuche haben ergeben, daß die Injektion von Th2-Zellen im Gegensatz zu Th1-Zellen und PBS auf der Läsionsseite zu einer signifikanten Zunahme der GAP43-Expression in der inneren Molekularschicht des Gyrus dentatus führte. Ob es sich dabei tatsächlich um reaktives Sprouting oder zum Teil auch um Regeneration geschädigter Nervenfasern handelt, läßt sich mit dieser Methode nicht eindeutig sagen. Dennoch haben die bisherigen Untersuchungen gezeigt, daß Th2-Zellen auch *in vivo* axonales Wachstum stimulieren und an Reorganisationsvorgängen im ZNS beteiligt sind.

An dieser Stelle muß jedoch erwähnt werden, daß diese Versuche mit Mäusen aus der konventionellen Tierhaltung durchgeführt wurden und sich mit Tieren aus der SPF-Haltung

nicht reproduzieren ließen. Da solche Phänomene auch von anderen Arbeitsgruppen beschrieben wurden, werfen sie – trotz ihres im ersten Moment negativ erscheinenden Eindruckes – neue interessante Fragestellungen in Bezug auf die Beteiligung des gesamten murinen Immunstatus an den beobachteten Effekten auf.

Weiterhin sollte kritisch bemerkt werden, daß solch eine Injektion von T-Zellen in die Läsionsstelle im ZNS allein vom Versuchsaufbau unphysiologisch ist und auch therapeutisch schwer zu realisieren sein wird. Außerdem ist die injizierte Menge an T-Zellen so hoch gewählt, daß sie keinesfalls den physiologischen Zuständen nach einer Verletzung im ZNS entspricht. Trotzdem geben diese Experimente einen ersten Eindruck, wie T-Zellen axonale Auswachs Vorgänge *in vivo* beeinflussen können.

Die Tatsache, daß es nach einer Läsion zur Einwanderung von aktivierten T-Zellen in das ZNS kommen kann (Wekerle et al., 1986; Hickey et al., 1991), bietet jedoch einen weiteren Ansatzpunkt für den experimentellen Versuchsaufbau. Ließe sich durch Immunisierung der Tiere eine systemische periphere Th1- oder Th2- Immunantwort auslösen, könnte auf diesem Weg eine gezielte Einwanderung von aktivierten Th1- bzw. Th2-Zellen nach einer ECL in das ZNS erreicht werden. Außerdem besteht die Möglichkeit, daß die T-Zellen bereits in der Peripherie mit anderen Zellen des Immunsystems in Kontakt treten und diese wechselseitigen Beeinflussungen bei der Betrachtung neuronaler Reorganisationsprozesse wiederum von Bedeutung sind. Dieses *in vivo* Modell stellt eine weitaus physiologischere Variante zur Analyse der beschriebenen Vorgänge dar und bietet daher einen zusätzlichen Ausgangspunkt für die fortführenden Experimente sowie die Aufklärung der verantwortlichen Hintergründe und Mechanismen.

## **5.5 Therapeutische Anwendung**

Therapeutische Maßnahmen nach einer akuten Verletzung des ZNS oder bei chronischen neuroinflammatorischen Erkrankungen konzentrieren sich derzeit auf die Stimulation der neuronalen Regeneration (Caroni und Schwab, 1988; Neumann und Woolf, 1999) und die Neuroprotektion initial überlebender Neurone (Benveniste, 1997a; Emsley und Tyrrell, 2002; Morganti-Kossmann et al. 2002). Gerade bei neuropathologischen Ereignissen erscheinen therapeutische Eingriffe in die sekundären Schadensprozesse äußerst sinnvoll, da vor allem diese Sekundärschäden für die Entstehung des jeweiligen Krankheitsbildes durch Ausfälle bestimmter Hirnbereiche verantwortlich sind. Die Mechanismen, die solch einer sekundären Degeneration unterliegen, sind jedoch ausgesprochen vielseitig: Veränderungen des Neurotransmitter-, Ionen- und Energiehaushaltes, biochemische und metabolische

