

## **Einleitung**

Das Immunsystem des menschlichen Organismus ist verantwortlich für die Abwehr von Gefahren durch eindringende Krankheitserreger wie Bakterien, Viren und Pilze, die Verteidigung gegen aus körpereigenen Zellen entstehenden Tumoren, sowie für den Schutz vor Fremdstoffen. Um dieser Funktion gerecht zu werden, müssen das unspezifische Immunsystem mit seinen Komponenten, wie phagozytierenden Zellen (z.B. Makrophagen), natürlichen Killerzellen und dem Komplementsystem mit dem spezifischen Immunsystem und dessen Komponenten, wie Lymphozyten (z.B. T-Zellen) und Plasmazellen (Produktion von Antikörpern) aufeinander abgestimmt und entsprechend der Gegebenheiten und des Ortes der Immunantwort moduliert werden.

Das ZNS ist ein immunprivilegiertes Organ, ausgedrückt durch eine reduzierte Aktivierbarkeit des spezifischen und unspezifischen Immunsystems. Dies ist notwendig, da das ZNS ein Ort mit hochgradig differenziertem Gewebe aus schlecht regenerationsfähigen, postmitotischen Zellen ist. So wird wohl die Persistenz des Herpes Zoster Virus in Ganglienzellen toleriert, da die Elimination der Viren schwere neurologische Defizite nach sich ziehen würde (Kwidzinski et al. 2003, Bechmann 2005).

Mit einem interessanten Experiment verdeutlichte Medawar 1948 die Besonderheiten des Immunsystems innerhalb des ZNS. Er zeigte, dass ein allogenetisches Hauttransplantat im ZNS nur dann abgestoßen wurde, wenn Haut auch außerhalb des ZNS transplantiert wurde. Somit konnte das Transplantat im ZNS allein keine Immunantwort induzieren, jedoch zeigte sich nach peripherer Stimulation, dass das ZNS nicht außerhalb der Reichweite des Immunsystems liegt. Diese Daten lassen sich im Zusammenhang sehen mit der peripheren Stimulation durch eine Virusinfektion, welche zu einer Symptomexazerbation bei Patienten mit Multipler Sklerose führen kann (Sibley et al. 1985). Die periphere Injektion von Gehirnhomogenisat zusammen mit einem Adjuvans (Mykobakterien in einer Öl-in-Wasser Emulsion) führt zu einer Enzephalitis mit Demyelinisierung und MS ähnlichen Symptomen in Meerschweinchen (Freund et al. 1947).

Das Ausbleiben einer Abstoßungsreaktion im ZNS wurde zunächst mit den zwei herausragenden morphologischen Besonderheiten des ZNS erklärt: Der efferente Arm des Immunsystems sollte durch die Existenz der Blut-Hirn-Schranke und der afferente Arm durch das Fehlen klassischer lymphatischer Drainagewege blockiert sein (Medawar 1948). Das Immunprivileg des ZNS, definiert als Toleranz gegenüber Transplantaten (Billingham and Boswell 1953), wurde deshalb oft mit einem Status immunologischer Ignoranz gleichgesetzt (Bechmann 2005).

Dass die Blut-Hirn-Schranke keine Barriere ist, um Leukozyten vom Eindringen in das ZNS abzuhalten, konnte mittlerweile mehrfach dargestellt werden. Unter physiologischen Bedingungen kommt es zu einer ständigen Patrouille von Lymphozyten im intakten ZNS (Hickey et al. 1991, Wekerle 1993, Hickey 2001). Aber auch während einer Entzündung erhöht sich die Anzahl anwesender Lymphozyten stark (Qing et al. 2000). Bisher wurden drei wichtige Wege erkannt, auf denen Lymphozyten vom Blut in das ZNS gelangen können (Ransohoff et al. 2003, Engelhardt and Ransohoff 2005): Über den Plexus choroideus in den Liquor, über den subarachnoidalen Raum und über perivaskuläre Räume. Mit Hilfe von Mauschimären konnten Hickey und Kamura (1988) zeigen, dass aus dem Blut stammende Monozyten in der Lage sind, sich in perivaskulären Räumen niederzulassen. Unter physiologischen Bedingungen zeigt sich sogar eine langsame Ergänzung residenter Mikroglia durch aus dem Blut stammende monozytäre Zellen (Lawson et al. 1992, Priller et al. 2001). Auch unter pathologischen Bedingungen kommt es zu einer Erhöhung der Leukozytenzahl im ZNS (Soares et al. 1995, Hausmann et al. 1999).

In unserer Arbeitsgruppe wird die ECL zum Studium immunologisch-inflammatorischer Vorgänge im ZNS genutzt. Stereotaktische Durchtrennung des Tractus perforans durch eine ECL stellt eine wichtige experimentelle Untersuchungsmethode zum Studium der plastischen Umgestaltung als Antwort auf die Deafferenzierung kortikaler Schichten dar. Der Tractus perforans entspringt aus den Zellen der zweiten und dritten Schicht des entorhinalen Kortex und endet an den distalen Segmenten von Körnerzellendriten der mittleren und äußeren Molekularschicht des Gyrus dentatus. Diese werden bei einer ECL spezifisch denerviert. Die ECL ist eine etablierte Methode zur Untersuchung axonaler Sprossung (Deller et al. 2001) und inflammatorischer Antworten denervierter kortikaler Schichten (Jensen et al. 1994, Jensen et al. 1997). Dem geht eine starke Reaktion von Astrozyten und Mikroglia voraus, welche in den Schichten axonaler Degeneration akkumulieren (Jensen et al. 1994, Bechmann and Nitsch 1997). Ungefähr drei Tage nach einer ECL kommt es zu einem Maximum der absoluten Anzahl von Mikroglia/Makrophagen innerhalb der Zonen axonaler Degeneration (Hailer et al. 1999). In Studien mit intravenöser Injektion des Fluoreszenzfarbstoffes DiI, welcher an Cholesterinpartikel gekoppelt war, fanden Fagan und Gage 1994 keine Rekrutierung peripherer Monozyten in die Zonen axonaler Degeneration. Deshalb wurde die Akkumulation glialer Zellen bisher nur auf eine Migration mikroglialer Zellen (Gall et al. 1979, Rappert et al. 2004) und deren lokaler Proliferation zurückgeführt (Gall et al. 1979, Jensen et al. 1994, Hailer et al. 1999). Eine Infiltration monozytärer Zellen über die Blut-

Hirn-Schranke wurde somit ausgeschlossen, jedoch zeigte sich nach Entwicklung chimärer Mäuse, deren Knochenmarkszellen GFP exprimieren, dass es in vielen experimentellen Setups zu einer Infiltration peripherer Monozyten kommt (Priller et al. 2001, Beck et al. 2003). Deshalb untersuchten wir zum einen mit Hilfe dieser chimären Mäuse und zum anderen mit dem Fluoreszenzfarbstoff CFDA die Infiltration monozytärer Zellen über die Blut-Hirn-Schranke im Modell der ECL erneut.

