

Aus dem Institut für Zell- und Neurobiologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Migration von Monozyten nach
Injektion in das lädierte Zentrale Nervensystem

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von
Miriam Kaminski
aus Berlin

Gutachter: 1. Prof.Dr.med. R.Nitsch
 2. Prof.Dr.med. J.Kiwit
 3. Prof.Dr.med T.Arendt

Datum der Promotion: 07.09.2012

Meinem Großvater Professor Dr.rer.nat. Helmut Knapp
(1923-2009)

Inhaltsverzeichnis

<u>Inhaltsverzeichnis</u>	<u>IV</u>
<u>1. EINLEITUNG</u>	<u>8</u>
1.1. Das Immunsystem.....	10
1.1.1. Allgemeine Einführung.....	10
1.1.2. Mononukleäres phagozytisches System und das ZNS.....	11
1.1.3. Lymphatische Organe (Immunologische Organe).....	13
1.1.4. Immunologische Toleranz.....	14
1.1.5. Autoimmunität.....	14
1.1.6. Das Zentrale Nervensystem.....	15
1.1.7. Autoimmunpathologien des Zentralen Nervensystems.....	15
1.2. Das periphere Immunsystem und das Zentrale Nervensystem.....	17
1.2.1. Immunprivileg des Zentralen Nervensystems.....	17
1.2.2. Immunologische Migrationswege rund um das ZNS.....	19
1.2.3. Interaktion des Immunsystems mit dem ZNS.....	20
1.2.4. Die Funktion peripherer Leukozyten innerhalb neuropathologischer Prozesse.....	23
1.3. Neuropathologische Modelle.....	25
1.3.1. Trauma zur Inflammations- und Degenerationsinduktion.....	25
1.3.2. Das Modell der Entorhinalen Kortex-Läsion.....	26
1.4. Ziele der Arbeit.....	26
<u>2. MATERIAL UND METHODEN</u>	<u>29</u>
2.1. Material.....	29
2.1.1. Laborgeräte und Verbrauchsmaterialien.....	29

2.1.2. Chemikalien	30
2.1.3. Versuchslösungen	31
2.1.4. Versuchstiere	32
2.2. Methoden.....	33
2.2.1. Präparation von murinen Monozyten	33
2.2.1.1. Durchführung der transkardialen Perfusion.....	33
2.2.1.2. Präparation von Monozyten mittels Dichtezentrifugation.....	33
2.2.1.3. Bestimmung der Zellzahl.....	34
2.2.1.4. Zellinkubator.....	35
2.2.1.5. MACS® (magnetic cell sorting, magnetische Zellsortierung).....	35
2.2.1.5.1. Aufbau der Apparatur.....	35
2.2.1.5.2. Magnetische Markierung der Monozyten.....	35
2.2.1.5.3. Magnetische Separation.....	36
2.2.2. Isolation/ Präparation von adulter Mikroglia	37
2.2.3. FACS-Analyse (Fluoreszenz aktivierte Zellsortierung).....	37
2.2.3.1. Funktionsbeschreibung.....	37
2.2.3.2. Messvorbereitungen.....	38
2.2.3.2.1. Optimierung, Kalibrierung und Kompensation.....	38
2.2.4. Durchflusszytometrie	39
2.2.4.1. Zellfärbung zur FACS-Messung.....	39
2.2.4.2. FACS-Messung.....	40
2.2.4.3. Auswertung der durchflußzytometrischen Daten.....	41
2.2.5. Immunfluoreszenz-Färbung	41
2.2.6. Morphologische Charakterisierung	42
2.2.7. Eisenfärbung.....	43
2.2.8. Histologie	44
2.2.8.1. Entorhinale Kortexläsion und stereotaktische Injektion.....	44
2.2.8.2. Perfusion.....	46
2.2.8.3. Vibratomschnitte.....	47

2.2.8.4. Immunfluoreszenzfärbung der Lymphknotenschnitte	47
2.2.8.5. Kryostatenschnitte	48
3. ERGEBNISSE	49
<hr/> <hr/>	
3.1. Reinheit und Vitalität der isolierten Monozyten	49
3.1.1. Isolierungsschritte für eine höchstmögliche Reinheit	49
3.1.2. Überprüfung anhand der Durchflusszytometrie.....	49
3.1.3. Histologischer Nachweis der Reinheit und Vitalität der isolierten Zellfraktion	52
3.1.4. Statistik der histologischen Analyse.....	53
3.2. Entorhinale Kortexläsion und intraparenchymale Injektion	54
3.2.1. Migrationsweg der intraparenchymal injizierten Monozyten.....	58
3.2.2. Ramifizierte Morphologie im Parakortex der zervikalen LK.....	64
3.2.3. Migration der intraparenchymal injizierten Monozyten	67
3.3. Ergebnisse-Ausblick	69
3.3.1. Eisenbeladung von Monozyten	69
3.3.2. Isolation und Injektion von adulter Mikroglia	70
3.3.3. Zusammenfassung der Ergebnisse	71
4. DISKUSSION	72
<hr/> <hr/>	
4.1. Neuroimmunologische Migrationswege	72
4.1.1. Drainage des ZNS in die zervikalen LK	72
4.1.2. Passive versus aktive Migration der Monozyten	73
4.2. Ramifizierte Monozyten im Parakortex der tiefen LK.....	74
4.2.1. Klassifizierbar als dendritische Zellen oder Mikroglia ?.....	75
4.2.2. Präsentieren Monozyten zentrale Antigene in der Peripherie?	77
4.3. Diskussion der Methoden	78

4.3.1. Reinheit und Überlebensrate	78
4.3.1.1. Abgrenzung zu dendritischen Zellen.....	78
4.3.1.2. MACS-Aufreinigung.....	79
4.3.2. ECL und Injektion.....	79
4.4.Ausblick	81
4.4.1. Weiteres Schicksal der injizierten Monozyten	81
4.4.2. Monozyten in der Magnetresonanztomographie (MRT).....	81
4.4.3. Mikroglia.....	82
4.4.4. Seitendifferenzen	82
4.5.Therapeutische Perspektiven	83
5. LITERATUR	85
6. ANHANG	95
6.1.Abkürzungsverzeichnis.....	95
6.2.Erklärung der Selbstständigkeit	96
6.3.Lebenslauf	97
6.4.Eigene Publikationen	99
6.5.Danksagung	99

1. EINLEITUNG

Das Immunprivileg des Zentralen Nervensystems (ZNS) wurde lange Zeit der Blut-Hirn-Schranke (*blood brain barrier*= BBB) und dem Fehlen klassischer Lymphabflusswege, zugeschrieben. In den vergangenen zwei Jahrzehnten wurde allerdings die dynamische Interaktion zwischen dem ZNS und dem peripheren Immunsystem zunehmend aufgeklärt: Die BBB blockiert zwar den Eintritt bestimmter hydrophiler Moleküle ins ZNS, doch sind Immunzellen imstande unter physiologischen Bedingungen aus den zentralen Gefäßen über die perivaskulären Räume in das ZNS einzutreten [1-3]. Zudem konnten im Rahmen verschiedener neuropathologischer Modelle (z.B. Experimentelle autoimmune Enzephalitis (EAE), entorhinale Kortexläsion (ECL) [4]), zentrale Antigene in den zervikalen Lymphknoten (LK) gefunden werden. Allerdings blieb bis heute ungeklärt, ob diese Antigene per passiver Drainage in die LK gelangen oder von phagozytierenden Zellen dorthin transportiert werden. Bisher konnten in das ZNS injizierte dendritische Zellen in den LK aufgefunden werden [5, 6], entsprechende Daten anderer Antigenpräsentierender Zellen (APZ) wie Monozyten, fehlten bislang.

Im monozytären Phagozytensystem (MPS) des ZNS spielen periphere Blutmonozyten eine zentrale Rolle, da sie eine Verbindung zwischen dem Knochenmark und peripheren, ausdifferenzierten Monozytenpopulationen, wie z.B. dendritischen Zellen oder den im ZNS vorkommenden Mikroglia, darstellen [7] und in der Lage sind, T-Zellen Antigene zu präsentieren.

In anderen Organen als dem ZNS, wandern Subpopulationen des MPS in das Gewebe ein, verharren dort zeitweilig und verlassen nach eventueller Begegnung mit einem Antigen, den Ort wieder in Richtung drainierender LK oder anderen immunologisch-kompetenten Organen, wie der Milz [8, 9]. Dort lösen sie im Anschluss an eine stattgefundene Antigenpräsentation eine Immunantwort aus.

In bisherigen Studien wurde lediglich die Wanderung monozytärer Zellen aus dem Blut in das ZNS hinein untersucht: Unter physiologischen Bedingungen migrieren die meisten Blutmonozyten mit einer konstanten Dynamik über zentrale Gefäße in das ZNS [2] und überwachen immunologisch die perivaskulären Räume [10].

Das Entzündungsinfiltrat, das Läsionen des ZNS begleitet, besteht zu 10 % aus T-Zellen und zu 90 % aus dem Blut emigrierten Makrophagen als auch ansässiger Mikroglia [11-13]. Einige Tage post lesionem kommt es zu einem initialen Höchstwert

in der Mikroglia/Makrophagen-Anzahl [14]: zum Einen aufgrund der Rekrutierung benachbarter Mikroglia [15, 16] und deren Proliferation [11, 14], zum Anderen durch die Infiltration von aus dem Blut stammender Monozyten [10]. Diese eingewanderten Monozyten nehmen die Morphologie ramifizierter Mikroglia an [10, 17], und phagozytieren degenerierte entorhinale Fasern [15, 18]. Die absolute Anzahl der Monozyten-Abkömmlinge in den denervierten Schichten ist 30 Tagen post lesionem wieder gleich der präläsionalen Anzahl [12, 14], ohne das in den ersten 10 Tagen nach Läsionssetzung Apoptosen nachgewiesen werden konnten [19].

Das weitere Schicksal der eingewanderten, mit Zell-Trümmern beladenden und proliferierenden monozytären Zellen im neuronalem Parenchym blieb bis hierhin unbekannt. Dennoch wurden einige Hypothesen über den nachfolgenden Verlauf, aufgestellt: eine Hypothese implizierte, dass die Monozyten das ZNS verlassen und sich in den LK bzw. der Milz ansammeln [20]. Andere Studien schlugen vor, dass die Zellen das ZNS über den venösen Abfluss oder über drainierende lymphatische Abflüsse, welche Anschluss zu den zervikalen LK haben, abwandern [21]. Für interstitielle und zerebrale Flüssigkeit [22], Tracersubstanz [23], Antigene [24] und T-Zellen [25] konnte letzterer Weg schon bewiesen werden.

Um den afferenten Pfad für Monozyten in Folge einer zentralen Läsion zu untersuchen, stellt die ECL ein hervorragendes experimentelles Modell dar.

Über die stereotaktische Dissektion wird eine anterograde Degeneration der äußeren entorhinalen Kortexschichten induziert, die inneren Kortexschichten bleiben hingegen intakt. So kann das Verhalten der injizierten Zellen in denervierten aber auch in den unbeschädigten Schichten untersucht werden [10, 26, 27] (siehe auch 2.2.8.1.). Zudem kommt es bei diesem experimentellen Modell nicht zum Durchbruch der BBB [16], dennoch kommt es zur Rekrutierung von peripheren Monozyten aus dem Blut in Richtung Läsionsstelle [10, 28]. Innerhalb dieser Arbeit wurde anhand eines Mausmodells mit Hilfe von histologischen Methoden die Frage nach dem Schicksal von Monozyten nach Injektion in das lädierte ZNS nachgegangen.

1.1. Das Immunsystem

1.1.1. Allgemeine Einführung

Der Organismus ist ständig den Einflüssen der Umwelt ausgesetzt, von denen einige sich pathologisch auswirken können. Insbesondere Bakterien, Viren, Pilze und Parasiten können das physiologische System des Organismus über diverse Pathomechanismen zum Erliegen bringen.

Zum Schutz des Individuums, ist das Immunsystem mit Hilfe von zellulären und humoralen Elementen in der Lage, Erreger aus dem Organismus zu neutralisieren und zu eliminieren.

Das Immunsystem besteht im Wesentlichen aus zwei Komponenten, um eine elektive Abwehr eingedrungener Pathogene zu gewährleisten und somit der Schädigung körpereigener Strukturen vorzubeugen: aus dem angeborenen, unspezifischen und dem erworbenen, spezifischen Immunsystem.

Die Schutzwirkung des angeborenen Systems ist aufgrund seiner Erregerunspezifität nur begrenzt. Zudem ist es auch nicht fähig, Gedächtniszellen auszubilden, so dass kein gezielter Schutz gegen eine erneute Infektion mit gleichartigen Mikroorganismen besteht. Das angeborene Immunsystem wird ergänzt durch ein Wechselspiel mit dem spezifischen, zur Gedächtnisbildung fähigen und erworbenen Immunsystem.

Eine adäquate, spezifische Immunantwort wird physiologischerweise unter Verwendung löslicher Faktoren als auch über Zell-Zell-Kontakte ausgelöst [29].

Zu den humoralen Komponenten des erworbenen Immunsystems gehören Antikörper und von Lymphozyten produzierte Zytokine. Zu den zellulären Bestandteilen des spezifischen Systems werden die B- und T-Lymphozyten gezählt. Gleichfalls besitzt das adaptive Immunsystem die Fähigkeit eines immunologischen Gedächtnisses, so dass bei wiederholtem Kontakt mit dem gleichen Antigen eine unverzügliche und verstärkte Immunantwort erfolgt. Die Bestandsfaktoren der erworbenen Immunität weisen im Gegensatz zu denen der angeborenen Immunität ein ausgeprägtes Adaptionspotential ihrer Rezeptoren auf, mit denen sie eingedrungene Erreger spezifisch erkennen und so effizient und vollständig eliminieren können [30].

Das angeborene System besitzt als lösliche Komponente das Komplementsystem sowie Zytokine und als zelluläre Komponente insbesondere Granulozyten, Makrophagen/Monozyten, dendritische Zellen und Natürliche Killerzellen. Ohne

notwendigen vorherigen Kontakt mit dem Antigen des Fremdkörpers, werden die unspezifischen Effektorzellen umgehend direkt durch den Fremdkörper aktiviert und eliminieren ihn.

Die Zellen des MPS zirkulieren als Teil des angeborenen Immunsystems im Blut und wandern bei lokalen Entzündungsreaktionen verstärkt in das Gewebe ein. Über bestimmte Rezeptormoleküle können sie körperfremde Pathogene als solche erkennen und phagozytieren. Im Anschluss gelangen sie über afferente Lymphbahnen zu den drainierenden LK. Dort sind sie als APZ dazu in der Lage, die phagozytierten Antigene den affinen, naiven T-Zellen zu präsentieren und so eine sekundäre, spezifische Immunantwort auszulösen [31]. T-Zellen können ihr spezifisches Antigen erkennen, wenn es über das Oberflächenmolekül *Major Histocompatibility Complex* (MHC)-1 oder MHC-2 präsentiert wird [32].

Die durch die antigenspezifische Aktivierung differenzierten Effektor- oder Gedächtnis-T-Lymphozyten verlassen die lymphatischen Organe, um wieder in die Blutzirkulation zu gelangen. Im Falle einer lokalen Entzündung wandern vor allem die Effektor-T-Zellen über die verstärkte Expression von Adhäsionsmolekülen am Endothel des pathologischen Gewebes ein, um den Erreger antigenspezifisch zu erkennen und u.a. über Ausschüttung zytotoxischer Proteine effizient eliminieren zu können [29, 33].

Die Unterbrechung des Kreislaufs der Immunreaktionen stellt im Rahmen von Autoimmunkrankheiten, die z.B. auf einer Überreaktion basieren, ein entscheidendes therapeutisches Zielobjekt dar.

1.1.2. Mononukleäre Phagozyten im Zentralen Nervensystem

Zum MPS zählen größtenteils die Monozyten des zirkulierenden Blutes, die im Gewebe eingewanderten Makrophagen, die dort anwesenden dendritischen Zellen sowie die im ZNS vorkommende Mikroglia [8].

Aufgrund ihrer Eigenschaften zur Phagozytose, zur Sekretion von Zytokinen und der Antigenpräsentation, spielen die Zellen des MPS eine bedeutende Rolle in Entzündungsreaktionen, insbesondere als Bindeglied zwischen der unspezifischen und adaptiven Immunantwort [34].