Veränderungen der Sauerstoff- und Glucosenutzung, gesteigerte Bildung freier Radikale, verminderte Bildung von Wachstumsfaktoren, die Aktivierung von Mikroglia sowie die Beeinträchtigung der Blutversorgung. Dementsprechend vielseitig sind auch die Möglichkeiten, an denen neue therapeutische Strategien ansetzen können (Schwartz und Kipnis, 2004). Die Schwierigkeit besteht jedoch darin, daß viele der beteiligten Faktoren nicht nur schädliche, sondern in physiologischen Konzentrationen auch nützliche Einflüsse auf die Erhaltung des ZNS ausüben, sodaß sich das komplette Ausschalten eines Faktors ebenso negativ auswirken würde. Demgegenüber kann auch eine Überdosierung für das neuronale Überleben essentieller Faktoren, wie z.B. BDNF, neurotoxisch wirken (Takumida und Anniko, 2002). Dies verdeutlicht, daß das pharmakologische Eingreifen in solche Verletzungsprozesse ein genaues Abwägen zwischen Schaden und Nutzen erforderlich macht. Eine zusätzliche Schwierigkeit in der Behandlung neurologischer Krankheitsbilder besteht darin, daß die Degeneration trotz umfangreicher therapeutischer Maßnahmen bei vielen dieser Erkrankungen weiterhin fortschreitet (Hirsch, 1999; Weinreb und Levin, 1999; Schwartz und Yoles, 2000; Monsonigo und Weiner, 2003).

Im Rahmen dieser Arbeit richtete sich der Blick zukünftiger therapeutischer Anwendungen verstärkt auf die Beeinflussung immunologisch aktiver Faktoren. Zum einen kann dabei die Immunantwort von den in das Schadensgebiet infiltrierenden Zellen, z.B. Mikroglia, unterdrückt werden. Zum anderen kann aber auch die protektive Autoimmunität einwandernder T-Zellen gefördert werden, wobei zwischen einer aktiven Immunisierung mit ZNS-spezifischen Peptiden und einer passiven Immunisierung mit ZNS-spezifischen T-Zellen unterschieden wird.

So konnten verschiedene Arbeitsgruppen bereits zeigen, daß die Immunisierung mit ZNS-spezifischen Peptiden sowohl neuroprotektive als auch neuroregenerative Effekte induzierte (Huang et al., 1999; Sicotte et al., 2003; Hofstetter et al., 2003; Merkler et al., 2003; Byram et al., 2004). Da jedoch eine aktive Immunisierung häufig von der Ausbildung einer EAE-ähnlichen Autoimmunerkrankung der Tiere begleitet wird, spielt auch hier die eingesetzte Peptidmenge eine entscheidende Rolle. Eine zu hohe Dosis könnte zu solch einer starken EAE-Ausbildung führen, daß kein protektiver oder regenerativer Effekt mehr zu beobachten ist (Moore et al., 1985, 1987; Hauben et al., 2001).

Das Boostern dieser Autoimmunreaktion scheint eine vielversprechende Möglichkeit zur Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen zu sein. Hierfür kommen sowohl schwache Agonisten ZNS-spezifischer Peptide als auch die Peptide selbst als eine Art Impfstoff in Betracht (Kipnis et al., 2000, 2002b, Hauben et al., 2001). Solch ein schwacher Agonist ist

z.B. Copolymer-1 (Cop-1, Copaxone), welcher bereits zur Behandlung der MS eingesetzt wird (Sela, 1999). Cop-1 ist in der Lage, eine große Breite autoimmuner T-Zellen zu aktivieren (Duda et al., 2000), die anschließend in das Schadensgebiet im ZNS einwandern, dort reaktiviert werden und ihre spezifischen Wirkungen vermitteln. Im Tiermodell wirkten Cop-1-reaktive T-Zellen nicht nur nach einer akuten Verletzung sondern auch bei chronischen neurodegenerativen Erkrankungen neuroprotektiv. Dabei erlaubte die große Breite der aktivierten T-Zellen einen ausgesprochen vielseitigen Einsatz bei den verschiedensten neurologischen Erkrankungen (Angelov et al., 2003; Bakalash et al., 2003; Kipnis et al., 2003; Benner et al., 2004).