Das Schicksal der Leukozyten nach Infiltration des Parenchyms ist ebenfalls noch nicht ausreichend geklärt. Zum einen kommt es zur Apoptose von T-Zellen über die Expression des Todesliganden FasL (Bechmann et al. 1999), zum anderen konnte das Auftauchen von, mit 3H-Cytidin markierten, intraparenchymal injizierten Lymphozyten in den tiefen Halslymphknoten 24 Stunden nach Injektion in das ZNS gezeigt werden (Oehmichen et al. 1979). Des Weiteren folgt auf die oben erwähnte Erhöhung der absoluten Anzahl der Mikroglia/Monozyten nach ECL ein Absinken der Anzahl auf das vor-läsionale Niveau innerhalb von 30 Tagen nach Läsion (Jensen et al. 1994, Hailer et al. 1999). Da wir im Laufe unserer Forschungsarbeiten zeigen konnten, dass es zu einer Infiltration peripherer monozytärer Zellen in die Zonen axonaler Degeneration kommt, stellte sich für uns ebenfalls die Frage, ob Monozyten oder andere Leukozytenpopulationen (z.B. Lymphozyten) in der Lage sind, aus dem ZNS wieder zu emigrieren.

Die Wege aus dem ZNS für Zellen, vor allem unter dem Gesichtspunkt des oben genannten Fehlens von lymphatischen Drainagewegen, sind bisher wenig untersucht. Mögliche Routen wurden bisher für interstitielle Flüssigkeit (Weller et al. 1992), Indikatoren (Boulton et al. 1999) und Antigene (Harling-Berg et al. 1999) gezeigt. Sämtliche Hirnnerven, als mögliche Leitungsbahnen aus dem ZNS heraus, sowie alle Spinalnerven bieten sich als mögliche Routen aus dem ZNS an (Cserr and Knopf 1992, Weller et al. 1996). Eine Sonderstellung kommt dabei dem Nervus olfactorius zu. Der Bulbus olfactorius, liegt direkt über der Lamina cribrosa und dessen Nervenfasern enden im Riechepithel der Nasenschleimhaut. Somit besteht hier über die nasale Mukosa ein Anschluss zur Peripherie und damit zu zervikalen LK. In einem proof-of-principle Experiment sollte zunächst für Lymphozyten diese mögliche Migrationsroute untersucht werden.

## **Zielstellung**

Die vorliegende Dissertation widmet sich Fragestellungen im Rahmen der Grundlagenforschung zur Funktionsweise des Immunsystems bezüglich seines efferenten und afferenten Armes im ZNS. Hierbei wurden für Leukozytensubpopulationen die Invasion in und die Emigration aus dem ZNS untersucht.

Wir konnten zunächst zeigen, dass in knochenmarktransplantierten Mäusen zirkulierende monozytäre GFP<sup>+</sup> Zellen in Zonen axonaler Degeneration infiltrieren, wo sie die typische Morphologie ramifizierter Mikroglia annehmen. Hierbei stellte sich die Frage, ob die gefundene Rekrutierung Ursache der zuvor erfolgten Radiatio des Knochenmarkes bzw. ein Artefakt des GFP-Knochenmarktransplantates waren. Um zu prüfen ob dies der Fall ist, sollten C57 black6 Mäusen der Fluoreszenzfarbstoff 6-Carboxylfluorescein Diacetat (CFDA) in die Milz injiziert, 24h später die Tiere mittels ECL lädiert und weitere 48h später die Hirne der Tiere histologisch untersucht werden.

Bezüglich der Emigration von Leukozyten aus dem ZNS sollten mögliche Drainagewege von Lymphozyten morphologisch dargestellt werden. Dazu wurden transgenen Mäusen, welche das GFP unter der Kontrolle des  $\beta$ -Actin Promoters in allen Zellen exprimieren, die T-Zellen entnommen. Nach Aktivierung dieser Zellen und anschließender Isolierung CD4<sup>+</sup> T-Zellen sollten diese in C57 black6 Mäuse, welche den genetischen Hintergrund der GFP-Tiere bilden, injiziert werden. Zur Darstellung der CD4<sup>+</sup> T-Zellen musste zunächst ein Protokoll etabliert werden, um ganze Köpfe und Häuse von Mäusen histologisch aufarbeiten zu können und dabei den verschiedenen Geweben von hartem Knochen bis hin zum weichen Bindegewebe gerecht zu werden. Es sollte ein Zeitschema des Auftauchens der T-Zellen in den LK charakterisiert und der Weg der Lymphozyten morphologisch dargestellt werden.

## **Methodik**

### Tiere:

Homozygote und heterozygote sechs Wochen alte Mäuse, die GFP unter der Kontrolle des  $\beta$ -Actin Promoters in allen Zellen exprimieren, wurden für die Isolierung GFP positiver T-Zellen und ausgewachsene C57 black6 Mäuse für die Injektionen der Zellen, verwendet. Sechs bis acht Wochen alte C57 black6 Mäuse wurden für die Injektionen von CFDA in die Milz verwendet. Die Tiere waren unter standardisierten Bedingungen untergebracht und die Tierschutzbestimmungen des Landes Berlin wurden eingehalten.