Monozyten stammen von myeloiden Vorläuferzellen des Knochenmarkes ab und werden bei Entzündungen vermehrt gebildet. Nach Verlassen des Knochenmarks in

den peripheren Blutkreislauf, zirkulieren sie noch für einige Tage bevor sie über die Gefäßendothelien in das Gewebe einwandern [35]. Die Anzahl der vom Blut in das Gewebe einwandernden Monozyten wird über Metaboliten, Proinflammations-, und Immunfaktoren stimuliert. Durch den Einfluß noch weitgehend unbekannter Faktoren differenzieren sich die Monozyten im Gewebe zu Gewebsmakrophagen und können so zur Abwehr, Gewebereparation und – regeneration herangezogen werden [8]. Die Makrophagen zeichnen sich besonders durch ihre Fähigkeit zur Phagozytose aus, wodurch sie das entzündete Gewebe von Pathogenen und Zelltrümmern befreien. Die phagozytierten Trümmer werden intrazellulär prozessiert und es kann im Verlauf über Antigenpräsentation an immunkompetente Zellen zu einer spezifischen Immunantwort kommen [36].

Ein anderer Teil der Monozyten differenziert sich zu dendritischen Zellen, die allerdings auch aus anderen Vorläuferzellen hervorgehen können. Sie kommen in lymphatischem sowie nicht lymphatischem Gewebe vor, in welchen sie üblicherweise ihre zytoplasmatischen Fortsätze ausbilden und APZ-typische Funktionen übernehmen [8].

In der Neuroimmunologie sind die Angehörigen der Monozyten-Familie eine umstrittene und schwierig einzuordnende Zellart. Ihre Heterogenität und ihre divergenten Funktionen und besonders ihre Funktionsbereiche sind schon vielfach erforscht worden, vor allem angesichts ihrer entscheidenden Rolle im zentralen Immunsystem [37-39]. Ca. 15 % der Zellen des ZNS exprimieren typische Makrophagen-Kennmoleküle [40], darunter das α M β 2-Integrin (auch bekannt als CD11b/CD18 oder MAC-1), insgesamt existieren mindestens fünf Subtypen [41].

Es bleibt bis dato experimentell schwierig, Mikroglia anhand ihrer heterogenen Herkunft oder ihrer Lokalisation aufzutrennen und isoliert zu untersuchen bzw. zu beurteilen. In vielen Studien wurden die ortsständigen ZNS-Makrophagen mit einer sternförmigen Morphologie als Mikroglia definiert. Makrophagen im ZNS mit einem amöboidartigen Phänotyp, wurden entweder als entzündungsbedingt aus dem Blut eingewanderte Monozyten oder als aktivierte Mikroglia kategorisiert [42, 43].

Jedoch ist die Einordnung der Herkunft der Mikroglia rein anhand des Phänotyps ungünstig, da die im Verlauf aus peripher einwandernden Monozyten auch die ramifizierte Morphologie der Mikroglia annehmen [10, 44].

Als Unterscheidungsmerkmal kann der Zeitpunkt der Einwanderung heran gezogen werden: postnatal spielen periphere Blut-Monozyten eine Hauptrolle bei zentralen

Entzündungsprozessen und gelangen dann in hoher Anzahl zu den Läsions-Orten [45-47]. Zuerst gelangen die Monozyten über postkapillärer Venolen im ZNS in den perivaskulären Raum, von welchem aus ein kleiner Prozentsatz sekundär über die Glia limitans in das Neuropil einwandert [10]. Langansässige Mikroglia hingegen wandert schon pränatal in das ZNS [48] und scheint dort lebenslang zu verweilen, wobei ein Teil gelegentlich durch von peripher neueinwandernden Zellen ersetzt wird [2, 17, 49, 50]. Innerhalb von drei Monaten zeigte sich eine Zuwanderung von 5% der gesamten Mikroglia-Population und bis zu 26 % der Mikroglia derjenigen im Kleinhirn. Die Austausch-bzw. Zuwachsrates liegt dennoch weitaus unter der in anderen Geweben. Bemerkenswert ist, dass im Gegensatz zu den übrigen Zellen im ZNS, die Zellen des MPS (die Mikroglia) anteilig austauschbar zu sein scheinen.

1.1.3. Lymphatische Organe (Immunologische Organe)

Die lymphatischen Organe nehmen im Kreislauf der Immunreaktion als Kontaktstelle zwischen dem angeborenen und dem erworbenen Immunsystem eine zentrale Stellung ein.

Die primären lymphatischen Organe sind das Knochenmark und der Thymus, in welchen die Lymphozyten aus ihren Vorläuferzellen vor ihrer peripheren Zirkulation heranreifen. Im Laufe ihrer Zirkulation siedeln sich die B- bzw. T-Zellen in den sekundären lymphatischen Organen wie der Milz und den LK ab. In den LK kann es zu einer Antigenpräsentation und anschließender Proliferation und Differenzierung der B-/T-Zellen zu Effektor- und Gedächtniszellen kommen. So kann von dort aus eine spezifische Immunantwort des adaptiven Immunsystems ausgelöst werden [31]. Funktionell betrachtet lässt sich ein LK in verschiedene Kompartimente aufteilen: Ein Kompartiment wird durch ein afferentes Lymphgefäß mit Lymphe versorgt, worüber Antigene, Lymphozyten und APZ in die LK-Sinus eintreten können. Nach Durchfluss der Lymphe durch den LK verlässt sie diesen über das Vas efferens im LK-Hilus und gelangt über grössere Lymphgefäße in die Blutbahn [51].

Histologisch können Kortex, Parakortex und Medulla unterschieden werden. Im Kortex liegen die Primärfollikel bzw. im aktiven Zustand Sekundärfollikel mit Keimzentren. In den Keimzentren finden sich insbesondere Zellen aus der monozytären Zellreihe wie folliculäre dendritische Zellen und Makrophagen. Im Parakortex kommen hauptsächlich T-Zellen, aber auch APZ vor. Hier findet eine

eventuelle Interaktion beider Zellarten statt, so dass unter Miteinbezug von B-Zellen in den Sekundärfollikeln eine adaptive Primärantwort ausgelöst werden kann [52]. Parallel zu diesem Prozess werden durch Plasmazellen spezifische Immunglobuline gebildet, welche gemeinsam mit aktivierten, spezifischen Lymphozyten der B- und T-Zellreihe mit der Lymphe in die Blutbahn ausgeschwemmt werden.

1.1.4. Immunologische Toleranz

Das immunologische Adaptionspotential birgt die Gefahr, dass körpereigene Strukturen als Antigene erkannt werden und sich das Immunsystem gegen den eigenen Organismus richtet. Durch negative Selektion (Deletion) über Apoptose-Induktion oder Umwandlung in einen inaktiven Zustand (Anergie) wird die Nichtreaktivität der Immunzellen gegenüber körpereigenen Strukturen wirksam überwacht. Diese Kontrolle in Form von Mechanismen der Toleranzinduktion, erfolgt sowohl im Knochenmark, im Thymus, in den LK, als auch in den peripheren Geweben [31].

1.1.5. Autoimmunität

Autoimmunität ist die Konsequenz des Verlusts der immunologischen Toleranz. Autoimmunkrankheiten betreffen heutzutage ungefähr 5 % der Weltbevölkerung und sind mit einer hohen Morbidität als auch Mortalität verbunden. Aktuell werden 70 Krankheitsbilder des Menschen zu den Autoimmunkrankheiten gezählt [33].

Die Ätiologie dieser chronisch-entzündlichen Erkrankungen scheint eine Kombination von genetischer Prädisposition, Umweltfaktoren und immunologischer Dysfunktion zu sein. Es wird davon ausgegangen, dass die Kontrollmechanismen der Immuntoleranz für körpereigene Antigene nicht mehr hinreichend funktionieren, so dass autoreaktive Lymphozyten die körpereigenen Zellen angreifen und es dabei zu Gewebsschäden kommt. Die anschließende Leukozyten- und Lymphozyteninfiltration, die massive Zytokinproduktion und Antikörperseznierung an der Läsionsstelle, sind charakteristisch für den Entzündungsverlauf bei Autoimmunkrankheiten [29].

Die Autoreaktivität der Lymphozyten kann bestimmte Zellen eines Organs oder Gewebes betreffen und/oder sich auch systemisch auswirken. Eine häufig auftretende, das ZNS betreffende Autoimmunerkrankung ist beispielsweise die Multiple Sklerose (MS).

1.1.6. Das Zentrale Nervensystem

Das ZNS übernimmt die komplizierteste Funktion des Organismus, indem es externe Reize aufnimmt und verarbeitet, interne Signale wahrnimmt und koordiniert, Verhaltens- und Kommunikationsweisen auslöst und somit die Grundlage zum Überleben des Vertebraten bereitstellt [53].

Das ZNS setzt sich aus Nervenzellen (Neuronen) und zu 90 % aus den Gliazellen („Glia“= griech: Leim) zusammen. Die Neurone, bestehend aus einem Zellkörper und mehreren Fortsätzen, übernehmen die Reizaufnahme, Erregungsweiterleitung und Reizverarbeitung. Die Gliazellen hingegen stellen eine Art Bindegewebe mit zahlreichen Aufgaben wie der Homöostase-Aufrechterhaltung, der Immunabwehr, der Unterstützung der BBB und der Isolierung der Nervenfasern dar.

Ein Neuron besteht aus dem den Zellkern enthaltenden Zellkörper, sowie aus einem oder mehreren Fortsätzen. Bei den Fortsätzen handelt es sich entweder um Dendriten, welche ein afferentes Signal aufnehmen können, oder um Axone, welche für die Erregungsweiterleitung verantwortlich sind. Die Axone sind zur elektrischen Isolierung und starken Beschleunigung der Impulsweiterleitung von einer Mark- oder Myelinscheide, gebildet aus Oligodendrozyten, umgeben. Letztere besitzen eine hohe klinische Bedeutung im Hinblick auf die Pathogenese von Autoimmunkrankheiten (siehe auch 1.1.7.).

1.1.7. Autoimmunpathologien des Zentralen Nervensystems

Die häufigste Autoimmunkrankheit des ZNS ist heutzutage die MS mit einer Prävalenz von 30-80/100.000 in Mitteleuropa und weltweit über einer Million betroffener Individuen, meistens Frauen zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr [29, 54]. MS wird in vielen neurowissenschaftlichen Studien klinisch als auch experimentell erforscht. Im Rahmen dieser Krankheit spielt die Interaktion zwischen

peripherem und zentralem Immunsystem eine ausschlaggebende Rolle. Die Erforschung der Details dieser Interaktion ist somit essentiell.

Die Pathophysiologie der MS entsteht durch eine Autoimmunreaktion, wobei autoreaktive T-Zellen Bestandteile des zentralen Myelins attackieren und es zu einer disseminierten Demyelinisierung neuronaler Axone kommt. Die floriden entzündlichen Zellinfiltrate bei MS bestehen zu einem hohen Anteil aus Makrophagen [55, 56], welche das betroffene Myelin phagozytieren können. Im weiteren Verlauf steht der vollständige Myelinverlust mit seinem akuten klinischen Korrelat der MS im Vordergrund [29].

Die bedeutende Rolle der Durchlässigkeit der BBB bei MS Patienten zeigt sich darin, dass auch bei klinisch gesunden Probanden myelinreaktive T-Zellen gefunden wurden [57, 58]. Im Laufe des Krankheitsprozesses kommt es nach jetzigem Kenntnisstand zur Präsentation von zentralen Antigenen durch antigenpräsentierende Zellen an die T-Zellen, worauf wiederum verstärkt zentral Myelin attackiert und phagozytiert wird [59].

Die Therapieoptionen zur Behandlung von MS haben sich im vergangenen Jahrzehnt zwar erheblich erweitert, allerdings fehlt bis heute eine vollständig kurative Therapieoption. Die etablierte medikamentöse Therapieoption für den akuten Schub ist die Behandlung mit anti-inflammatorischen Glukokortikoiden, welche die Immunreaktion unterdrücken. Zur Schubprophylaxe spielen neuere Wirkstoffe wie Interferon- β , Glatirameracetat und Immunglobuline eine größere Rolle [60]. Bei Versagen der Basistherapie, werden Mitoxantron oder Natalizumab (Tysabri®) eingesetzt. Natalizumab ist ein Anti-VLA-4-Antikörper, welcher an ein Adhäsionsmolekül auf T-Lymphozyten und Monozyten bindet und so deren Anheften am Endothel und damit deren Invasion ins ZNS verhindert [61]. Letzteres hebt die Bedeutung der Immunzellendynamik als strategisches Ziel bei der Behandlung neuroimmunologischer Krankheiten hervor.

1.2. Das periphere Immunsystem und das Zentrale Nervensystem

1.2.1. Immunprivileg des Zentralen Nervensystems

Das Immunprivileg des ZNS wurde basierend auf in den vorherigen Jahrzehnten wegweisenden Experimenten erstmals 1953 von Billingham und Boswell als solches bezeichnet [62]. Das Phänomen der potentiellen freien Passage von Glucose und einigen anderen Substanzen in das Hirnparenchym, aber nicht von Erythrozyten oder Bakterien ließ schon die Existenz einer speziellen Barriere zwischen der Peripherie und dem ZNS vermuten. Im Verlauf konnte für zahlreiche Auslöser von Immunreaktionen in peripherem Gewebe wie Fremdgewebe [63], Bakterien [64], Viren [65] und Vektoren [66] nachgewiesen werden, dass nach deren Platzierung in zentrales Nervengewebe keine Immunantwort ausgelöst wurde. Wenn aber ein peripheres Immunorgan wie die Milz zusammen mit dem Fremdkörper in das ZNS transferiert wurde, konnte die bis dato unbekannte aber offensichtliche Schranke zwischen peripherem Immunsystem und ZNS umgangen werden [67].

Das ZNS enthält größtenteils nicht regenerationsfähiges, hoch differenziertes und postmitotisches Gewebe, so dass ein Untergang desselbigen mit einem unwiederbringlichen Verlust einhergehen würde. Im Rahmen einer Immunreaktion des Körpers ist davon auszugehen, dass nicht ausschließlich der zu bekämpfende Keim eliminiert wird, sondern es mitunter zu einem Zelluntergang des umgebenden Gewebes kommen würde. Im ZNS wäre dieser Neuronenverlust nicht kompensierbar und daraus folgend mit schweren neurologischen Defiziten verbunden. Evolutionär gesehen hat bei höheren Organismen die Wiederherstellung der komplexen Nervenverschaltung in Folge eines Hirnschadens länger gedauert, als das die durch körperliche Einschränkungen entstandenen Überlebensnachteile kompensiert werden konnten. Das bedeutet, ein zentrales Immunprivileg muss einen essentiellen Vorteil gegenüber einer zentralen Immunabwehr besitzen.

Das Immunprivileg beruht erstens auf der selektiven BBB, wodurch der Zugang zum ZNS nicht wie in peripheren Geweben unbeschränkt ist, zweitens auf der ZNS-eigenen, aktiven immunologischen Schranke [2, 68], sowie drittens auf dem Fehlen eines klassisch-definierten und unmittelbaren sekundären immunologischen Organs. Nach gegenwärtiger Auffassung ist die BBB eher als erhöhte Zugangsschwelle denn als absolute Grenze zu verstehen. Die routinemäßige immunologische Überwachung des ZNS durch das periphere Immunsystem und auch das immunologische Potential

hat sich bereits mehrfach bestätigt. Unter physiologischen Konditionen konnte die stetige Anwesenheit einer geringen Anzahl von T-Lymphozyten im ZNS mit Hilfe immunhistochemischer Methoden nachgewiesen werden [69-71]. Gleichfalls wurde die kontinuierliche aber langsame Migration von Monozyten in das ZNS durch eine intakte BBB schon vor zwei Jahrzehnten belegt [72, 73]. Erstaunlicherweise führt eine mechanische oder pathologische Unterbrechung der BBB nicht notwendigerweise zu einem erhöhten Leukozyten-Eintritt [74]. Das spricht für die hohe Bedeutung der zweiten Säule des Immunprivilegs, nämlich dass intern das ZNS selbst über diverse Mikroglia-Astrozyten-Interaktionen und -Reaktionen für eine Herabregulierung zentraler Immunreaktionen sorgt [47].