Auch eine passive Immunisierung mit ZNS-spezifischen T-Zellen wirkt sich neuroprotektiv auf Verletzungen im ZNS aus. So verhinderte die Injektion aktivierter MBP-spezifischer T-Zellen nach verschiedenen traumatischen Verletzungen im Sehnerv und im Rückenmark die Ausbreitung des Primärschadens und damit die Ausbildung des Sekundärschadens (Moalem et al., 1999; Hauben et al., 2000a, b). Allerdings berichten auch diese Untersuchungen von einer – wenn auch transienten – EAE-ähnlichen Autoimmunerkrankung der Tiere (Moalem et al., 1999; Cohen und Schwartz 2000) und machen daher eine genaue Dosierung der T-Zellen erforderlich. Außerdem wurde in diesen Arbeiten keine Differenzierung der T-Zellen in Th1 und Th2 vorgenommen, sodaß entweder von Th0-Zellen oder von einer Mischpopulation ausgegangen werden mußte. Aus diesem Grund war bisher nur diese allgemeine und wenig detaillierte Aussage über den Effekt von T-Zellen auf Neuroprotektion und Neuroregeneration möglich. Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe deuten jedoch darauf hin, daß der neuroprotektive Effekt eher den T-Zellen vom Subtyp Th2 zuzuordnen ist (Wolf et al., 2002).

Außerdem wird die Rolle regulatorischer T-Zellen im Zusammenhang mit der Behandlung neurologischer Erkrankungen diskutiert. Regulatorische T-Zellen sind in der Lage, autoimmune T-Zellen in einer Art Toleranz-Status zu halten (Van den Beemd et al., 2000). Dadurch verhindern sie auf der einen Seite die spontane Ausbildung autoimmuner Erkrankungen (McHugh et al., 2001), unterdrücken aber auf der anderen Seite auch den positiven neuroprotektiven Effekt autoimmuner T-Zellen (Kipnis et al., 2002a). Im Falle einer vollständigen Abwesenheit protektiv wirkender T-Lymphozyten kann jedoch auch den regulatorischen T-Zellen selbst ein neuroprotektives Potential zugeschrieben werden (Frenkel et al., 2003; Monsonigo et al., 2003). Aufgrund dieser Tatsachen sollte genau zwischen einer Abschwächung oder Förderung der regulatorischen T-Zellen abgewogen werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte durch funktionelle und mechanistische Untersuchungen erstmals gezeigt werden, daß Th2-Zellen nicht nur einen neuroprotektiven, sondern sogar auch einen wachstumsfördernden Einfluß nach einer Verletzung im ZNS ausüben. Dabei waren sie sowohl *in vitro* als auch *in vivo* in der Lage, das Auswachsen von Nervenfasern zu induzieren. Da für Th2-Zellen außerdem kein EAE-induzierender Effekt nachgewiesen werden konnte (Cua et al., 1995), stellt die Injektion von Th2-Zellen einen vielversprechenden Ansatzpunkt in der Therapie neurologischer Erkrankungen dar. Auf diese Weise könnte eine Ausbreitung des Schadens verhindert und eine Regeneration verletzter Nervenzellen ohne den Nebeneffekt einer autoimmunen Reaktion erreicht werden.

Auch die von T-Zellen sezernierten Faktoren, z.B. Zytokine, kommen hierbei als Therapie nach einer Verletzung im ZNS in Betracht, wobei die eingesetzten Konzentration eine wichtige Rolle spielen (Araujo, 1992; Araujo und Cotman, 1993; Rothwell und Strijbos, 1995). Die Identifikation und funktionelle Charakterisierung der an axonalen Wachstumsvorgängen beteiligten sezernierten Faktoren sollte daher Gegenstand weiterer Untersuchungen sein und könnte zur Entwicklung neuer hochpotenter Medikamente in der Therapie neurologischer Erkrankungen beitragen.