### T-Zellpräparation:

Nach kraniozervikaler Dislokation wurden den GFP Mäusen die Hals-, Lenden-, Bauch- und Achsellymphknoten sowie die Milz entnommen. Mit einem Nylonzellsieb (70 $\mu$ m, von Becton, Dickinson und Company [BD]) wurde der Zellverband aufgelöst und die Zellen in RPMI-1640 (Gibco Life Technologies) gewaschen. Zur Entfernung der Erythrozyten aus der Zellsuspension wurden diese durch eine fünfminütige Inkubation von 0.83% NH<sub>4</sub>Cl bei Raumtemperatur mittels Hypoosmose zum Platzen gebracht. Die T-Zellen wurden mit 5ng/ml PMA und 1 $\mu$ g/ml Ionomycin (beide von Sigma), für 24 Stunden aktiviert. Nach 48 Stunden im Inkubator erfolgte die CD4<sup>+</sup> Selektion mittels einer MACS (magnetic activated cell sorting; magnetisch aktivierte Zellsortierung) Säule und CD4 Mikrobeads (Milteny). Die Zahl lebender Zellen wurde, unter Ausschluss toter Zellen durch Anfärbung mit Trypan blau, ermittelt. Nach dreimaligem Waschen wurde die Zellzahl auf fünf Millionen Zellen je 4 $\mu$ l in 0.1M PB (phosphate buffer; Phosphatpuffer) für die Injektion eingestellt.

### FACS (Fluorescence activated cell sorting; Fluoreszenz aktivierte Zellsortierung) Analyse:

Monoklonale, R-phycoerythrin konjugierte Antikörper gegen CD4, CD8 und CD11b gegen Maus waren von BD erhältlich. Die isolierten CD4<sup>+</sup> Zellen wurden für 15 Minuten bei 4°C mit den Antikörpern (1:100) inkubiert. Anschließend wurden die Daten mittels eines FACS-Calibur erhoben und über das Datenverarbeitungsprogramm FlowJo ausgewertet.

### Entorhinale Kortexläsion und Injektion:

Unter tiefer Ketaminnarkose (intraperitoneal) wurden die Tiere in einen Stereotakten (Kopf Instruments) eingespannt und die Schädeldecke freipräpariert. Die innere Kante einer 2mm breiten Edelstahlklinge wurde kurz über dem  $\lambda$  Punkt (Aufeinandertreffen der longitudinalen und  $\lambda$  Naht) justiert und anschließend 0.4mm nach rostral und 1.6mm nach links verschoben. Nach dem Eröffnen des Schädels an dieser Stelle mit einem Bohrer wurde die Klinge bis zum Auftreffen auf die Schädelbasis langsam in das Gehirn der Mäuse vorgeschoben. Die anschließende Injektion der vorbereiteten fünf Millionen Zellen (s.o.), in die Stelle der

entorhinalen Kortexläsion, erfolgte mit einer eingespannten 5µl Hamilton Pipette über einen Zeitraum von fünf Minuten.

#### Ventrikelinjektionen:

Die Mäuse wurden mit Ketamin narkotisiert (intraperitoneal) und in den stereotaktischen Apparat eingespannt. Vom  $\lambda$  Punkt aus wurden die folgenden Koordinaten zum Aufsuchen des rechten Ventrikels verwendet: 3mm rostral, 1mm links und 2mm dorsoventral in das Parenchym nach der Bohrung eines Schädelloches. Durch Aspiration einer kleinen Menge Liquor wurde der richtige Sitz der Nadel überprüft, bevor die Injektion der vorbereiteten fünf Millionen Zellen (s.o.) über einen Zeitspanne von fünf Minuten erfolgte.

#### Intrasplenale Injektionen:

Unter tiefer Ketamininjektionsnarkose wurde das linke, laterale Abdomen mit einem kleinen 0.5cm großen Wechselschnitt eröffnet. Nach Darstellung der Milz wurden 100µl einer 2% CFDA Lösung in 0.1M PB über eine Minute injiziert. Haut und Peritoneum wurden anschließend separat vernäht. Die Kontrollgruppe erhielt eine Injektion mit 0.1M PB.

#### Perfusion:

Alle Mäuse wurden nach tiefer Ketaminnarkose (intraperitoneal) über die linke Herzkammer mit 100ml Natriumchlorid gefolgt von 150ml einer Fixationslösung, bestehend aus 4% Paraformaldehyd (PFA) in 0.1M PB, perfundiert. Bei einigen Tieren wurden die Gehirne aus dem knöchernen Schädel, sowie die zervikalen und inguinalen LK, als auch die Milz entnommen und für 24 Stunden in 4% PFA in 0.1M PB nachfixiert. Anderen Tieren wurden die kompletten Köpfe und Hälse sowie inguinale LK und die Milz entfernt.

#### Cryostatschnitte:

Nach Etablierung eines Zeitschemas des Auftauchens GFP+ Zellen in den zervikalen LK wurden ganze Köpfe und Hälse in einer speziellen Fixationslösung zum Entkalken, bestehend aus 1000ml 0.1M PB, pH 7.4 mit 160g EDTA and 10g Saccharose, für zwei Tage bei 50°C inkubiert. Nach 24 Stunden in 20% Saccharose in 0.1M PB, sowie weiteren 48 Stunden in 30% Saccharose und anschließendem Einfrieren bei -80°C für mindestens 24 Stunden, waren die Proben für das Schneiden am Cryostaten vorbereitet. Die Schnittdicke horizontaler Schnitte betrug 20µm.

#### Fluoreszenzmikroskopie:

Für die Fluoreszenzmikroskopie wurden am Vibratom 50µm Schnitte hergestellt. Zur Detektierung GFP+ und CFDA+ Zellen wurden die unbehandelten Schnitte mit Immunomount (Shandon) eingebettet und anschließend unter einem Olympus BX-50 Mikroskop analysiert. Nach der photographischen Dokumentation wurden einige Schnitte

über Nacht getrocknet und am darauffolgenden Tag mit Hematoxylin Eosin (HE) gefärbt, um die Morphologie und Lage der in die Lymphknoten eingewanderten Zellen darzustellen. Durch die HE Färbung ging die Fluoreszenz verloren, jedoch konnten durch Überlagerung der Aufnahmen vor und nach der HE Färbung die zuvor grün fluoreszierenden Zellen eindeutig identifiziert werden.