Selbst wenn periphere Leukozyten das ZNS immunologisch überwachen, bestehen doch immanente Funktionsfaktoren, welche diese Art der Überwachung und damit auch Immunprozesse limitieren. Beispielsweise unterdrücken die von Neuronen sezernierten TGF- β die T-Zellproliferation der eingewanderten T-Zellen und fördert deren Umwandlung in regulatorische T-Zellen [75, 76]. Astrozyten sezernieren nicht identifizierbare lösliche Faktoren, welche die T-Zellproliferation und deren Zytokinproduktion hemmen [77] oder die Bildung regulatorischer T-Zellen induzieren [78]. Auch Mikroglia exprimieren Proteine, welche über diverse Mechanismen die T-Zellaktivierung einschränken [79].

Die dritte Säule des zentralen Immunprivilegs besteht in dem nicht unmittelbaren Zugang zu afferenten, lymphatischen Lymphdrainagewegen bzw.-organen und gleichzeitig dem erschwerten efferenten lymphatischen Zugang in Form der BBB. Der hindernisfreie Zugang sowie Abfluss des lymphatischen Systems ist für die Auslösung einer unterstützenden, sekundären und adaptierten Immunantwort notwendig (siehe 1.1.1/1.1.3).

Insgesamt bedeutet das zentrale Immunprivileg nicht die vollkommene Isolation gegenüber dem peripheren Immunsystem. Dahingegen gibt es Faktoren, welche die Interkommunikation zwischen zentral und peripher verlangsamen und so die Schwelle zu zentraler Immunaktivität aufrecht erhalten.

1.2.2. Immunologische Migrationswege rund um das ZNS

Der Zugang zum neuronalen Parenchym ist im Vergleich zu anderen Organen stärker kontrolliert und begrenzt, um die Zell- und Makromolekülinfiltration möglichst gering zu halten. Allerdings wird das ZNS stetig sowohl durch externe Nährstoffe versorgt, als auch durch periphere Immunzellen patrouilliert.

Die Eingangswege notwendiger externer Bestandteile von peripher nach zentral verlaufen über den Bluttransport bis zu den kapillären Arteriolen, wo es dann zum Übertritt entlang der Gefäßwände kommt. Die normale Blutversorgung und damit Nährstoffversorgung des ZNS verläuft erst über die innere „Filterschicht“, der selektiven (bedeutet hierbei mit Pumpen ausgestattet, welche abhängig von Molekülgröße, Ionen-Ladung etc. Stoffe entlang eines Gradienten aktiv transportieren) *tight junctions* des Gefäßendothels, um dann die Basalmembran und eventuell die äußere Barriere in Form der eng aneinander liegenden Astrozytenfortsätzen, der Glia limitans, in das Hirnparenchym zu passieren [2, 3, 53]. Auch Serumproteine, insbesondere Immunglobuline, gelangen abhängig von ihrem Molekulargewicht und ihrer Ionenladung über die „gliovaskuläre Membran“ [3, 80] in das ZNS.

Unter physiologischen Umständen exprimieren die Endothelzellen der Kapillaren einige wenige Adhäsionsmoleküle für Leukozyten zur Migration aus dem Blut in das Neuropil [80]. Bisher scheinen die postkapillären Venolen primär der Ort für die Migration von Leukozyten in das Nervenparenchym zu sein [81]. Im Verlauf einer EAE konnte die Diapedese für Monozyten auf dem transzellulären Weg beobachtet werden, wobei die interendothelialen *tight junctions* intakt blieben [82].

Es wurde schon darauf hingewiesen, dass die Abwanderung aus dem ZNS gen Peripherie ein wichtiger Bestandteil des zentralen Immunsystems ist. Anatomisch gesehen, bestehen keine typischen lymphatischen Abflusswege aus dem Gehirn.

Zerebrale extrazelluläre Flüssigkeiten bestehen aus dem Liquor cerebrospinalis, welcher am Choroidplexus in den Hirnventrikeln produziert wird, und aus der interstitiellen Flüssigkeit. Letztere wird an der BBB gebildet und befindet sich in den Räumen zwischen den Zellen des Hirnparenchyms [21, 83]. Entlang dieser Flüssigkeit erfolgt letztendlich die Verteilung der durch die BBB durchgelassenen Substanzen und Leukozyten zu den ZNS-Zellen. Die intraparenchymale Flüssigkeit wird in den subarachnoidealen Raum abfiltriert, und die zellulären sowie molekularen

Komponenten verlassen diesen Raum über die arachnoidealen Granulationen und über die Hirnnerven, insbesondere über den Nervus olfactorius, welcher die Lamina cribrosa im Os ethmoidale durchbohrt. Der Abflussweg führt die zerebralen extrazellulären Flüssigkeiten zum venösen Blut und zur zervikalen Lymphe. Proteine wurden nach Injektion unilateral in den Nucleus caudatus nur in den ipsilateralen drainierenden zervikalen LK gefunden. Bei Injektion des Proteins in den lateralen Ventrikel, konnte keine bevorzugte Drainage-Seite bezüglich der zervikalen LK nachgewiesen werden [84]. Das weist darauf hin, dass intraparenchymal injizierte Substanzen, die mit der interzellulären Flüssigkeit drainiert werden, sich kaum mit dem Liquorabfluss vermischen. Widner et. al. (1987) wies den afferenten Weg von intraparenchymal injizierten Proteinen über die Lamina cribrosa zu den tiefen zervikalen LK nach [85].

Da das venöse Blut durch die Milz und die Lymphe von LK gefiltert wird, bedeutet dass der Abfluss aus dem ZNS in die Peripherie eine entscheidende Rolle bei der Immunantwort auf ZNS-Antigene spielen muss.

Ein Hinweis auf das Zeitfenster für die Drainage gab die Injektion von Albumin in den lateralen Ventrikel oder ins ZNS-Parenchym, welches 18 Stunden (h) post injectionem (p.i.) in den retropharyngealen (tiefen zervikalen) LK detektiert wurde [86, 87].

Bemerkenswert ist die Verstärkung des Übergangs von Molekülen und Liquor cerebrospinalis aus dem Gehirn in den Kreislauf durch vorherige intraventrikuläre Injektion von proinflammatorischem Zytokin TNF-alpha [88]. Dieser Befund unterstreicht die Bedeutungsgröße des afferenten Armes insbesondere im Rahmen inflammatorischer Krankheitsprozesse.

1.2.3. Interaktion des Immunsystems mit dem ZNS

Die Überlebensfähigkeit des Wirbeltier-Organismus hängt besonders vom Lernvermögen und der Gedächtnisbildung des ZNS und des Immunsystems ab. Lange Zeit ging man davon aus, dass das ZNS vom peripheren Immunsystem isoliert ist. Allerdings haben u.a. die Beobachtungen an unterschiedlichen neuropathologischen Tiermodellen gezeigt, dass die Initiation und Exazerbation der neuropathologischen Vorgänge sich bei immunkompetenten Tieren stärker präsentierte als bei Tieren ohne periphere Immunkompetenz [47, 74, 89]. Hinzukommt die revolutionäre Entdeckung Medawars 1948, als er beobachtete wie

die immunologische Toleranz eines allogenen Hauttransplantats im ZNS nach der Transplantation genetisch-identischen Gewebes unter die periphere Haut, sich in eine Abstoßungsreaktion gegenüber dem Transplantat umwandelte [63]. An letztgenannten Entdeckungen wird die Überlappung beider Systeme erkennbar, welche nach gegenwärtigen Erkenntnissen die Protektion des ZNS vor Krankheitserregern und Neoplasmen durch das Immunsystem impliziert. Dafür müssen die zellulären und molekularen Komponenten des Immunsystems Zugang zum ZNS erhalten, die potentiell gefährlichen Bestandteile im ZNS auffinden und anschließend eine dem Gewebe angemessene primäre Immunantwort herbeiführen. Danach gilt es die Gefahrenursache zu beseitigen und durch Erreichen drainierender LK eine sekundäre, spezifische und damit effizientere Immunantwort auslösen. Dieser Mechanismus setzt eine ständige, komplexe und ausgedehnte Überwachung des ZNS-Zustandes durch das periphere Immunsystem voraus.

Die immunologische Überwachung durch lymphoblastische T-Zellen im ZNS fällt proportional zu anderen Organen gesehen quantitativ geringer aus, womöglich aufgrund der geringeren Exprimierung von Adhäsionsmolekülen auf ZNS-Endothel [2, 90, 91], welche somit auch ein Bestandteil der BBB darstellt. Allerdings wurde beobachtet, dass die im ZNS aufzufindenden T-Zellen sich in einem aktivierten Zustand (T-Lymphoblasten) befinden. Bislang ist unklar geblieben, ob erstens auch nicht aktivierte T-Zellen das ZNS betreten und zweitens, durch welche Art von Antigen die T-Zellen aktiviert wurden bzw. ob sie nur ins ZNS eintreten um nach ihrem Antigen zu suchen. Zumindest ist nachgewiesen, dass sich peripher in den zervikalen LK zentrale Antigene befinden [2, 92], wobei diese über APZ eine sekundäre Immunantwort ausgelöst haben müssten, um die T-Zellen zu aktivieren. Zudem ist bemerkenswert, dass sich bei Verstärkung der peripheren Immunprovokation auch die T-Zellanzahl im ZNS erhöht. Wahrscheinlich wird durch sich in der Blutzirkulation befindliche aktivierende Elemente, die Exprimierung von Adhäsionsmolekülen der zentralen Endothelzellen verstärkt [2].

Die meisten Zellen der Monozyten- Familie treten unter physiologischen Umständen in das ZNS hinein [37-39]. Unter pathologischen Umständen (z.B. Virusinfektionen) kann Mikroglia Interleukine sezernieren, welches zentral eine erhöhte Infiltration von Monozyten/ Makrophagen zur Folge hat [93, 94].

Durch das Experiment von Medawar wurde die Präsenz eines efferenten Armes bewiesen, da nach peripherer Immunisierung mit einem Hauttransplantat, dasselbe

Hautgewebe im Anschluß zentral abgestoßen wurde. Dahingegen wurde nach intrazerebraler Injektion von Bakterien [95] oder Viren [65] im peripheren Immunsystem bezüglich eines Nachweises von T-Zellen oder Antikörpern keine Reaktion beobachtet. Dies deutet auf eine Ineffizienz des afferenten Schenkels hin, welcher somit zunächst einen bedeutenden Beitrag zum relativen Immunprivileg des ZNS zu leisten scheint. Gerade der afferente Arm des zentralen Immunsystems soll allerdings die Ursache für die durch ZNS- abstammenden Antigene ausgelösten Immunantworten in Form einer verstärkten Infiltration von T-Zellen und B-Zellen sein [24].

Außerdem demonstrierte Scheinberg 1966, dass transplantiertes, allogenes Hautgewebe im ZNS-Parenchym eine zunehmende Abstoßung eines vergleichbaren Transplantats in der Peripherie zur Folge hatte. Damit zeigte er, dass transplantiertes Gewebe im Gehirn eine periphere Immunantwort induzierte und somit doch die funktionelle Existenz eines afferenten Armes des ZNS bewies. Damit wurde die Relevanz der Aufrechterhaltung des Immunprivilegs durch den afferenten Arm relativiert [96].

Die Signifikanz des afferenten Armes für die Interaktion des peripheren Immunsystems mit dem ZNS wuchs erheblich mit den Entdeckungen von Bradbury et al. bzw. Harling-Berg et al. 1999: die Darstellung der zervikalen LK als die drainierenden sekundären lymphatischen Organe des Gehirns [97]. Die in der interzellulären Flüssigkeit oder im Liquor sich befindenden Antigene und Leukozyten erreichen in relativ hoher Konzentration die drainierenden zervikalen LK und können vor Ort potentiell „naive“ T-Lymphozyten aktivieren. Bisher ist entdeckt worden, dass es vier bis sechs Wochen nach intraventrikulärer Injektion von Antigenen im peripheren Blut zu erhöhten Serum-Antikörpern auf dieses Antigen kommt. Quantitativ erreichte der Antikörper-Titer die gleiche Höhe wie bei einer Antigen-Injektion in extrazerebrale Stellen [98]. Die Entnahme der zervikalen LK vor der Injektion reduziert signifikant den Antikörper-Titer auf das injizierte Antigen. Die Entnahme der Milz hingegen hat keinen Einfluß auf den Titer p.i. [24, 106]. Folglich gelangt der zerebrale Abfluss zwar in die zervikalen LK und die Milz, allerdings bestehen trotzdem noch entscheidende Unterschiede zwischen deren Funktion und Bedeutung.

An eben dieser Stelle gewinnen die aus dem ZNS abwandernden Leukozyten und ihre immunologische Rolle an Bedeutung.

Für T-Zellen konnten Goldman et al. 2006 die Migrationsroute aus dem ZNS verfolgen. Nach 24 h sammelten sich die zuvor nach zentraler Läsion injizierten T-Zellen in den tiefen zervikalen LK, nicht aber in der Milz [25].

Hatterer et al. demonstrierte 2006, wie kultivierte dendritische Zellen nach Injektion in die Ventrikel und auch in eine zentrale Läsionsstelle die B-Zellfollikel zervikaler LK erreichten.

Das führte zur Hypothese, dass die sekundäre Immunantwort in Form der erhöhten Antikörper-Titer womöglich durch in APZ zu zervikalen LK transportierten ZNS-Antigenen erfolgt war.

1.2.4. Die Funktion peripherer Leukozyten innerhalb neuropathologischer Prozesse

Zentrale Immunreaktionen unterscheiden sich essentiell von denen peripherer Immunantworten. Immunantworten des ZNS und auch Phasen neuronaler Degeneration gehen mit einer Infiltration von grösstenteils von peripher einwandernden Monozyten einher [45, 46] (siehe auch 1.1.2.).

Bei der MS spielen Mikroglia und aus dem Blut stammende Makrophagen (Monozyten) zwei der Schlüsselrollen in der Entwicklung der pathologischen Vorgänge und scheinen miteinander zu kooperieren [99]. Sie übernehmen dabei eine Vielzahl an Funktionen. Zuerst besitzen sie die Fähigkeit hochsensibel die ZNS-Pathologien aufzuspüren [43, 100]. Beide sind rasch aktiviert und werden über verschiedenartige Zytokine, Neurotransmitter u.ä. zu den Infektions-, Neurodegenerations-, Schlaganfall- oder Entzündungsorten hingelockt [101]. Beim Auftreten von absterbenden Zellen und Zell-Trümmern wandelt sich Mikroglia in amöboide, phagozytierende Zellen um und gemeinsam mit den aus dem Blut rekrutierten Makrophagen phagozytieren sie Zelldebris, synthetisieren Zytokine und interagieren mit T-Zellen, welche daraufhin zu den Läsionsstellen migrieren [102-104]. Einige mit Zelltrümmern beladene Mikroglia wandern scheinbar aus dem neuronalem Zellparenchym zu den perivaskulären Räumen und verharren dort über längere Zeit [105]. Besonders an den Orten der frühen aktiven Demyelinisierung zeigen die phagozytierenden Zellen eine erhebliche lysosomale und proliferierende Aktivität, und eine starke Hochregulation von mitogenen Rezeptoren, welche in späteren Krankheitsstadien abflacht [106]. Biochemisch besteht die Aktivität von

Makrophagen und Mikroglia zu einem Großteil in der Hochregulation von an der Antigenpräsentation, an dem Myelin- und Gewebeschaden, und an der Produktion von reaktiven Sauerstoffmetaboliten beteiligten Molekülen [107]. Diese Moleküle sind folglich erheblich für die Regulation der Makrophagen-Aktivitätsstärke, deren Interaktion mit zerebralen Lymphozyten und die Myelin-, Axon- und Oligodendrozytenbeschädigung aber auch für die Reparationsinduktion der beschädigten weißen Substanz, verantwortlich [108]. Ein typisches erstes molekulares Merkmal im Rahmen einer MS ist die verstärkte Expression von MHC-Molekülen. Diese Expression von MHC-2 ist auf aktivierte Mikroglia, Makrophagen und aus dem Blut stammenden Leukozyten begrenzt [109] und führt zur Antigenpräsentation, die in der Lage ist eine schwerwiegende Entzündungsreaktion im ZNS auszulösen [110]. Die meisten experimentellen Studien weisen daraufhin, dass der Hauptteil der (anhand der spezifisch-exprimierten Moleküle erkennbar) APZ bei der MS hämatogenen Ursprungs und in perivaskulären Infiltraten konzentriert sind [111, 112]. Es wird bislang kontrovers diskutiert, in welchem Verhältnis aus dem Blut rekrutierte versus ZNS-ansässige Zellen zum Prozess der autoimmunologischen Zerstörung des Myelins beitragen [113, 114].

mitunter die Einbindung des Immunsystems aufgrund inflammatorischer Antworten in denervierten kortikalen Schichten [12, 16]. Hierbei stellt sich als erste Kaskadenstufe die Schädigung von Neuronen mit der daraus resultierenden Störung der ionalen Homöostase und der anschließenden Freisetzung von Sauerstoffradikalen dar [115]. In Folge des Primärschadens setzen die geschädigten Neurone multiple Faktoren in den extrazellulären Raum frei, welche das physiologische Gleichgewicht des betroffenen Hirnareals verändern [116]. Das Resultat ist die schnelle Aktivierung immunkompetenter Zellen wie Mikroglia, Makrophagen und Astrozyten [117, 118].