#### Immunzytochemie:

Die Schnitte wurden mit zehnprozentigem Ziegenerum in PB inkubiert um unspezifische Antikörperbindungsstellen zu blockieren. CD4<sup>+</sup> Zellen wurden über Nacht bei 4°C mit dem monoklonalen Antikörper RM4-5 1:200 (BD) und mikrogliale Zellen mit dem polyklonalen CD11b Antikörper Mac-1 $\alpha_m$  1:200 (Leinco Technologies), beide gegen Maus aus Ratte, inkubiert. Sichtbar gemacht wurden diese spezifischen Bindungen durch den Zweitantikörper Alexa Fluor 568 1:100 (Molecular Probes) gegen Ratte aus Ziege.

#### DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindol) Färbung:

DAPI ist ein blauer Fluoreszenzfarbstoff der an Adenosin/Thymidin-Regionen von DNS (Desoxyribonukleinsäure) bindet. Die Identifizierung intakter Nuklei ist über die Darstellung kondensierter und fragmentierter DNS von toten Zellen möglich.

## **Ergebnisse**

### 1. Invasion CFDA markierter Milzzellen nach ECL (Fig. 7 in Bechmann et al. 2005)

Nach Injektion des Fluoreszenzfarbstoffes CFDA in die Milz und 24 Stunden später erfolgter ECL waren weitere 48 Stunden später viele fluoreszierende Zellen innerhalb der Zone axonaler Degeneration sichtbar. Die meisten dieser Zellen konnten wir mit dem Mac-1 Antikörper für monozytäre Zelllinien anfärben. Des Weiteren hatten diese Zellen auch schon teilweise die typische Morphologie ramifizierter Mikroglia angenommen. Die vereinzelt, runden, CFDA positiven, jedoch Mac-1 negativen Zellen entsprachen sehr wahrscheinlich Lymphozyten, welche den Hippokampus nach Läsion ebenfalls infiltrieren (Bechmann et al. 2001).

### 2. Zeitschema des Auftauchens von T-Zellen in zervikalen LK (Fig. 1 und 2 in Goldmann et al. 2006)

In lädierten Mäusen konnten GFP-exprimierende, aktivierte T-Zellen in der Läsionsstelle und innerhalb des Ventrikels am Plexus choroideus gefunden werden. Die Distanz zur Injektionsstelle wurde mit der Zeit größer und die Zellen migrierten entlang des Alveus (einem myelinisierten Fasertrakt) zum ventralen Horn des Seitenventrikels. Sechs Stunden nach Injektion (hpi; hours post injection) konnten die ersten Zellen im umliegenden Bindegewebe der zervikalen LK gefunden werden. 12hpi fanden wir vereinzelt GFP+ Zellen innerhalb der oberflächlichen submandibulären LK beider Seiten, jedoch keine GFP+ Zellen innerhalb der oberflächlichen parotidealen oder inguinalen LK sowie der Milz. Die Anzahl der Zellen nahm mit der Zeit zu, bis zu einem Maximum 48hpi, das über sieben Tage anhielt. Die Anzahl der Zellen in den parotidealen oberflächlichen und inguinalen LK nahm ab 24hpi ebenfalls zu, erreichte jedoch nie die starke Anhäufung der oberflächlichen submandibulären LK. Bei Tieren mit Ventrikelinjektionen konnten wir dasselbe Zeitschema des Auftauchens der Zellen in den Lymphknoten beobachten.

Mittels FACS Analyse konnten wir zeigen, dass ca. 93% unserer injizierten Zellen CD4+ und GFP+ waren.

Die Lebensfähigkeit der GFP exprimierenden T-Zellen in den LK wurde mit Hilfe der DAPI Färbung nachgewiesen. Dafür wurden LK von Mäusen, welche sieben Tage nach Injektion in die Läsionsstelle des ZNS getötet worden waren, entnommen. In vielen GFP+ Zellen konnten intakte Nuklei ohne kondensierte oder fragmentierte Zellkerne als Kennzeichen lebender Zellen nachgewiesen werden.

Zur morphologischen Charakterisierung wurden HE Färbungen von den Fluoreszenzschnitten angefertigt, welche nach Überlagerung der Aufnahmen die runden Kerne der T-Lymphozyten zur Darstellung brachten. Mittels einer Doppelfluoreszenzfärbung konnten wir die Co-Expression der grünen Fluoreszenz GFP+ Zellen mit der roten Fluoreszenz der CD4 Färbung nachweisen.

### 3. Migrationsweg der T-Zellen (Fig. 3 bis 5 in Goldmann et al. 2006)

Nach Etablierung des Zeitschemas identifizierten wir die Migrationsrouten der T-Zellen vom Parenchym des ZNS zu den zervikalen LK. Die am Cryostaten angefertigten Schnitte ganzer Köpfe und Häse erlaubten uns, diese Route direkt zu verfolgen. Zwischen 12 und 48hpi konnten wir T-Zellen entlang der Riechnervenfasern durch die Lamina cribrosa wandern sehen. Wir verfolgten die T-Zellen unterhalb der epithelialen Schicht der nasalen Schleimhaut. In Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen, dass ein einzelner spezifischer zervikaler LK eines Tieres 24hpi sehr viele GFP+ T-Zellen enthielt, andere hingegen nur vereinzelte, konnten wir in unseren Kopf/Hals Schnitten viele GFP+ Zellen innerhalb eines LK finden, jedoch kaum Zellen in benachbarten LK. Die Verteilung der Zellen innerhalb der LK zeigte keine Unterschiede zwischen Tieren, welche eine Ventrikelinjektion oder eine entorhinale Injektion erhalten hatten.