1.3.2. Das Modell der entorhinalen Kortex-Läsion

Die ECL stellt als stereotaktische, tierexperimentelle Dissektion des Hippocampus vom entorhinalen Kortex ein sehr gut etabliertes in vivo Modell (hier an der Maus) zur Analyse von de- und regenerativen Veränderungen im ZNS dar [119-121] (siehe auch 2.2.8.1.). Infolge der ECL kommt es zu einer mikroglialen und astroglialen Reaktion in der deafferenzierten OML des Gyrus dentatus [14, 15, 122]. Mikrogliazellen ändern ihre typische ramifizierte Form, werden amöboid und migrieren postläsional sehr früh in das denervierte Gebiet zur phagozytotischen Aufnahme von Myelin [11, 19, 123]. Im unlädierten Zustand verbleiben neu einwandernde Makrophagen in den perivaskulären Räumen. Erst im lädierten entorhinalen Kortex, sowie im denervierten Hippocampus kommt es zur erheblichen Infiltration von Makrophagen innerhalb der ersten 24 h post lesionem [1]. Durch die ECL-Technik resultiert eine axonale Degeneration, welche auch im sekundären Krankheitsprozess im Rahmen neuroimmunologischer Erkrankungen entsteht.

1.4. Ziele der Arbeit

Die komplexe Interaktion des peripheren Immunsystems mit dem ZNS insbesondere im Rahmen neuroinflammatorischer Prozesse ist in Anbetracht neuer therapeutischer Strategien bei neurologischen Erkrankungen von ausschlaggebendem wissenschaftlichem Interesse. In diesem Zusammenhang steht insbesondere die Dynamik von hochgradig immunkompetenten Zellen, die in die neuropathologischen Vorgänge unmittelbar involviert sind, im Mittelpunkt der Forschung.

Ein Großteil des Immunzellinfiltrates bei neuroimmunologischen Krankheiten besteht aus von peripher einwandernden Monozyten. Bisher konnte nach Setzen einer zentralen Läsion die Invasion von Monozyten über die BBB in das ZNS entdeckt werden und so der efferente Arm des zentralen Immunsystems identifiziert werden. Weitere Studien zeigten, dass andere immunkompetente Zellen postläsional die peripheren LK erreichten und die Anzahl der peripher gefundenen Zellen mit dem Ausmaß des zentralen Entzündungsprozesses korrelieren.

In dieser Arbeit wird die Dynamik von Monozyten nach Injektion in das lädierte Zentrale Nervensystem untersucht. Dazu erfolgt zunächst die Isolation und Aufreinigung von peripheren Monozyten aus dem Blut und die histologische als auch molekulare Phänotypisierung. Mittels der ECL soll ein zentraler Entzündungsvorgang imitiert werden, um die Immunzelldynamik im Rahmen von neuroinflammatorischen Situationen zu untersuchen. Nach Läsionssetzung durch ECL und Injektion der grünfluoreszierenden Zellen erfolgt die mikroskopische Analyse histologischer Schnitte entkalkifizierter Köpfe. Nachdem der afferente Weg der Immunzellen aus dem ZNS in die Peripherie herausgestellt wird, bleibt zu klären, welchen Zielort die Monozyten erreichen werden. Dazu werden die immunologischen Organe d.h. alle LK als auch die Milz histologisch in Schnitten des gesamten Organs auf GFP-Zellen analysiert und über bestimmte Zeitpunkte ein Zeitfenster erstellt. Anhand des Zeitfensters kann erkannt werden, ob die Zellen passiv über den Blutfluß innerhalb von wenigen Stunden die Peripherie erreichen oder über aktive Migration einen längeren Zeitraum für die Abwanderung benötigen.

Der Migrationsweg der Monozyten aus dem ZNS führt zu neuen Einblicken und Erkenntnissen über die Anatomie und Funktion des afferenten Armes des zentralen Immunsystems zum peripheren Immunsystem. Wenn sich ein unmittelbarer Migrationsweg der Monozyten aus dem ZNS in die Peripherie in der vorliegenden Arbeit entdecken läßt, würde das die ständige Interaktion zwischen zentral und peripher verdeutlichen und die so statuierte dritte Säule des zentralen Immunprivilegs verschmälern (siehe 2.3.1.).

Durch neue Erkenntnisse über den Migrationsweg und die Migrationsdynamik der Monozyten aus dem ZNS kann ein neuer potentieller Ansatzpunkt für therapeutische

1. EINLEITUNG

Interventionen bei neuroimmunologischen Erkrankungen identifiziert und in Zukunft pharmakologisch von ausschlaggebendem Nutzen sein. Ein Ansatzpunkt in der Peripherie und damit außerhalb des kaum regenerierbaren ZNS, ist insbesondere bei der Behandlung neuroimmunologischer bzw. neurodegenerativer Erkrankungen essentiell.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Material

2.1.1. Laborgeräte und Verbrauchsmaterialien

Deckgläser	R. Langbrinck, Emmendingen, BRD
Brutschrank	Heraeus, Hanau, BRD
FACS Canto II	Becton Dickinson (BD) Technologien, Heidelberg, BRD
FACS- Röhrchen	BD Falcon, Heidelberg, BRD
FlowJo Version 6.3.3	Tree Star Inc., Ashland, USA
Fluoreszenzmikroskop	Olympus, Hamburg, BRD
Gefrierschrank (-80°C)	Bosch, BRD
Hamilton Pipette	Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz
Horizontalschüttler	IKA Labortechnik, Staufen, BRD
Inkubator	Heraeus, Hanau, BRD
Kühlschrank (+4°C)	Bosch, BRD
Kryotom	Mikrom Laborgeräte GmbH, Walldorf, BRD
Laborzentrifuge	Heraeus, Hanau, BRD
Lichtmikroskop	IX70, Olympus, Hamburg, BRD
Neubauerzählkammer	Rudolf Brand GmbH & Co, Wertheim, BRD
Nylonsieb 30 µm	Becton Dickinson, Bergisch Gladbach, BRD
Magnetrührer	IKA Combimag RCT
MediMACS-System	Miltenyi, Bergisch Gladbach, BRD
Microsoft-Excel	Microsoft Excel Version 2007, Microsoft Corporation, BRD
Objektträger	R. Langbrinck, Emmendingen, BRD
Perfusionsmaschine	Ismatec, Schweiz
Pipettenspitzen	Biozym, Oldendorf, BRD
Präparationsbesteck	Braun Aesculap, Tuttlingen, BRD
Präzisionswaage-BP 2215	Satorius, Göttingen, BRD
Stereotakten Apparat	Kopf Instruments, Tujunga, CA, USA
Sterile Werkbank	Anthos Mikrosysteme, Köln, BRD
Vibratom	Leica VT1000S Leitz, Wetzlar, BRD
Vortexer	Scientific Industries, N.Y., U.S.A.
Waage- Satorius BP 110	Satorius, Göttingen, BRD

2. MATERIAL UND METHODEN

Zellkulturplatten	Nunc, Wiesbaden, BRD
Zellschaber	Renner GmbH, Darmstadt, BRD
Zentrifugenröhrchen	Falcon, Heidelberg, BRD
Zentrifuge	Heraeus, Hanau, BRD
Zentrifugenröhrchen	Sarstedt, Nürnberg, BRD

Sämtliches allgemeines Labormaterial wurde aquiriert von Sarstedt, Nürnberg, BRD, Rommelsdorf, BRD, BD, Heidelberg, BRD und Nunc, Wiesbaden, BRD.

2.1.2. Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden in der Qualität pro analysis eingesetzt.

Die einzelnen Chemikalien sind zuerst aufgelistet, es folgen die Angaben der hergestellten Lösungen.

Aceton	J.T. Baker, Deventer, NL
Agar	Sigma-Aldrich, München, BRD
7-Aminoactinomycin D	BD Pharmingen, CA, USA
Anti-Kaninchen Zweitantikörper aus der Ziege	ZYMED Laboratorien, CA, USA
Aqua destillata	Braun AG, Melsungen, BRD
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma Aldrich, St.Louis, USA
CD11b Antikörper, (Klon: M1/70)	Milenyi Biotec, Bergisch Gladbach, BRD
CD11b Antikörper FACS, (Klon: A95-1)	BD Biosciences, Heidelberg, BRD
CD11c Antikörper, FACS, (Klon G235-2356)	BD Biosciences, Heidelberg, BRD
4',6'-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI)	Leinco Technologien, St.Louis, USA
Dispase	Roche, Mannheim, BRD
DNase-I	Roche, Mannheim, BRD
Entelan	Merck, Darmstadt, BRD
Ethanol	Merck, Darmstadt, BRD
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma, Hamburg, BRD
FACS-Antikörper	alle BD Biosciences, Heidelberg, BRD
Fc-Block: Klon 2.4G2	BD Biosciences, Heidelberg, BRD
Ratten IgG	Nordic, Tilburg, BRD

2. MATERIAL UND METHODEN

Fetales Kälberserum (FCS), hitzeinaktiviert	Invitrogen, Karlsruhe, BRD
Hank's Salzlösung (HBSS) ohne Ca und Mg	Gibco BRL, Eggenstein, BRD
Histopaque 1083	Sigma Aldrich, St.Louis, USA
Immu-mount	Shandon, Pittsburgh, USA
Kaliumferrozyanidlösung sauer/wässrig	Merck, Darmstadt, BRD
Kernechtlösung	Merck, Darmstadt, BRD
Ketamin 20%	CuraMed GmbH, Karlsruhe, BRD
Kollagenase D	Roche, Mannheim, BRD
Makrophagen-1 Antikörper (MAC-1)	Leinco Technologies, St.Louis, USA
Microbeads CD11b (Mikropartikel)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, BRD
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt, BRD
Normales Ziegen Serum (NGS)	Vector Laboratorien, Burlin Game, USA
Paraformaldehyd (PFA)	Merck, Darmstadt, BRD
Penicillin/Streptomycin (PS)	Invitrogen GmbH/ Gibco, Darmstadt, BRD
Percoll	Biochrom AG, Berlin, BRD
Phosphatpuffersalz (PBS)	Sigmar-Aldrich, Deisenhofen, BRD
Poly-D-Lysin	Sigmar-Aldrich, Deisenhofen, BRD
Rompun 8%	Bayer Vital GmbH, Frankfurt, BRD
RPMI 1640	Gibco Life Technologies, Gaithersburg, USA
TLCK	Roche, Mannheim, BRD
Triton	Sigma-Aldrich, München, BRD
Trypanblau	Sigma, Deisenhofen, BRD
Very small supermagnetic iron-oxide particles (VSOP)	Ferropharm, Teltow, BRD
Xylol (Dimethylbenzen)	MERCK, Darmstadt, BRD

2.1.3. Versuchslösungen

Antikoagulans	: 2mM EDTA in Puffer Based Saline (PBS) bei pH: 7,2
Blockierungslösung (Immunfärbung):	10% Triton und 10% NGS in PBS
DMEM	: 10% FCS + 1% P/S
FACS-Puffer	: 5% FCS in PBS
Fc-Block	: Fc-Antikörper im Verhältnis 1:500 zum FACS-Puffer
Ketamincocktail	: 20% Ketamin, 8% Rompun in 0,9% NaCl
MACS-Puffer	: 2 mM EDTA und 0,5% BSA in PBS

2. MATERIAL UND METHODEN

Kulturmedium : DMEM, 10% FCS , 1% Penicillin/Streptomycin
Natriumchloridlösung: 0,9% NaCl in aqua dest.
Nährkulturlösung : RPMI 1640, 10% FCS, 2% PS
PBS : 8 g/l, 0,2 g/l KH_2PO_4 , 1,4 g/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
Percollösungen : 70% Percoll in HBSS, 37% Percoll in HBSS, 30% Percoll in HBSS
PFA : 4 % PFA in 60 °C erhitztes PFA, 1-2 Tropfen NaOH, gefiltert
Verdauungslösung : 0.05 % Collagenase D (25 μl Stammlösung ad 5 ml
0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ TLCK (1:100 Verdünnung mit HBSS der Prästocksolution davon 5 μl ad 5 ml) und 0.025 U/ml DNase I (ca. 50 μl ad 5 ml) 0.5% Dispase (125 μl ad 5 ml) in HBSS/je 5 ml pro Hirn. Die fertige Lösung wird steril filtriert.

2.1.4. Versuchstiere

Alle Versuche, die Tiere involvieren, wurden im Einklang mit den deutschen und europäischen Richtlinien zum Umgang mit Labortieren durchgeführt. Die Versuche waren durch die Tierschutzkommission des Landesamtes für Gesundheitsschutz und technische Sicherheit Berlin genehmigt (Tierversuchsnummer G0240/06 am 20.09.2006 genehmigt und G0404/08 am 14.4.2009 genehmigt).

Die Blutisolation zur Gewinnung von GFP-exprimierenden Monozyten erfolgte aus transgenen Tieren in einem Alter von sechs bis acht Wochen mit dem genetischen Hintergrund von C57 BL/6. Die Zellen der Versuchstiere exprimierten GFP, welches in allen Zellen über den β -Aktin Promotor kontrolliert wird [124].

2.2. Methoden

2.2.1. Präparation von murinen Monozyten

Zur Detektion und Darstellung der Migrationsroute von Monozyten nach Injektion in das lädierte ZNS mussten Monozyten aus dem peripheren Blutkreislauf in einer hohen Reinheit und mit hoher Vitalitätsrate isoliert werden. Nach der Isolation wurden in einer Zellprobe auf histologischem Weg (immunhistochemisch) sowie in der Durchflusszytometrie die Spezifität sowie die Überlebensrate der isolierten Monozyten nachgewiesen.

Im Ausblick wurden weiterführende Experimente durchgeführt. Dazu erfolgten die Versuche zur Eisenbeladung von Monozyten sowie die Isolation und intrazerebrale Injektion von adulter Mikroglia.

2.2.1.1. Durchführung der transkardialen Perfusion

Zur Blutgewinnung wurden die Versuchstiere per intraperitonealer Injektion des Ketamin-Cocktails (10 µl/g pro Körpergewicht) in eine tiefe Narkose gelegt. Die Narkosetiefe wurde durch eine fehlende Reaktion auf Schmerzreize überprüft. Anschließend wurde das Tier zur transkardialen Perfusion auf dem Operationstisch fixiert und zur maximalen Sterilität das Fell mit Alkohol abgesprüht. Per Medianschnitt wurde der Zugang zur Bauch- und Brusthöhle ermöglicht. Das freiliegende Herz konnte so fixiert und der linke Ventrikel am Apex mit der Perfusionskanüle erreicht werden. Die Inzision des rechten Atriums ermöglichte die Aufnahme des heraustretenden peripheren Blutes (pro Maus etwa 1,5-2 ml) mit Hilfe einer 2 ml Spritze, mit 0,5 ml vorgelegtem Antikoagulans. Im Anschluss wurde die Perfusionspumpe angeschaltet und es konnte steril filtriertes NaCl als Perfusionslösung durch den Kreislauf gespült werden, bis die Leber sich blutleer zeigte. Es wurde möglichst wenig mit NaCl vermengtes Blut aufgenommen.

2.2.1.2. Präparation von Monozyten mittels Dichtezentrifugation

Alle Zellkulturarbeitsschritte wurden mit gekühlten Reagenzien und Arbeitsmaterialien gemäß den Vertreiberangaben und unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Eigens

2. MATERIAL UND METHODEN

hergestellte Puffer wurden vor Gebrauch steril filtriert und unter der sterilen Werkbank verarbeitet.

Das isolierte Blut wurde im Verhältnis 1:1 mit der Nährkulturlösung vermischt.