## **Diskussion**

Innerhalb der letzten Jahre sind mehrere Arbeiten publiziert worden, welche zeigten, dass die Blut-Hirn-Schranke und das Fehlen lymphatischer Abflusswege nicht Grundlage des Immunprivilegs des ZNS sind. So ist die Blut-Hirn-Schranke offensichtlich keine Blockade des efferenten Armes der Immunantwort (Hickey et al. 1991, Wekerle 1993, Quing et al 2000, Ransohoff et al. 2003, Engelhardt and Ransohoff 2005) und trotz Fehlens von klassischen Lymphgefäßen ist der afferente Arm ebenfalls nicht versperrt (Weller et al. 1992, Boulton et al. 1999, Harling-Berg et al. 1999, Cserr and Knopf 1992, Carson et al. 1998, Hatterer et al. 2006). Somit wird das ZNS heute nicht mehr als ein vom Immunsystem ignoriertes Organ aufgefasst, sondern als ein Organ, in welchem Immuntoleranz aktiv aufrechterhalten wird. Dies geschieht über verschiedene Mechanismen wie zum Beispiel periphere Depletion und enge Kontrolle über den Aktivierungsgrad lokaler antigenpräsentierender Zellen (Kwidzinski et al. 2003, Becher et al. 2006). In weitergehenden Untersuchungen der Immunantwort im ZNS sind im Rahmen dieser Dissertation mit Hilfe der ECL darüber hinaus Details dargestellt.

Mit Hilfe des Modells der ECL konnte von unserer Arbeitsgruppe bereits gezeigt werden, dass T-Zellen die Zonen axonaler Degeneration infiltrieren (Bechmann et al. 2001). Jedoch gab es Unklarheiten, ob es im Modell der ECL ebenfalls zu einer Infiltration monozytärer Zellen über die Blut-Hirn-Schranke in die Zonen axonaler Degeneration kommt. Zum einen ist nach Entwicklung chimärer Mäuse in einigen pathologischen Konstellationen die Infiltration peripherer Monozyten gezeigt worden (Priller et al. 2001, Beck et al. 2003), zum anderen konnten Fagan und Gage (1994) keine Rekrutierung peripherer Monozyten in ihrem experimentellen Setup nachweisen. Somit wurde die Erhöhung der Anzahl der Mikroglia/Monozyten nach ECL (Hailer et al. 1999) nur auf Migration (Gall et al. 1979, Rappert et al. 2004) und Proliferation (Gall et al. 1979, Jensen et al. 1994, Hailer et al. 1999) intrinsischer Zellpopulationen zurückgeführt.

Deshalb untersuchten wir die Infiltration von aus dem Blut stammenden Monozyten in die Zonen axonaler Degeneration mittels zwei verschiedener experimenteller Zugangswege. Zunächst studierten wir die Invasion mit Hilfe von Mauschimären, welche sich durch die stabile Expression des GFP in Knochenmarkszellen schon in anderen Pathologien als hilfreich erwiesen hatten. Mittels konfokaler Mikroskopie konnten wir zeigen, dass innerhalb der mittleren Molekularschicht des Gyrus dendatus GFP+ Zellen über die Glia limitans in das Neuropil einwandern (Bechmann et al. 2005). Dies unterstreicht die Ansicht, dass es durch

anterograde Degeneration zur Produktion chemotaktischer Signale kommt, welche zirkulierende Leukozyten anlocken (Babcock et al. 2003). Obwohl in unseren Untersuchungen die ECL acht bis zwölf Wochen nach der Radiatio durchgeführt wurde und somit lange nach Schädigung der Blut-Hirn-Schranke (Yuan et al. 2003, Li et al. 2004), wollten wir ausschließen, dass die beobachtete Einwanderung der peripheren Monozyten nicht Ursache der zuvor erfolgten Radiatio und Knochenmarkstransplantation war. Dazu untersuchten wir die Einwanderung in nicht-chimären Mäusen mit einer alternativen, im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Methode. Hierfür wurde 24 Stunden vor einer ECL der Fluoreszenzfarbstoff CFDA in die Milz injiziert und führte dort zu einer Fluoreszenzmarkierung phagozytierender Milzzellen. 48 Stunden nach ECL konnten wir bei den so behandelten Tieren viele fluoreszierende Zellen innerhalb der Zonen axonaler Degeneration erkennen. Durch die Anfärbung dieser Zellen mit dem Mac-1 Antikörper für monozytäre Zelllinien, sowie aufgrund der typischen Morphologie konnten wir diese Zellen als ramifizierte Mikroglia identifizieren. Somit vermochten wir auch mit Hilfe dieses experimentellen Setups nachzuweisen, dass es zu einer Invasion peripherer Monozyten in die Zonen axonaler Degeneration kommt. Insofern ist der initiale Anstieg der absoluten Mikroglia/Monozytenzahl nach ECL nicht nur auf Migration und Proliferation intrinsischer Mikroglia, sondern auch auf die Invasion aus dem blutstammender Monozyten zurückzuführen.

Während die alte Vorstellung, von der Blut-Hirn-Schranke als Barriere für das Eindringen von Leukozyten widerlegt ist, ist es noch immer eine experimentelle Herausforderung zu untersuchen, in welchem Ausmaß und auf welchen Routen intraparenchymale Zellpopulationen in der Lage sind, das Neuropil in Richtung LK zu verlassen. Die Tatsache, dass subarachnoidal injizierte Zellen zervikale LK erreichen können, ist nicht neu und wurde zuerst für Erythrozyten und Lymphozyten gezeigt (Oehmichen et al. 1979). 1998 erweiterten Carson et al. dieses Wissen auf intrathekal injizierte dendritische Zellen und ähnliche Ergebnisse sind auch von anderen kürzlich publiziert worden (Karman et al. 2004, Hatterer et al. 2006). Jedoch identifizierte keine dieser Studien die anatomischen Wege, welche die Zellen benutzten, um den subarachnoidalen Raum zu verlassen. Zu diesem Zweck etablierten wir zunächst das zeitliche Schema des Auftauchens der GFP exprimierenden CD4<sup>+</sup> T-Zellen in den LK nach Injektion GFP<sup>+</sup> T-Zellen in die Stelle einer entorhinalen Kortexläsion. Hierbei konnten wir zeigen, dass die T-Zellen 12hpi in das ZNS erstmals vereinzelt in zervikalen LK auftauchen und bis 48hpi stark akkumulieren und bis mindestens sieben Tage

nach Injektion weiterhin in den zervikalen LK präsent sind. Dann entwickelten wir ein Fixationsprotokoll, welches uns erlaubte, den Weg der injizierten GFP+ T-Zellen aus dem Gehirn hinaus zu verfolgen. Wir fanden die Zellen zunächst entlang der Riechnerven, dann unter der Nasenschleimhaut und schließlich in spezifischen zervikalen LK (Goldmann et al. 2006). Somit konnten wir zeigen, dass T-Zellen die bisher nur für lösliche Antigene postulierte Route (Cserr and Knopf 1992) benutzen.