Periphere mononukleäre Zellen (PBMCs= B-Zellen, Monozyten, NK-Zellen, T-Zellen, Thrombozyten) können mit Hilfe von Dichtegradienten durch eine isopyknische Zentrifugation von Erythrozyten, Granulozyten und toten Zellen getrennt werden. Dafür erfolgte die vorsichtige Schichtung des Blutgemisches auf den Dichtegradienten mit folgender Dichtezentrifugation für 20 min bei einer Umdrehungszahl von 2400 rpm bei 4°C ohne Bremsung.

Die Dichte des Gradienten ist dabei so eingestellt, dass Erythrozytenaggregate und tote Zellen die Gradientenschicht passieren. Granulozyten dringen in die Gradientenphase ein, während Lymphozyten, Monozyten und Thrombozyten sich in der Interphase ansammeln. Aus der durch die Dichtezentrifugation entstandene Grenzschichtung, konnte die die Leukozyten enthaltende Interphase aus den 50 ml Plastikbehältern vorsichtig mit einer Transferpipette abgenommen und in einen 15 ml Behälter überführt werden.

Da die zu trennenden Zellen als Einzelzellen in Suspension vorliegen müssen und keine Klumpen, Aggregate oder Teilchen größer als 30 µm enthalten sein sollten, wurde die Zellsuspension durch ein Nylonzellsieb (30 µm) gespült. Pro Tier wurden 10 ml PBS hinzugefügt und das Gemisch 10 min lang bei 1100 rpm und 4 °C zur Waschung zentrifugiert. Der Überstand wurde hiernach verworfen, und das Pellet in 15 ml RPMI resuspendiert.

2.2.1.3. Bestimmung der Zellzahl

10µl der Zellsuspension wurde mit Trypanblau im Verhältnis 1:10 verdünnt. Danach erfolgte die Bestimmung der Zellzahl mit einer Neubauer-Zählkammer. Dazu wurden unter einem inversen Mikroskop bei 100 facher Vergrößerung dreimal 16 Felder der Zählkammer ausgezählt, der Mittelwert der jeweiligen Summen gebildet und unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors die Zellzahl berechnet. Trypanblau diffundiert nur durch die Zellmembran toter Zellen und färbt somit nur diese blau an, allerdings werden alle übrigen durch die die blaue Lösung entstandene Umrandung ebenfalls zählbar.

2.2.1.4. Zellinkubator

Für eine höhere Reinheit wurden die Zellen im Brutschrank inkubiert. Dabei konnten sich die Monozyten im Verlauf der Inkubation durch ihre Ausläufer an die Oberfläche der Platten adhären, während die anderen Leukozyten sich freifliegend in der Lösung befanden. Die Zellen wurden auf 200.000 pro 1 ml Nährkulturlösung (beinhaltete 50 % FCS) adjustiert und auf eine 6-Loch-Platte aufgeteilt. Nach Inkubation von einer Stunde im Brutschrank bei 37 °C und 5 %iger CO₂-Atmosphäre adhärten die Monozyten an der Oberfläche der Platten. Anschließend konnten die übrigen Zellen im Überstand des Mediums durch mehrere Waschschriffe entfernt werden. Die adhärenenden Zellen wurden mittels eines Zellschabers von der Plattenoberfläche abgeschabt, gezählt und für die nachfolgende MACS-Isolierung in MACS-Puffer gelöst.

2.2.1.5. MACS® (magnetic cell sorting, magnetische Zellsortierung)

2.2.1.5.1. Aufbau der Apparatur

Mit Hilfe von LS+-Trennsäulen ist es möglich, Zellen, die auch nur in geringer Anzahl in einer heterogenen Zellsuspension vorhanden sind, mittels positiver oder negativer Selektion in Verbindung mit dem MidiMACS-System zu isolieren [125, 126].

Der MidiMACS-Magnet wird dabei an der MidiMACS-Magnetwand befestigt, die LS+-Trennsäule in den Magneten eingesetzt und darunter ein Auffangbecherglas platziert. Die zu selektierenden Zellen sind bei der hier durchgeführten positiven Selektion magnetisch markiert und bleiben so aufgrund des durch die Magnetwand entstehenden magnetischen Feldes in der Säule hängen.

Zur Äquibrierung der Säule erfolgte die Zugabe von 3 ml MACS-Puffer auf die Säule, welcher sich im Becherglas aufsammele.

2.2.1.5.2. Magnetische Markierung der Monozyten

Die über die Dichtezentrifugation und Adhärenz durch Zellkultur gewonnenen Zellen, wurden zweimal in MACS-Puffer gewaschen und gezählt. Das Pellet wurde

anschließend mit den MACS-CD11b Microbeads im Verhältnis 1:10 in MACS-Puffer für 15 min bei 4 °C inkubiert, wobei 10 µl der Microbeads-Lösung auf 10^7 Zellen gerechnet wurden. Die MACS-Microbeads sind einerseits magnetisch markiert, andererseits an einen murinen, monoklonalen CD11b Antikörper konjugiert, welcher spezifisch mit Monozyten-Rezeptoren interagiert.

Zur anschließenden Entfernung der ungebundenen Antikörper und der Auflösung instabiler Bindungen wurde die Zellsuspension auf 5 ml aufgefüllt, *gevortext* und 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert.

Schließlich wurde das Pellet mit MACS-Puffer in 1 ml resuspendiert und die Zelllösung auf maximal 10^8 Zellen pro 1 ml eingestellt.

2.2.1.5.3. Magnetische Separation

An die zuvor feuchtgestellte Säule wurde zur Verlangsamung des Durchlaufs eine Kanüle angehängt. Als erstes wurde die Zellsuspension und nach Abnahme der Kanüle nacheinander dreimal je 500 µl MACS-Puffer auf die Säule gelegt, welche im magnetischen Feld des MACS Separators aufgehängt war. Beim Durchfluss der Zellsuspension blieben die magnetisch markierten Monozyten in der Säule zurück und die nicht markierten, CD11b negativen Zellen sammelte sich in einem darunter platzierten Auffangröhrchen und konnten verworfen werden.

Nach der Entfernung der Säule aus dem magnetischen Feld auf ein 15 ml Auffangbehälter, konnte die selektierte und magnetisch markierte positive Zellfraktion mit Hilfe einer Spritze und 1 ml MACS-Puffer von der Säule eluiert werden. Die in dem daruntergestellten Röhrchen gesammelte, positive Fraktion wurde anschließend mit RPMI verdünnt und für 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert sowie in PBS gewaschen.

Es erfolgte die erneute Quantifizierung der lebenden Monozyten mit Hilfe der Neubauer Zellkammer. Typischerweise enthielt 1 ml Blut eine Zellzahl von 50.000-150.000 Monozyten.

Das vollständige Isolierungsprotokoll umfasste generell ca. 5 h.

Im Anschluss erfolgte zur Art- und Vitalitätsbestimmung teilweise eine FACS-Analyse oder immunhistochemische Färbung oder die intrazerebrale Injektion der isolierten Monozyten in Wildtypmäuse.

2.2.2. Isolation/ Präparation von adulter Mikroglia

Zur Isolierung von Mikroglia aus adulten Mäusen wurden die Versuchstiere im bereits beschriebenen Vorbereitungsmodus mit NaCl perfundiert.

Anschließend erfolgte die Entnahme des Gehirns, wobei für eine geringere Kontamination keine Dekapitation vorgenommen wurde. Anstattdessen wurde über einen Hautschnitt das Gehirn zur Entnahme freigelegt und vorübergehend in einer Nährstofflösung aufbewahrt. Das Parenchym wurde dann mittels eines Skalpells grob zerkleinert, um die Oberfläche für die anschließend zugefügte enzymatische Verdauungslösung zu vergrößern. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei 37 °C erfolgte das mechanische Zerkleinern der Zellklumpen durch ein 70 µm Zellsieb und die Waschung mit 30 ml DMEM durch Zentrifugation bei 300 rpm für eine Minute. Der daraus entstehende Überstand wurde in ein weiteres Plastikgefäß gegeben und bei 1200 rpm für 5 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 4 ml von 37 %iger Percolllösung resuspendiert. Die Zellsuspension wurde wiederum vorsichtig auf 4 % einer vorgelegten 70 %igen Percollphase geschichtet. Darauf erfolgte die langsame Schichtung 4 ml einer 30 %igen Percolllösung und abschließend 6 ml HBSS. Im Anschluß wurde die Percollgeschichtete Lösung für 40 min ohne Bremsung bei 1100 rpm zentrifugiert. Die Interphase zwischen den 70 %igen und 35 %igen Percollphasen wurde aufgesammelt und in ein neues Falcon-Gefäß überführt und mit 12 ml Kulturmedium gewaschen. Für die anschließende intrazerebrale Injektion wurde die Zelllösung auf 2 µl pro Injektionsrezipienten-Tier adjustiert. Gleichfalls wurde ein Exempel zur FACS-Messung verwendet (Methodik siehe 2.2.4. zur Durchflusszytometrie).

2.2.3. FACS-Analyse (Fluoreszenz aktivierte Zellsortierung)

2.2.3.1. Funktionsbeschreibung

Mithilfe des Durchflußzytometers FACS Canto II, ist eine Zelltypisierung von Einzelzellen in Suspension auf der Grundlage von Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften möglich. Die Zellen werden mittels einer Kapillare in einen ko-axialen Hüllstrom eingestreut, der sich in der Messkammer so verjüngt, dass die Zellen der Reihe nach im Kreuzungspunkt von Laserstrahl und Flüssigkeitsstrom

fokussiert werden (hydrodynamische Fokussierung). Sobald eine Zelle den Analysepunkt, den Schnittpunkt zwischen Flüssigkeits- und Laserstrahl, erreicht, kommt es zu einer Streuung des Laserstrahls. Gemessen wird einerseits die Intensität des Lichtes, welches in Vorwärtsrichtung (Forward Scatter) entlang des einfallenden Lichtstrahls mit einem kleinen Ablenkungswinkel von $0.5-2^\circ$ streut. Diese sogenannte Vorwärtslichtstreuung ist in erster Linie ein Maß für die Zellgröße. Andererseits wird noch die Intensität des Lichtes, welches in Seitwärtsrichtung (Side Scatter) mit einem Ablenkungswinkel von 90° streut, gemessen. Dieses sogenannte Seitwärtsstreulicht ist ein Maß für die Zellgranularität. Mittels dieser beiden Komponenten lassen sich die drei Leukozytengruppen Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten voneinander abgrenzen. Dabei können die Monozyten mithilfe des „Gating“, also der Selektion einer spezifischen Zellpopulation, eingegrenzt werden und somit wird nur diese im weiteren Messverlauf zur Vitalitäts- oder Populationsartbestimmung betrachtet.

Die Zellen werden vorher mit an bestimmte Oberflächenantigene bindende Antikörper inkubiert. Die Antikörper sind wiederum an Fluoreszenzfarbstoffe konjugiert und über die Anregung der Fluoreszenz mit dem FACS-Laser kommt es zu einer Absorption von Lichtenergie in einem für den Fluoreszenzfarbstoff charakteristischen Wellenbereich. Dadurch werden Elektronen in ein höheres Energieniveau gehoben, fallen dann in das Ausgangsniveau zurück und emittieren gleichzeitig Licht mit einer höheren Wellenlänge. Dieser Strahlungsübergang wird als Fluoreszenz bezeichnet und über die Fluoreszenzintensität kann die jeweils markierte Zellanzahl bestimmt werden.

2.2.3.2. Messvorbereitungen

2.2.3.2.1. Optimierung, Kalibrierung und Kompensation

Bevor mit dem Durchflußzytometer gemessen werden konnte, musste zunächst die Geräteempfindlichkeit optimiert und kalibriert werden. Hierfür wurden 7-AAD (7-Amino Actinomycin D), PE- (Phycoerythrin) und APC (Allophycocyanin) markierte Beads zusammen mit FACS-Puffer in ein Analyseröhrchen gegeben. Dadurch konnte die Justierung der optischen Bank zur Optimierung der Parameter Vorwärtsstreulicht, Seitwärtsstreulicht und Fluoreszenzintensität erfolgen.

Um ein durch das breite Emissionsspektrum der Fluorochrome bedingte „Überstrahlen“ in den Fluoreszenzbereich anderer Fluorochrome zu vermeiden, und dennoch eine Mehrfarbenfluoreszenzanalyse durchzuführen, wurde eine Kompensation mit Anti-CD11b-PE, Anti-CD11c-APC und 7-AAD angewendet. In der Vorwärts-Seitwärts-Streulicht-Darstellung wurde ein Schwellenwert (Diskriminator) gesetzt, welcher alle Impulse darunter ausschließt, damit Verunreinigungen oder nicht erwünschte Partikel wie tote Zellen vermieden werden. Durch die Aufnahme von Antikörpern von beispielsweise toten Zellen oder der Aufnahme aufgrund von pH-Wert oder Temperaturveränderungen kommt es zur unspezifischen Färbung der Zellen. Um einen verfälschenden Einfluß von Fluorochrom-Emissionen auszuschließen, erfolgte eine Kontrolle mit einem unspezifisch bindenden, fluoreszenzmarkierten Antikörper gleichen Isotyps (Isotypkontrolle). Anhand dessen erfolgte die Einstellung der Messparameter und des „Cut off“ ab dem die Zellen als positiv gewertet wurden. Die Position der Markierung wurde so gewählt, dass nicht mehr als 1 % der gemessenen Ereignisse darüber hinausgingen.

2.2.4. Durchflusszytometrie

2.2.4.1. Zellfärbung zur FACS-Messung

Vor der FACS-Analyse wurden die Zellen auf fünf FACS-Glasröhrchen fraktioniert und auf das Zellpellet herunter zentrifugiert. Im Anschluss erfolgte zur Blockierung unspezifischer Bindungen die Inkubation mit dem Fc-Block für 5 min bei 4 °C. Dadurch erreicht man eine höhere Bindungsspezifität in den für die Immunfluoreszenz-Färbung nachfolgenden Antikörperinkubationen.

Zur Verifizierung der Isolationsreinheit von monozytischen Zellen sowie zur Testung ihrer Überlebensrate wurden die FACS-Antikörper PE-CD11b sowie 7-AAD verwendet.

Aufgrund der schwachen Exprimierung von CD11b auch auf den den Monozyten phänotypisch ähnlichen dendritischen Zellen, wurde die isolierte Zellfraktion mit Hilfe des APC-CD11c Antikörpers auf den dendritischen Zellmarker CD11c überprüft.

7-AAD ist eine fluoreszierende Substanz, die nach Bindung an DNA-Moleküle, mit hoher Selektivität zwischen den Basen Cytosin und Guanin [127], ihre fluoreszierenden Eigenschaften ändert [128]. In vitale Zellen wird 7-AAD nicht

aufgenommen. Im Laufe der Apoptose wird die Zellmembran allerdings durchlässiger, so dass 7-AAD in das Zellinnere gelangen und mit der DNA interagieren kann. Mit Hilfe einer 7-AAD-Färbung kann daher zwischen lebenden und letalen Zellen differenziert werden.

Der monoklonale CD11b (Mac-1 α ; Integrin α M Kette) Antikörper reagiert mit der 17 α M – Untereinheit des CD11b Antigens (Mac-1, α M β 2 Integrin). CD11b funktioniert als ein Rezeptor für Komplementfaktoren (C3bi), Fibrinogen, oder Faktor X. In der Maus wird das CD11b-Antigen auf Monozyten/Makrophagen sowie Mikroglia exprimiert. Zu einem geringen Anteil wird es auch auf Granulozyten, Natürlichen Killerzellen, CD5+ B-1-Zellen und einer Unterart von dendritischen Zellen exprimiert. Der verwendete CD11c Antikörper reagiert mit der α X-Untereinheit des CD11c Maus-Antigen, welches wiederum auf dendritischen Zellen im Blut exprimiert ist.

Für die Färbung erfolgte die Inkubation mit den entsprechenden in FACS-Puffer gelösten Antikörpern für 20 min bei 4°C. Eine Zellfraktion wurde mit unkonjugiertem 7-AAD Reagenz (Verhältnis: 1:200 in FACS-Puffer), eine weitere mit murinem, monoklonalen PE-konjugiertem CD11b Antikörper, eine Fraktion doppelt gefärbt mit CD11b und 7-AAD, sowie eine mit APC-konjugiertem CD11c Antikörper (alle letztgenannten im Verhältnis 1:100) gefärbt. Eine Fraktion verblieb als ungefärbte Kontrollfraktion.

Nach der Färbung erfolgten in der Vorbereitung zur anschließenden FACS-Messung mindestens drei Waschriffe mit FACS-Puffer bei 4°C und 1200 rpm für jeweils 5 min.

2.2.4.2. FACS-Messung

Die Messung der einzelnen gefärbten Zellfraktionen erfolgte in der Reihenfolge: ungefärbte Zellen, 7-AAD Färbung, PE-CD11b, Doppel-Färbung: 7-AAD und PE-CD11b und APC-CD11c.

Die gewonnenen zytometrischen Daten wurden mit Hilfe der FlowJo-Software ausgewertet und evaluiert.

Für die nachfolgende Injektion der Monozyten bedingte sich in der isolierten Zellfraktion eine Reinheit und Überlebensrate der Monozyten von insgesamt mindestens 90 %. Gleichfalls sollte die CD11c-positiv Rate 5 % nicht übersteigen.

Das Protokoll wurde in mehreren Abläufen durch zusätzliche Waschschriffe bzw. verschieden kombinierte Inkubationsszeiten soweit optimiert, bis standardmäßig solche Quoten erreicht wurden.

2.2.4.3. Auswertung der durchflußzytometrischen Daten

Die Monozytenpopulation wurde in einem ersten Zytogramm anhand der Granularität und Größe der Zellen identifiziert, indem die Seitwärtslichtstreuung (*side scatter*) gegen die Vorwärtslichtstreuung (*forward scatter*) aufgetragen wurde. Die Messung erfolgte unter Einstellung eines Schwellenwertes (*threshold*), um Verunreinigungen und Zelltrümmer auszugrenzen. Anhand der Isotypkontrolle wurde in das Zytogramm ein Quadrantenkreuz platziert, das eine Abgrenzung von Zellen mit spezifischer Fluoreszenz von Zellen mit unspezifischer Fluoreszenz ermöglichte. Die Monozytenpopulation wurde mit einem elektronischen Fenster eingegrenzt (*gating*) und in einem zweiten Zytogramm bezüglich Fluoreszenz 1 (Y-Graph) und Fluoreszenz 2 (X-Graph) dargestellt. Die Fluoreszenz 1 brachte die mit 7-AAD markierten Zellen zur Darstellung, während die Fluoreszenz 2 die jeweils mit PE CD11b-gefärbten Zellen zeigte. Das Auswerteprogramm (FlowJo) berechnete den prozentualen Anteil der sich innerhalb eines Quadranten befindlichen Zellen an der Gesamtpopulation. Der obere rechte Quadrant bildete die Schnittmenge der Zellen, die sowohl in Fluoreszenz 1 und Fluoreszenz 2 gemessen wurden. In diesem Quadranten des Zytogramms erfolgte die Darstellung der CD11b positiven Zellfraktion.

2.2.5. Immunfluoreszenz-Färbung

Die phänotypische und morphologische Homogenität der isolierten Monozytenfraktion wurde routinemäßig histologisch in einer Zelllösungsprobe beurteilt.

Dafür wurde in die einzelnen Vertiefungen von 24-Loch-Mikrotiterplatten ein rundes Deckgläschen gelegt. Diese wurden für 12 h mit 10 µl Poly-D-Lysin (PDL) benetzt und in für 12 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Die verwendete Zelllösung wurde auf 100.000 Zellen pro 1 ml eingestellt. Nach der Entnahme aus dem Brutschrank

und folgenden Trocknung, erfolgte die Pipettierung von 1 ml pro Vertiefung. Nach 2 h wurde die freischwingende Zelllösung vorsichtig abgesaugt.

Mit dem monoklonalen Anti-Maus MAC-1 Antikörper werden spezifisch Monozyten entlang ihrer Zellmembran angefärbt, so dass sich auch die typische monozytische Morphologie zu erkennen gibt. Durch die DAPI Färbung werden intakte Zellkerne darstellbar. Hierdurch tritt die die Monozyten kennzeichnende Nierenform der Zellkerne in Erscheinung, als auch das Zellkern/Zytoplasma Verhältnis.

Der Fluoreszenzfarbstoff DAPI bindet selektiv an DNA und bildet stark-fluoreszierende DNA-DAPI-Komplexe mit hoher Spezifität. DAPI wird von Zellen sehr rasch in die DNA aufgenommen. Bei Anregung mit ultraviolettem Licht fluoresziert DAPI im sichtbaren Bereich mit blauer bis zyaner Farbe.

Für die MAC-1 Färbung wurden die auf den Deckgläsern adhärierenden Monozyten zur Blockade unspezifischer Rezeptoren vorerst 1 h in Blockierungslösung unter Raumtemperatur auf einem horizontalen Schüttler inkubiert. Anschließend erfolgten drei Waschritte mit PBS mit einer jeweiligen Dauer von 5 min. Der MAC-1 Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:500 zu PBS sowie 1 % NGS mit 0,5 % Triton X-100 zu den Zellen gegeben und Übernacht bei 4 °C auf einem horizontalem Schüttel inkubiert. Bei jeder Färbung wurden Kontrollen mitgeführt, die nur mit dem Zweitantikörper oder ohne jeglichen Antikörper inkubiert wurden. Nach dreimaligem Waschen (je 10 min in PBS), wurden die Schnitte mit dem biotylinierten Anti-Kaninchen-Zweitantikörper aus der Ziege verdünnt im Verhältnis 1:200 in 1 % NGS mit 0,5 % Triton X-100 in PBS und für 2 h inkubiert. Nach dreimaligem Waschen (je 10 min in PBS), wurden die Deckgläschen für 5 min in DAPI Färbelösung eingetaucht und anschließend 4 Mal für je 10 min mit PBS gewaschen.

Für die nachfolgende immunzytologische Analyse unter dem Fluoreszenzmikroskop, wurden die Deckgläschen umgedreht und in Immo-Mount auf Glasobjektträger eingebettet.

2.2.6. Morphologische Charakterisierung

Unter dem Mikroskop betrachtet, konnten die Monozyten als Zellen mit einer Größe zwischen 10 und 30 µm und einem charakteristischen hufeisenförmigen oder nierenförmigen Nukleus mit einem variablen Nukleus/Zytoplasma Verhältnis identifiziert werden. Die histologische Analyse sollte auch Aufschluss geben über die

Reinheit der in vorangegangenen Schritten isolierten Zellfraktion. Zur Bestimmung der Anzahl der auf den Glasplättchen haftenden Monozyten gegenüber anderen adhätierenden Zellarten wurden 100 Zellen pro Glasplättchen ausgezählt und gemäß den entsprechenden morphologischen Charakteristiken klassifiziert und statistisch erfasst. Insgesamt wurden jeweils 3 Glasplättchen aus je 3 Experimenten miteinbezogen und in Excel ausgewertet.

2.2.7. Eisenfärbung

Für zukünftige bildgebende Experimente soll die Beladung von Monozyten mit Eisen durchgeführt werden. Dabei muss sowohl die Vitalität so uneingeschränkt wie möglich bleiben, als auch die histologische Darstellung ermöglicht werden. Zur Ermittlung der optimalen Eisenbeladungskonzentration zur Gewinnung von vitalen, im MRT sowie histologisch detektierbaren Monozyten, wurden in mehreren Ansätzen die isolierten Monozyten mit variablen Eisenkonzentrationen und Eisenbeladungszeiten inkubiert.

24-Loch-Mikrotiterplatten wurden mit Deckgläschen ausgestattet und diese mit PDL für 12 h inkubiert. Die Zelllösung wurde auf 100.000 Zellen pro 1 ml Nährkulturlösung eingestellt und entsprechend der vorhandenen Zellzahl auf die 24-Lochplatte aufgeteilt. Anstatt herkömmlichem Eisen wurden zur Eisenbeladung VSOP (Very small superparamagnetic ironoxid particles) benutzt, welche aus einem 5 nm Eisenoxid-Kern und einer negativ geladenen Oberfläche besteht. VSOP zeigen langfristig keine zytotoxischen Effekte in den verwendeten Konzentrationen, wodurch sich die Vergiftungsrisiken der Zellen durch Eisen vermindern [129]. Folgende Ansätze wurden durchgeführt: 0,5 µl, 1 µl, 1,5 µl, 3 µl und 6 µl Eisen (0,5 mM) zu den jeweiligen Inkubationszeitlängen: 3 h, 6 h, 12 h. Nach der jeweiligen Beladungszeit wurden die Mikrotiterplatten mit den Glasplättchen aus dem Brutschrank (37 °C) entnommen und die Glasplättchen für 1 h mit PFA fixiert. Zur Darstellung und Analyse der eisenbeladenen Monozyten wurde die Berliner Blau-Färbung genutzt.

Die mit Monozyten behafteten Glasplättchen wurden hintereinander mit je 300 µl wässriger Kaliumferrozyanidlösung für 30 min, saurer Kaliumferrozyanidlösung für 60 min und Kernechtlösung für 10 min behandelt, sowie zwischendurch unter fließendem Wasser für 5 min gespült. Im Anschluss erfolgte eine Entwässerung über

eine aufsteigenden Alkoholreihe (70 %, 80 %, 90 % und 100 %iges Ethanol), und zur Verminderung von Luftblässchen bei der Eindeckelung mit Entelan wurden die Glasplättchen kurz vorher noch in Xylol getaucht. Anschließend erfolgte die Analyse der Glaspättchen mit den Monozyten die variablen Beladungszeiten und –konzentrationen mit VSOP unterlaufen waren. Die Beurteilung erfolgte aufgrund von der zytoplasmatischen Blaufärbungsintensität (Beladung durch Eisenpartikel) mit abzugrenzender Zellmembran sowie des über die Kernechtfärbung sichtbar gewordenen intakten Zellkerns. Die in unterschiedlicher Kombination behandelten Monozyten wurden unter dem Lichtmikroskop miteinander verglichen, um die optimale Beladungsvariation zu identifizieren.

2.2.8. Histologie

Im Rahmen der Histologie wurden zwei Experimentenabläufe durchgeführt.

Die erste durchgeführte Experimentenreihe hatte das Ziel, den Ankunftsort sowie den zeitlichen Rahmen der Migration aus dem ZNS der injizierten GFP-Monozyten herauszufinden. Dazu wurden zunächst sämtliche das Gehirn bekanntermaßen drainierende LK zu unterschiedlichen Zeitpunkten untersucht. Bei Bekanntwerden der relevanten LK und Zeitpunkte, wurde an diesen der anschließende histologische Nachweis durchgeführt.

Die zweite Experimentenreihe wurde etabliert um die Migrationsroute der postläsional, intraparenchymal injizierten GFP-Monozyten aus dem ZNS zu verfolgen und zu bestimmen.

2.2.8.1. Entorhinale Kortexläsion und stereotaktische Injektion

Zu Injektionszwecken wurden die aufgereinigten Monozyten in PBS gelöst, gezählt und auf $2 \times 10^5/\mu\text{l}$ in $2 \mu\text{l}$ PBS aufgelöst und auf Eis gelegt. In kalter Umgebung zeigen die zu injizierenden Zellen den geringsten Energieverbrauch, sodass einer Verminderung der Zellfunktion oder gar einem Zellverlust vorgebeugt werden kann. Die ECL und Injektion der präparierten Monozyten erfolgte an C57Bl6-Wildtypen in einem Alter von 6 Wochen (Charles River, Sulzbach, BRD). Es wurden generell

2. MATERIAL UND METHODEN

männliche Versuchstiere ausgewählt um eventuelle Einflüsse durch hormonelle Schwankungen auszuschließen.

Die Versuchstiere wurden gewogen und mit Hilfe des Ketamincocktails (10 µl/g KG) in eine tiefe Narkose versetzt, bis keine Reaktion auf Schmerzreize mehr auslösbar war. Anschließend wurden die Kopfhare abgeschoren und um einer Beeinträchtigung der Augen vorzubeugen, wurden NaCl-Tropfen auf die Augenschleimhäute appliziert.

Dafür wurden die Tiere in einen stereotaktischen Apparat eingespannt und der Kopf über die Fixierung der Zähne in der Gebiß-Haltevorrichtung stabilisiert.

Im Rahmen der ECL erfolgt die stereotaktische Dissektion des Tractus perforans, dabei wird 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 mittleren (MML) und äußeren (OML) Molekularschicht des Gyrus dentatus sowie im Stratum lacunosum [12]. Es wird eine anterograde Degeneration der äußeren Molekularschichten des Gyrus dentatus induziert, während die inneren Molekularschichten intakt verbleiben. Der Vorteil liegt darin, dass nicht bloß die denervierten Schichten untersucht werden können, sondern auch die adhärennten intakten Schichten [10, 26, 27].

Wichtig ist, es kommt hierbei nicht zu einer Zerstörung der BBB [16]. Außerdem werden monozytische Zellen zur Läsionsstelle hinrekrutiert [10, 28]. Die stereotaktische Operation wurde in allen Tieren in Form einer Läsionsetzung mittels eines 2 mm breiten Messers am linken entorhinalen Kortex durchgeführt.

Der mediale Rand des Messers wurde anhand der folgenden Koordinaten von λ (an der Stelle, an welcher die longitudinale und die Lambda Schädelnähte sich dorsal überkreuzen) ausgerichtet: Anterior: 0 mm, Lateral: 2,3 mm. Nach Eröffnung der knöchernen Schädeldecke mit Hilfe eines Kleintier-Bohrgerätes, konnte das Messer dorsoventral inseriert werden, bis es den entorhinalen Kortex erreichte und die perforierenden Projektionen lädierte.

Ungefähr 2×10^5 GFP-Monozyten, suspendiert in 2 µl PBS wurden innerhalb einer Minute nach der erfolgten ECL, mittels einer 5 µl Hamilton Pipette direkt in die Läsionsstelle injiziert. Die Injektion erfolgte über einen Zeitraum von 10 min um einem Heraustreten der injizierten Suspension vorzubeugen und folglich die vollständige intraparenchymale Applikation zu gewährleisten. Die Hamilton Pipette

wurde dann langsam über einer Zeitspanne von 2 min aus der Applikationsstelle zurückgezogen, um unkontrollierte Läsionen zu vermeiden.

In der Kontrollgruppe A (n=2) fand die gleiche Prozedur statt, mit dem Unterschied, dass 2 µl PBS ohne GFP-Monozyten injiziert wurden.

In der Kontrollgruppe B (n=2) wurden mit PFA fixierte GFP-Monozyten aufgelöst in 2 µl appliziert. Dabei wurde die isolierten Zellen für eine Stunde in PFA inkubiert und anschließend fünf Mal in PBS gewaschen, bis sie auf 2×10^5 GFP-Monozyten zur nachfolgenden Injektion adjustiert wurden.

Nach der Injektion wurde die offene Hautstelle mit zwei Stichen vernäht und die Tiere bis zum Perfusionszeitpunkt im Käfig nach den standardmäßigen Tierschutzrichtlinien des Landes Berlin versorgt.

2.2.8.2. Perfusion

Im Anschluß an die Injektion erfolgte nach variablen Zeitabständen beginnend bei einigen Minuten bis hin zu 21 Tagen (d) p.i. die Perfusion der Versuchstiere. Der erste Teil der Experimente sollte den Zeitraum, zu welchem die Monozyten in den LK auftauchten, etablieren. Mit diesem Hintergrund wurden die Versuchstiere 12 h, 24 h, 48 h, 7 d, 14 d und 21 d (n = 2 pro Zeitpunkt) p.i. perfundiert.

Alle Versuchstiere wurden vorerst in eine tiefe Ketaminnarkose gelegt. Nach Überprüfung der Narkosetiefe, wurden die Tiere in Rückenlage auf den Perfusionstisch mit entsprechender Vorrichtung stabilisiert. Es folgte die transkardiale Perfusion mit 100 ml NaCl bei einem Druck von 40 mmHg zur Auswaschung des Blutes aus dem Gewebe. Zur Fixation der Gewebestruktur erschloß sich direkt die Perfusion mit 150 ml PFA. Das Heben des Tierschwanzes zeigt die vollständige Perfusion des Gewebes an. Nach Abschluss der Perfusion erfolgte durch Aufspreizung der entsprechenden Hautflächen, die seitengetrennte Entnahme der tiefen sowie oberflächlichen als auch der inguinalen LK und der Milz. Jeder LK wurde einzeln über Nacht in PFA bei 4 °C gelagert. Für die histologische Untersuchung der Gehirne erfolgte die Dekapitation oberhalb der Claviculae mit Hilfe eines Skalpell und darauffolgend die Abtrennung der Haut und der Hautanhangsorgane und Lagerung des Schädels samt Knochen in PFA bei 4 °C über Nacht.