Eine wichtige Frage blieb zunächst offen: Erfolgt die Passage vom ZNS in zervikale LK aufgrund des passiven Transports mit dem abfließenden Hirnwasser und später der Lymphe oder ist es ein Prozess aktiver Migration? Es scheint, dass Migration keine notwendige Voraussetzung einer solchen Passage ist, da auch nicht migrationsfähige Zellen, wie Erythrozyten, die zervikalen LK erreichen können (Oehmichen 1979 et al.). Allerdings könnten chemotaktische Signale zur Akkumulation der T-Zellen in spezifischen LK führen, weil benachbarte LK fast keine T-Zellen aufwiesen. Auf jeden Fall scheint eine massive Gehirnverletzung und Eröffnung der Blut-Hirn-Schranke keine notwendige Voraussetzung für eine scheinbare Induktion von chemotaktischen Signalen zu sein, da die Verteilung der T-Zellen innerhalb der LK sich nicht zwischen den Tieren unterschied, welche eine Injektion in die Läsionsstelle oder in den Ventrikel erhalten hatten.

Ovalbumin kann, nach Injektion in das Gehirn, eine Immunantwort erzeugen (Wenkel et al. 2000). Diese Immunantwort ist jedoch nicht destruktiv und besteht in einer Toleranz erzeugenden Antigenpräsentation, einer sogenannten Immundeviation (Streilein and Niederkorn 1985). Diese Immundeviation findet auch bei eröffneter Blut-Hirn-Schranke statt und kann über zervikale LK Zellen in andere Tiere transferiert werden (Wenkel et al. 2000). Dies könnte über Drainage von Ovalbumin über die bekannten Routen (Cserr and Knopf 1992) und tolerogene Antigenpräsentation aufgrund des Fehlens notwendiger proinflammatorischer Stimuli erklärt werden. Nach unseren Ergebnissen könnte eine alternative Erklärung sein, dass regulatorische T-Zellen, entstanden im Neuropil aufgrund unzureichender Ko-Stimulation (Brabb et al. 2000, Bechmann et al. 2001, Kwidzinski et al. 2003, Trajkovic et al. 2004) und deren anschließende Auswanderung über die von uns dargestellte Route in periphere LK, die adaptive Immunantwort antigenspezifisch herabregeln. Die Bedeutung zervikaler LK Stationen bei der Modulierung von Immunantworten, zeigt sich unter anderem auch dadurch, dass in zervikalen LK geprägte enzephalitogene T-Zellen bevorzugt das ZNS invadieren (Lake et al. 1999) und dass nach

Entfernung der zervikalen LK Stationen eine experimentelle autoimmunen Enzephalomyelitis um bis zu 40% abgemildert werden kann (Phillips et al. 1997).

Zusammengefaßt konnten wir zeigen, dass auch der afferente Arm der Immunantwort durch das Fehlen lymphatischer Abflusswege, zumindest für T-Zellen, nicht blockiert ist. Infolgedessen stellt sich die Frage, ob dies ebenso für weitere Leukozytenpopulationen der Fall ist. Mit einem Maximum ungefähr drei Tage nach Läsion kommt es zu einem initial starken Anstieg der absoluten Anzahl von Mikroglia/Makrophagen innerhalb der Zonen axonaler Degeneration (Hailer et al. 1999). Dafür sind bis jetzt drei Mechanismen bekannt. Es kommt zu einer Migration von Mikroglia aus umliegenden Arealen (Gehrmann et al. 1991, Jensen et al. 1994, Rappert et al. 2004), zur Proliferation mikroglialer Zellen (Gall et al. 1979, Jensen et al. 1994, Hailer et al. 1999) und, wie jetzt durch uns gezeigt, einer Einwanderung aus dem Blut stammender monozytärer Zellen in die Zonen axonaler Degeneration (Bechmann et al. 2005). Die absolute Anzahl von Mikroglia nach initial starkem Anstieg ist jedoch 30 Tage nach Läsion wieder auf das vor-läsionale Niveau gesunken (Jensen et al. 1994, Hailer et al. 1999). Dies könnte ein Resultat apoptotischer Elimination sein, jedoch ist bis zu zehn Tage nach Läsion keine Apoptose nachweisbar (Bechmann et al. 2000). Man könnte spekulieren, dass ebenfalls (eine Subpopulation von) mikroglialen/monozytären Zellen in der Lage ist, das Neuropil zu verlassen und zervikale LK zu erreichen. Das Auftauchen von dendritischen Zellen in zervikalen LK nach Injektion in das ZNS ist schon gezeigt worden (Carson et al. 1998, Karman et al. 2004, Hatterer et al. 2005). Eine mögliche Migration dieser Zellen könnte die Ursache für Myelinfragmente sein, welche in den zervikalen LK von Menschen und Affen gefunden worden sind, die an MS oder dem Tiermodell, der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis, leiden (de Vos et al. 2002, Fabrick et al. 2005). Mit unserem etablierten Modell wollen wir nun versuchen, diese Fragen zu untersuchen und vor allem mögliche Routen aus dem ZNS für dendritische und monozytäre Zellen darzustellen. Wir könnten im Laufe dieser Forschungsarbeiten lernen, dass das Gehirn wie jedes andere Organ auch von Immunzellen patrouilliert wird, und dass das "Immunprivileg" durch eine ortsspezifische Modulation des Aktivierungsgrades der antigenpräsentierenden Zellen und Lymphozyten aufrechterhalten wird.

## Literaturverzeichnis

- (1) Becher B, Bechmann I, Greter M. Antigen presentation in autoimmunity and CNS inflammation: how T lymphocytes recognize the brain. *J Mol Med* 2006;84(7):532-543.
- (2) Bechmann I, Nitsch R. Identification of phagocytic glial cells after lesion-induced anterograde degeneration using double-fluorescence labeling: combination of axonal tracing and lectin or immunostaining. *Histochem Cell Biol* 1997;107(5):391-397.
- (3) Bechmann I, Mor G, Nilsen J, Eliza M, Nitsch R, Naftolin C. FasL (CD95L, Apo1L) is expressed in the normal rat and human brain: evidence for the existence of an immunological brain barrier. *Glia* 1999;27(1):62-74.
- (4) Bechmann I, Lossau S, Steiner B, Mor G, Gimsa U, Nitsch R. Reactive astrocytes upregulate Fas (CD95) and Fas ligand (CD95L) expression but do not undergo programmed cell death during the course of anterograde degeneration. *Glia* 2000;32(1):25-41.
- (5) Bechmann I, Peter S, Beyer M, Gimsa U, Nitsch R. Presence of B7-2 (CD86) and lack of B7-1 (CD80) on myelin phagocytosing MHC-II-positive rat microglia is associated with nondestructive immunity in vivo. *FASEB J* 2001;15(6):1086-1088.
- (6) Bechmann I. Failed central nervous system regeneration: a downside of immune privilege? *Neuromolecular Med.* 2005;7(3):217-228.
- (7) Bechmann I, Goldmann J, Kovac AD, Kwidzinski E, Simbürger E, Naftolin F, Dirnagl U, Nitsch R, Priller J. Circulating monocytic cells infiltrate layers of anterograde axonal degeneration where they transform into microglia. *FASEB J* 2005;19(6):647-649.
- (8) Beck H, Voswinckel R, Wagner S, Ziegelhoeffer T, Heil M, Helisch A, Schaper W, Acker T, Hatzopoulos AK, Plate KH. Participation of bone marrow-derived cells in long-term repair processes after experimental stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 2003;23(6):709-717.
- (9) Billingham RE, Boswell T. Studies on the problem of corneal homografts. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 1953;141(904): 392-406.

- (10) Boulton M, Flessner M, Armstrong D, Mohamed R, Hay J, Johnston M. Contribution of extra cranial lymphatics and arachnoid villi to the clearance of a CSF tracer in the rat. *Am J Physiol* 1999;276(3 Pt 2):R818-823.
- (11) Brabb T, v. Dassow P, Ordonez N, Schnabel B, Duke B, Goverman J. In situ tolerance within the central nervous system as a mechanism for preventing autoimmunity. *J Exp Med* 2000;192(6):871-880.
- (12) Carson MJ, Reilly CR, Sutcliffe JG, Lo D. Disproportionate recruitment of CD8+ T cells into the central nervous system by professional antigen-presenting cells. *Am J Pathol* 1998;154(2):481-494.
- (13) Cserr HF, Knopf PM. Cervical lymphatics, the blood-brain barrier and the immunoreactivity of the brain: a new view. *Immunol Today* 1992;13(12):507-512.
- (14) Deller T, Haas CA, Frotscher M. Sprouting in the hippocampus after entorhinal cortex lesion is layer-specific but not translaminae: which molecules may be involved? *Restor Neurol Neurosci* 2001;19(3-4):159-167.
- (15) Engelhardt B, Ransohoff RM. The ins and outs of T-lymphocyte trafficking to the CNS: anatomical sites and molecular mechanisms. *Trends Immunol* 2005;26:485-495.
- (16) Fabriek BO, Zwemmer JN, Teunissen CE, Dijkstra CD, Polman CH, Laman JD, Castelijns JA. In vivo detection of myelin proteins in cervical lymph nodes of MS patients using ultrasound-guided fine-needle aspiration cytology. *J Neuroimmunol* 2005;161(1-2):190-194.
- (17) Freund J, Stern ER, Pisani TM. Isoallergic encephalomyelitis and radiculitis in guinea pigs after one injection of brain and mycobacteria in water-in-oil emulsion. *J Immunol* 1947;57:179-194.
- (18) Gall C, Rose G, Lynch G. Proliferative and migratory activity of glial cells in the partially deafferented hippocampus. *J Comp Neurol* 1979;183(3):539-549.

- (19) Gehrman J, Schoen SW, Kreutzberg GW. Lesion of the rat entorhinal cortex leads to a rapid microglial reaction in the dentate gyrus. A light and electron microscopical study. *Acta Neuropathol (Berl)* 1991;82(6):442-455.
- (20) Goldmann J, Kwidzinski E, Brandt C, Mahlo J, Richter D, Bechmann I. T cells traffic from brain to cervical lymph nodes via the cribroid plate and the nasal mucosa. *J Leukocyte Biology* 2006; 80(4):797-801
- (21) Hailer NP, Grampp A, Nitsch R. Proliferation of microglia and astrocytes in the dentate gyrus following entorhinal cortex lesion: a quantitative bromodeoxyuridine-labelling study. *Eur J Neurosci* 1999;11(9):3359-3364.
- (22) Harling-Berg CJ, Park TJ, Knopf PM. Role of the cervical lymphatics in the Th2-type hierarchy of CNS immune regulation. *J Neuroimmunol* 1999;101(2):111-127.
- (23) Hatterer E, Davoust N, Didier-Bazes M, Vuillat C, Malcus C, Belin MF, Nataf S. How to drain without lymphatics? Dendritic cells migrate from the cerebrospinal fluid to the B-cell follicles of cervical lymph nodes. *Blood* 2006;107(2):806-812.
- (24) Hausmann R, Kaiser A, Lang C, Bohnert M, Betz P. A quantitative immunohistochemical study on the time-dependent course of acute inflammatory cellular response to human brain injury. *Int J Legal Med* 1999;112(4):227-232.
- (25) Hickey WF, Kimura H. Perivascular microglial cells of the CNS are bone marrow-derived and present antigen in vivo. *Science* 1988;239(4837):290-292.
- (26) Hickey WF, Hsu BL, Kimura H. T-lymphocyte entry into the central nervous system. *J Neurosci Res* 1991;28(2):254-260.
- (27) Hickey WF. Basic principles of immunological surveillance of the normal central nervous system. *Glia* 2001;36(2):118-124.