2.2.8.3. Vibratomschnitte

Nach 24 h wurden die LK und Milzen dreimal in PBS gewaschen und als Vorbereitung für die Schnitte am Vibratom in Agar eingebettet. Für die Einbettung wurde 4 % Agar in PBS aufgekocht und in Formen gegossen und sobald die Temperatur des Agars 60 °C betrug, konnten die LK und Milzen einzeln in die Masse eingelegt und getrocknet werden. Das Schneiden am Vibratom erfolgte unter möglichst geringem Lichteinfluss sowie in einer Schnittumgebungs-Temperatur des PBS von maximal 4 °C. Die LK wurden vollständig in 45 µm dicke Horizontalschnitte geschnitten. Dies ergab durchschnittlich eine Schnittanzahl von 10-20 Schnitten pro LK sowie ca. 30 Schnitte pro Milz.

Für die sich anschließende Schnittanalyse unter dem Fluoreszenz-Mikroskop, wurden die Schnitte bei einer Anzahl von ca. 5-10 Schnitten pro Glasobjektträger in Immu-Mount eingebettet. Direkt danach wurde jeder einzelne Schnitt der sechs LK pro Tier (zwei tiefe und zwei oberflächliche zervikale sowie zwei inguinale LK) als auch der Milzen auf GFP-Zellen hin unter dem Epifluoreszenz-Mikroskop untersucht.

2.2.8.4. Immunfluoreszenzfärbung der Lymphknotenschnitte

Als histologischen Nachweis der monozytären Art der in den Lymphknotenschnitten gefundenen GFP-Zellen, diente die MAC-1 Färbung der Schnitte.

Um ein optimales Ergebnis zu erzielen, wurden alle Färbeschritte in Zellkulturplatten an frei im jeweiligen Medium schwimmenden Gehirnschnitten vorgenommen (*free-floating*-Technik). Dadurch wirkten die Antikörper und Seren an einer großen Oberfläche und diffundierten von allen Seiten in das Gewebe [130].

Dafür wurden die Lymphknotenschnitte nach der Untersuchung auf GFP-Zellen mit Hilfe von Puffer von den Glasobjektträgern gelöst und in 12-Lochmikrotiterplatten gelegt. Die Immunfluoreszenzfärbung für MAC-1 erfolgte nach schon beschriebenem Protokoll (siehe 2.2.5.), wobei pro Vertiefung und Schnitt 300 µl der einzelnen Lösungen verwendet wurde. Anschließend wurde zur Darstellung der intakten Zellkerne der in den Lymphknotenschnitten gefundenen GFP-Zellen, eine DAPI Färbung durchgeführt (siehe 2.2.5.). Zur wiederholten Analyse unter dem Fluoreszenz-Mikroskop wurden die Schnitte in Immu-Mount auf Glasobjektträger eingebettet.

2.2.8.5. Kryostatenschnitte

Die zuvor mit Zellen injizierten Versuchstiere wurden dafür 6 h, 12 h, 24 h, 48 h, und 7 d (n = 2 pro Zeitpunkt) p.i. wie oben beschrieben mit PFA perfundiert und die Schädel über Dekapitation gewonnen und über Nacht in PFA inkubiert. Zur Gewinnung von histologischen Schnitten ganzer Schädel musste der Schädelknochen entkalkifiziert werden. Dafür wurde eine Entkalkerlösung aus 1000 ml 0,1 M PBS mit 160 g EDTA und 10 g Saccharose bei einem pH-Wert von 7,4 hergestellt. Die Schädel wurden über zwei Tage bei 50 °C in die Entkalkungslösung eingelegt. Die Entkalkung wurde anhand der Schädelweiche mittels einer Prinzette überprüft, um die Schädel dann in eine 20 %ige Saccharoselösung (in 0,1 M PBS) für 24 h sowie anschließend für 48 h in 30 %ige Saccharoselösung zu inkubieren. Das Absinken der Schädel wies auf die vollständige Aufnahme von Saccharose im Gewebe hin.

Die Schädel wurden dann abgetrocknet und bei –80 °C für mindestens einen Tag eingefroren. Zur Herstellung von histologischen Schnitten wurden am Kryostaten aus den gefrorenen Schädeln 20 µm dicke Schnitte hergestellt und direkt mittels Immount auf gekühlte Glasobjektträger eingebettet. Bis zur Analyse unter dem Fluoreszenzmikroskop wurden die Schnitte bei –20 °C aufbewahrt.

3. ERGEBNISSE

3.1. Reinheit und Vitalität der isolierten Monozyten

Zur Untersuchung des Migrationsweges von peripheren Monozyten aus dem lädierten ZNS war eine höchstmögliche Homogenität und Vitalität der zentral injizierten Monozyten notwendig.

Um eine hohe Reinheit bei der Isolierung von im peripheren Blut zirkulierenden Monozyten zu erlangen, wurde ein aus mehreren Experimentenstudien zusammen gestelltes Isolationsprotokoll optimiert [131, 132].

3.1.1. Isolierungsschritte für eine höchstmögliche Reinheit

Im ersten Isolierungsschritt erfolgte zur Anreicherung von mononukleären Zellen und gleichzeitiger Reduktion von Granulozyten und Erythrozyten, die ungebremste Dichtezentrifugation der isolierten Zellen auf dem Sucrose-Dichtegradienten Histopaque. Im folgenden Isolierungsschritt spielte die ausgeprägte Adhäsionsfähigkeit der Monozyten im Gegensatz zu den übrigen Leukozyten die entscheidende Rolle. Während der einstündigen Kulturhaltung, adhärten die Monozyten am Kulturplattenboden, und konnten nach Entfernung des Überstandes abgeschabt werden. Die sich anschließende magnetische Zellselektion über Monozyten-spezifische und magnetisch-markierte Mikropartikel, sorgte für die Depletion von T-Zellen, B-Zellen, Natürlichen Killerzellen und eventuell noch nach dem ersten Isolationsschritt verbliebene, kontaminierende Erythrozyten. Die magnetische Selektion basiert auf den magnetisch markierten CD11b Antikörpern, welche mit dem auf Monozyten exprimierten CD11b Integrin interagieren.

3.1.2. Überprüfung anhand der Durchflusszytometrie

Zur Überprüfung der Reinheit und Vitalität wurde im Anschluß an die Isolierungsschritte eine Zellfraktion der isolierten Zellen auf die Expressierung von CD11b und 7-AAD hin untersucht.

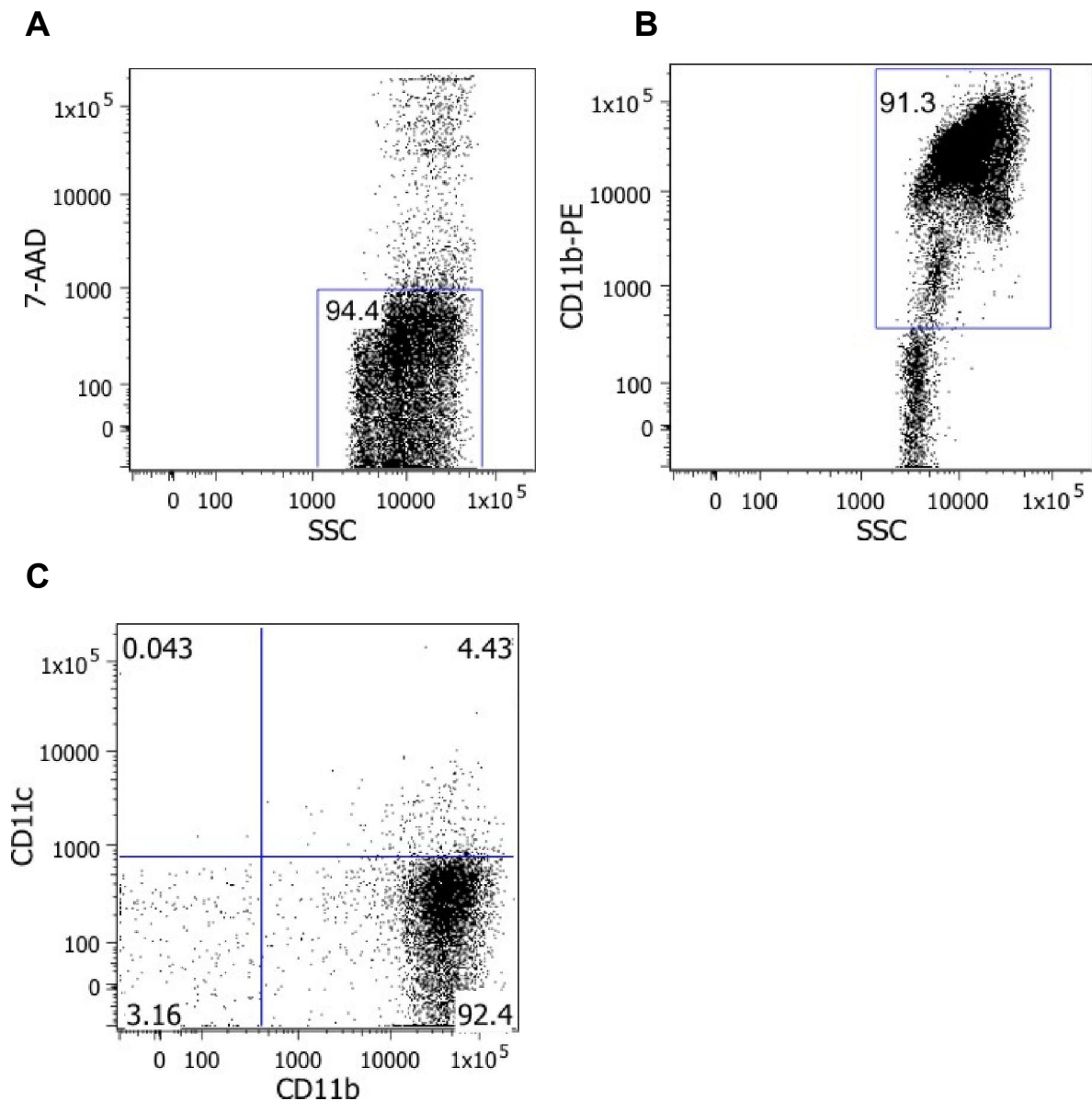
Anhand der durchflusszytometrischen Analyse konnte gezeigt werden, dass generell mehr als 90 % der gewonnenen Monozyten-Fraktion CD11b exprimierten (Grafik 2A). Von

3. ERGEBNISSE

den CD11b positiven Zellen erwiesen sich 94 % als 7-AAD negativ (Grafik 2B), welches den hohen Anteil an vitalen Monozyten in der isolierten Zellfraktion bestätigte und somit die Voraussetzungen für die Folgeexperimente erfüllte.

Zu einem geringen Anteil exprimieren auch peripher in der Blutzirkulation sich befindende dendritische Zellen das Integrin CD11b. Da sich die Monozyten und die peripheren dendritischen Zellen phänotypisch ähneln, musste einer Verwechslung in der finalen histologischen Bildanalyse vorgebeugt werden. Periphere dendritische Zellen exprimieren zum eventuell vorhandenen CD11b Integrin, ebenfalls das CD11c Antigen. Daher wurde die isolierte Zellfraktion in der Durchflusszytometrie neben CD11b auch auf das CD11c-Antigen hin analysiert. Höchstens 4 % der isolierten Zellfraktion zeigten anhand der Antikörper-Färbungen eine simultane Expressierung von CD11b und CD11c (Grafik 2C).

3. ERGEBNISSE



Graphik 2. Reinheit und Vitalität- eine durchflusszytometrische Analyse

A. Die dreistufige Isolationsmethode erzielte vitale und funktionell intakte periphere Blutmonozyten über 90 %, erkennbar an den repräsentativ dargestellten durchflusszytometrischen Daten der 7-AAD Färbung der isolierten Zellfraktion (vitale Zellen bleiben ungefärbt= 94.4 %).

B. Von den über 90 % vitalen Monozyten zeigen sich in der CD11b-PE Färbung in der FACS-Analyse über 90 % positiv auf das CD11b-Antigen (Monozyten=gefärbte Zellfraktion=91.3 %).

C. Eine Kontamination durch dendritische Zellen in der isolierten Zellfraktion konnte anhand einer simultanen CD11b/CD11c Antikörper Färbung nachgewiesen werden. Maximal 4 % der isolierten CD11b-positiven Fraktion beinhaltete dendritische Zellen (CD11b/CD11c gefärbt=4.43 %).

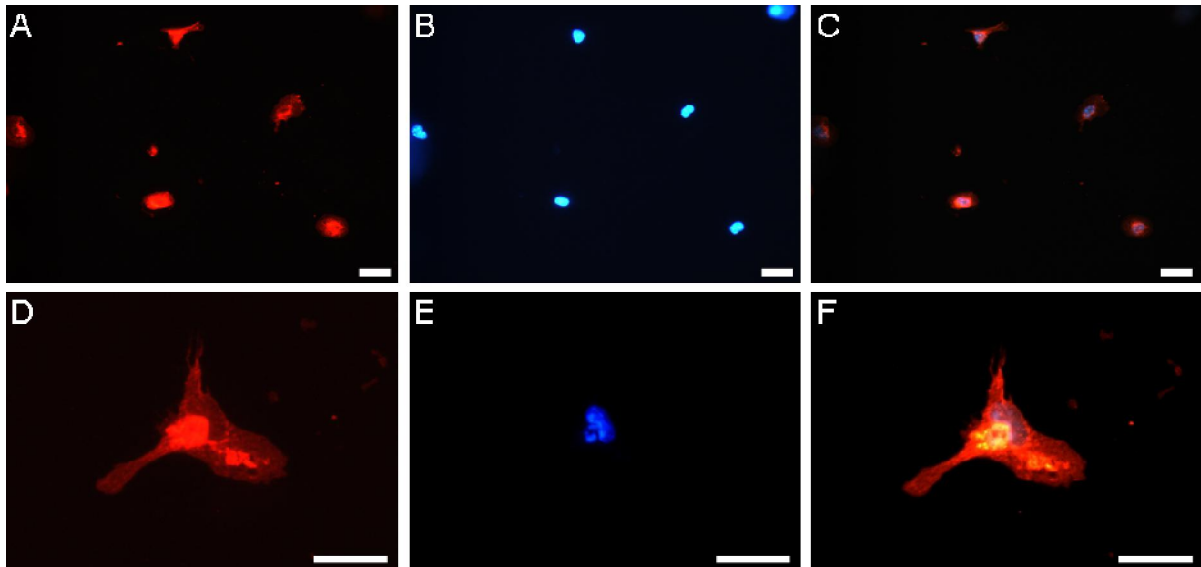
3.1.3. Histologischer Nachweis der Reinheit und Vitalität der isolierten Zellfraktion

Ein Teil der in drei Schritten isolierten Zellen wurde zur immunhistochemischen Analyse verwendet.

Die Immunzytofluoreszenz-Färbung der isolierten Monozyten mit dem roten, spezifischen Monozyten/Makrophagen Marker Mac-1, zeigte in der Analyse unter dem Fluoreszenz-Mikroskop eine starke rote Anfärbung der Monozyten bis in ihre multiplen Zellfortsätze hinein, woran auch die charakteristische Größe der einzelnen Monozyten (10-30 μm) demonstriert werden konnte (Graphik 3 A, B).

Die immunhistochemische Anfärbung der Zellkerne mittels DAPI zeigt deren intakte Beschaffenheit und demonstriert damit die Zellvitalität der dargestellten Monozyten.

Die DAPI-Färbung ermöglichte auch die Darstellung der Monozyten-typischen nierenförmigen Gestalt der Nuclei. Durch die Doppelfärbung von DAPI und Mac-1 konnte ebenso das Monozyten-typische unterschiedliche Nukleus-zu-Zytoplasma Verhältnis hervorgehoben werden (Graphik 3 B).