- (28) Jensen MB, Gonzalez B, Castellano B, Zimmer J. Microglial and astroglial reactions to anterograde axonal degeneration: a histochemical and immunocytochemical study of the adult rat fascia dentata after entorhinal perforant path lesions. *Exp Brain Res* 1994;98:245-260.
- (29) Jensen MB, Finsen B, Zimmer J. Morphological and immunophenotypic microglial changes in the denervated fascia dentata of adult rats: correlation with blood-brain barrier damage and astroglial reactions. *Exp Neurol* 1997;143(1):103-116.
- (30) Karman J, Ling C, Sandor M, Fabry Z. Initiation of immune responses in brain is promoted by local dendritic cells. *J Immunol* 2004;173(4):2353-2361.
- (31) Kwidzinski E, Mutlu L, Kovac AD, Bunse J, Goldmann J, Aktas O, Zipp F, Kamradt T, Nitsch R, Bechmann I. Self-Tolerance in the immune privileged CNS: lessons from the entorhinal cortex lesion model. *J Neural Transm* 2003;(65):29-49.
- (32) Lake J, Weller RO, Phillips MJ, Needham M. Lymphocyte targeting of the brain in adoptive transfer cryolesion-EAE. *J Pathol* 1999;187(2):259-265.
- (33) Lawson LJ, Perry VH, Gordon S. Turnover of resident microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience* 1992;48(2):405-415.
- (34) Li YQ, Chen P, Jain V, Reilly RM, Wong CS. Early radiation-induced endothelial cell loss and blood-spinal cord barrier breakdown in the rat spinal cord. *Radiat Res* 2004;161(2):143-152.
- (35) Lynch G, Matthews DA, Mosko S, Parks T, Cotman C. Induced acetylcholinesterase-rich layer in rat dentate gyrus following entorhinal lesions. *Brain Res* 1972;42(2):311-318.
- (36) Medawar PB. Immunity to homologous grafted skin: III. Fate of skin homografts transplanted to the brain, to subcutaneous tissue, and to the anterior chamber of the eye. *Br J Exp* 1948;29:58-69.
- (37) Oehmichen M, Grüninger H, Wiethölter H, Gencic M. Lymphatic efflux of intracerebrally injected cells. *Acta Neuropathologica* 1979;45-61.

- (38) Phillips MJ, Needham M, Weller RO. Role of cervical lymph nodes in autoimmune encephalomyelitis in the Lewis rat. *J Pathol* 1997;182(4):457-464.
- (39) Priller J, Flügel A, Wehner T, Boentert M, Haas CA., Prinz M, Fernández-Klett F, Prass K, Bechmann I., de Boer BA, Frotscher M, Kreutzberg GW, Persons DA, Dirnagl U. Targeting gene-modified hematopoietic cells to the central nervous system: use of green fluorescent protein uncovers microglial engraftment. *Nat Med* 2001;7(12):1356-1361.
- (40) Qing Z, Sewell D, Sandor M, Fabry Z. Antigen-specific T cell trafficking into the central nervous system. *J Neuroimmunol* 2000;105(2):169-178.
- (41) Raivich G, Banati R. Brain microglia and blood-derived macrophages: molecular profiles and functional roles in multiple sclerosis and animal models of autoimmune demyelinating disease. *Brain Res Brain Res Rev* 2004;46(3):261-281.
- (42) Ramirez JJ. The role of axonal sprouting in functional reorganization after CNS injury: lessons from the hippocampal formation. *Restor Neurol Neurosci* 2001;19(3-4):237-262.
- (43) Ransohoff RM, Kivisäkk P, Kidd G. Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system. *Nat Rev Immunology* 2003;3(7):569-581.
- (44) Rappert A, Bechmann I, Pivneva T, Mahlo J, Biber K, Nolte C, Kovac AD, Gerard C, Boddeke HW, Nitsch R, Kettenmann H. CXCR3-dependent microglial recruitment is essential for dendrite loss after brain lesion. *J Neurosci* 2004;24(39):8500-8509.
- (45) Sibley WA, Bamford CR, Clark K. Clinical viral infections and multiple sclerosis. *Lancet* 1985;1(8441):1313-1315.
- (46) Soares HD, Hicks RR, Smith D, McIntosh TK. Inflammatory leukocytic recruitment and diffuse neuronal degeneration are separate pathological processes resulting from traumatic brain injury. *J Neurosci* 1995;15(12):8223-8233.
- (47) Sospedra M, Martin R. Immunology of multiple sclerosis. *Annu Rev Immunol* 2005;23:683-747.

- (48) Streilein JW, Niederkorn JY. Characterization of the suppressor cell(s) responsible for anterior chamber-associated immune deviation (ACAID) induced in BALB/c mice by P815 cells. *J Immunol* 1985;134(3):1381-1387.
- (49) Trajkovic V, Vuckovic O, Stosic-Grujicic S, Miljkovic D, Popadic D, Markovic M, Bumbasirevic V, Backovic A, Cvetkovic I, Harhaji L, Ramic Z, Mostarica Stojkovic M. Astrocyte-induced regulatory T cells mitigate CNS autoimmunity. *Glia* 2004;47(2):168-179.
- (50) de Vos AF, van Meurs M, Brok HP, Boven LA, Hintzen RQ, van der Valk P, Ravid R, Rensing S, Boon L, 't Hart BA, Laman JD. Transfer of central nervous system autoantigens and presentation in secondary lymphoid organs. *J Immunol* 2002;169(10):5415-5423.
- (51) Wekerle H. Lymphocyte traffic to the brain. In: *The blood-brain barrier*. W.M. Pardridge, ed., New York, Raven Press 1993;67-85.
- (52) Weller RO, Engelhardt B, Phillips MJ. Lymphocyte targeting of the central nervous system: a review of afferent and efferent CNS-immune pathways. *Brain Pathol* 1996;6(3):275-288.
- (53) Weller RO, Kida S, Zhang ET. Pathways of fluid drainage from the brain: morphological aspects and immunological significance in rat and man. *Brain Pathol* 1992;2(4):277-284.
- (54) Wenkel H, Streilein JW, Young MJ. Systemic immune deviation in the brain that does not depend on the integrity of the blood-brain barrier. *J Immunol* 2000;164(10):5125-5131.
- (55) Yuan H, Gaber MW, McColgan T, Naimark MD, Kiani MF, Merchant TE. Radiation-induced permeability and leukocyte adhesion in the rat blood-brain barrier: modulation with anti-ICAM-1 antibodies. *Brain Res* 2003;969(1-2):59-69.