Graphik 3. Reinheit und Vitalität- ein Immunhistochemischer Nachweis

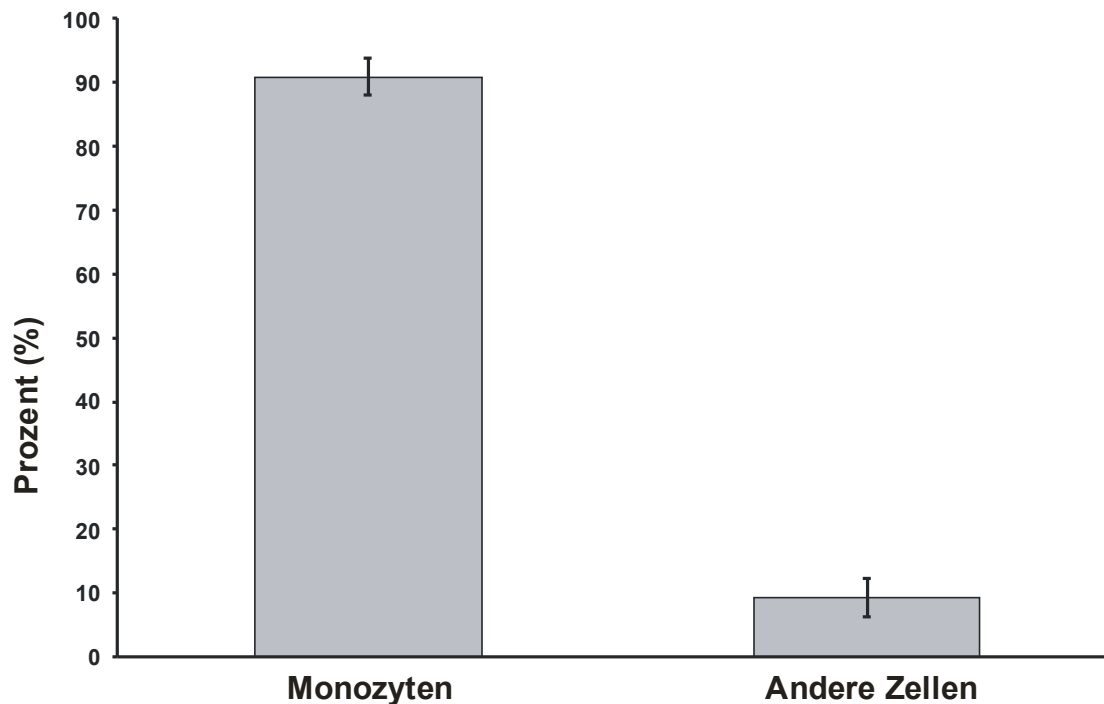
A bis F. Repräsentative Mac-1 und DAPI Färbung von einer isolierten Monozyten-Fraktion. Die Anfärbbarkeit durch den spezifischen Monozyten/Makrophagen Marker MAC-1 wird durch die ubiquitäre rote Verfärbung deutlich, erkennbar unter dem roten Fluoreszenzauflicht und unter dem gemischten Auflicht (rot: A, D; gemischt: C, F). Die zyan DAPI Verfärbung des Zellkerns lässt den für Monozyten charakteristischen, nierenförmigen Zellkern unter dem blauen und gemischtem Fluoreszenzlicht erkennen (blau: B, E; gemischt: C, F) (Originalvergrößerung obere Reihe: 600fach, untere Reihe: 1000 fach, Maßstab A-C: 20 μm , D-F: 20 μm).

3.1.4. Histologische Analyse der isolierten Zellfraktion

In der histologischen Begutachtung erhielt man eine Sicht auf die an den Deckgläsern haftende, durch die dreistufige Isolation erhaltene Zellfraktion.

Durch die immunhistochemische Färbung konnten die auf den Deckgläsern adhärierenden Zellen anhand morphologischer Charakteristiken wie der Zellgröße und der Zellkernform, klassifiziert werden. So konnte auch der Anteil von eventuell anderen, geringgradig CD11b-exprimierenden Zellen, die aufgrund ihres Phänotyps von den Monozyten zu unterscheiden sind, differenziert werden.

Auf Deckplättchen wurden 100 Zellen ausgezählt und anhand der Morphologie Monozyten von anderen Zellen unterschieden. Im Durchschnitt betrug die Anzahl der Monozyten stets über 90 %, die Anzahl der übrigen Zellen lag unter 10 %. Die Angaben beziehen sich auf 100 gezählte Zellen (Graphik 4).



Graphik 4. Histologische Evaluation der isolierten Monozyten

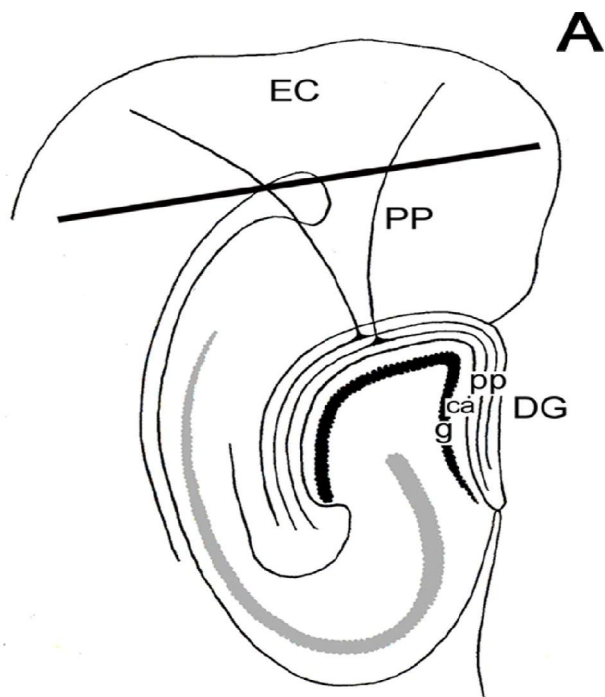
Durchschnitt der relativen Anzahl der Monozyten und übrigen Zellen, klassifiziert anhand der charakteristischen Monozyten-Morphologie. Es wurden pro Auszählung 100 Zellen pro Deckglässchen begutachtet.

Insgesamt konnte durch die Durchflusszytometrie und die histologische Untersuchung gezeigt werden, dass nach dem dafür etablierten Isolationsprotokoll für periphere Blutmonozyten eine Reinheit von mindestens 90 % erreicht wurde.

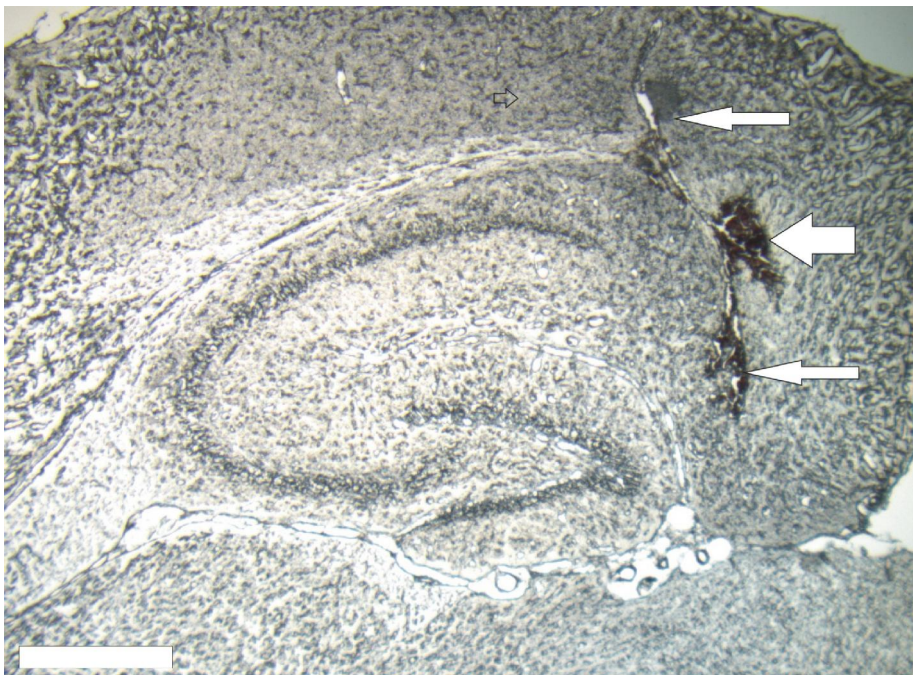
3.2. Entorhinale Kortexläsion und intraparenchymale Injektion

Zur Imitation eines entzündlichen Vorgangs wurde das Modell der entorhinalen Kortexläsion gewählt. Die korrekten Koordinaten für die ECL typische Läsionsstelle wurden histoanalytisch bestimmt.

Es ergaben sich ab der Lambdanaht gemessen folgende Koordinaten: Verschiebung nach links mit Hilfe des Stereotakten nach rostral: 0 mm, nach lateral: 2,3 mm.



Graphik 5. Schematische Darstellung der ECL (oben=dorsal, unten=ventral) in der hippocampalen Region, EC- Entorhinaler Cortex, PP- Perforierender Pfad, DG- Gyrus dentatus [27]

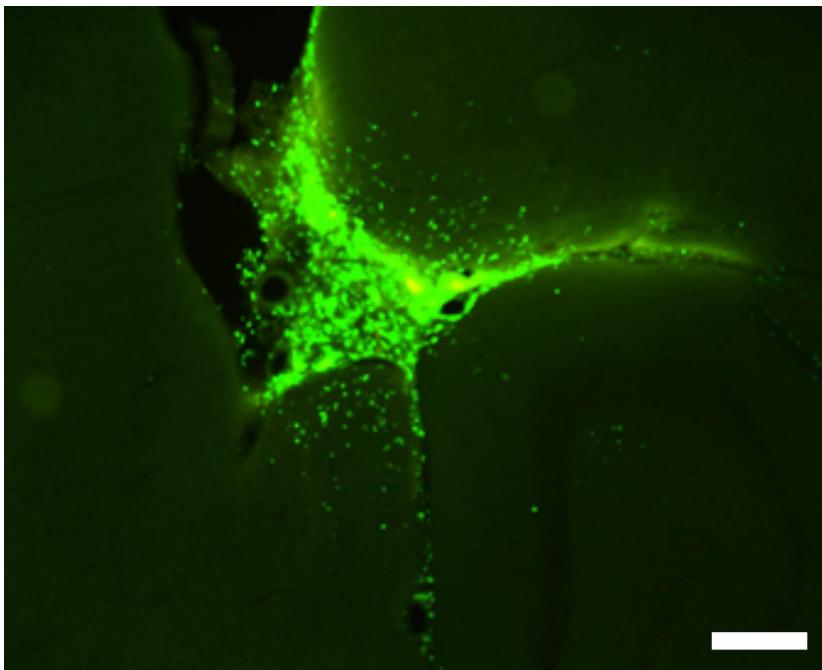


Graphik 6. Entorhinale Kortexläsion (links=ventral, rechts=dorsal).

48 Stunden post lesionem. Oberster und unterster, dünner Pfeil weisen auf die stereotaktische Läsion hin. Dicker, mittlerer Pfeil zeigt auf die Injektionsstelle der Hamilton Pipette (Originalvergrößerung 40 fach, Maßstab: 50 µm).

3. ERGEBNISSE

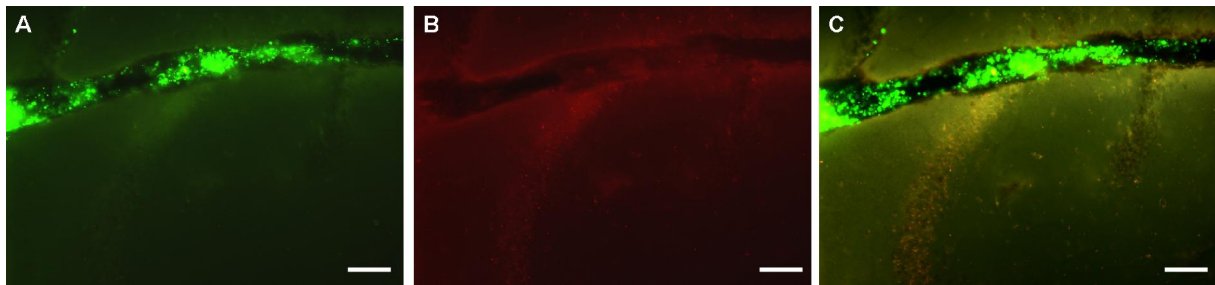
Nach Setzen der ECL mit Hilfe des Stereotakten wurde das Messer in der Halterung durch eine Pipettenspritze ersetzt. Es erfolgte die Injektion der gekühlten GFP-Monozyten in die Läsionsstelle. In Graphik 7 ist ein histologischer Schnitt des Hippokampus mit Läsionsstelle direkt nach der GFP-Zellinjektion dargestellt. Die GFP-Zellen sind durch ihre grüne Fluoreszenz unverkennbar unter dem Fluoreszenz-Mikroskop sichtbar und befinden sich dicht verteilt in der Läsionsstelle im Hippokampus.



Graphik 7. Injektion. Intraparenchymale Injektion der GFP-Monozyten an den Ort der entorhinalen Kortexläsion. Aufnahme von Zustand direkt post injectionem (Originalvergrößerung: 100 fach, Maßstab: 20 μm).

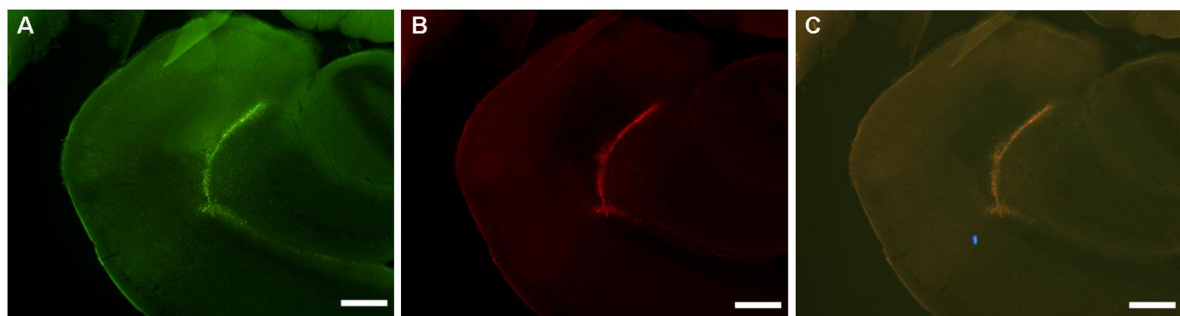
In Graphik 8 sind Aufnahmen von histologischen Schnitten des Hirnparenchyms 5 min post injectionem dargestellt. Hier sind die charakteristischen Gewebestrukturen des Hippokampus auf der linken Bildhälfte erkennbar. Die grünleuchtenden injizierten GFP-Zellen sind unter grüner Fluoreszenz (Graphik 8 A), aber nicht unter rotem Auflicht (Graphik 8 B) in der Läsionsstelle erkennbar. Die grünen Zellen sind somit nicht als Autofluoreszenz des Gewebes verkennbar (leicht grünlich gefärbtes Gewebe in Graphik 8 A), sondern den grünfluoreszierendes-Protein-exprimierenden Monozyten zu zuordnen. Unter der *merge* Aufnahme (Graphik 8 C) erkennt man die injizierten GFP-Monozyten in der Läsionsstelle, umgeben von rötlich leuchtendem Hirnparenchym.

3. ERGEBNISSE



Graphik 8: Intra-zerebrale injizierte GFP-Zellen in der ECL. Vergrößerte Aufnahme nach intraparenchymaler Injektion unter grünem (A), rotem (B) und gemischtem (*merge*) (C) Auflicht (selber Bildausschnitt). (Originalvergrößerung: 200 fach, Maßstab: 10 μm).

Die histologischen Schnitte des Hippokampus 7 Tage post injectionem sind in Graphik 9 dargestellt. In den Abbildungen 9 A-C sind an der zerebralen Läsionsstelle zu diesem Zeitpunkt keine GFP-Zellen mehr erkennbar. Die grünliche Färbung des Gewebes in Graphik 9 A ist auf die Autofluoreszenz des Gewebes zurückzuführen, da zum Einen unter rotem Auflicht in Graphik 9 B eine identische Verteilung und Intensität der roten Fluoreszenz deutlich wird. Zum Anderen sind unter der gemischten Fluoreszenz in Graphik 9 C, in der sich die Autofluoreszenz des Gewebes durch die Doppelbeleuchtung von rotem und grünem Licht aufhebt, keine grünen Zellen bzw. keine alleinige grüne Fluoreszenz sichtbar.



Graphik 9. Zerebrale Läsionsstelle 7 Tage post injectionem. Derselbe Bildausschnitt des lädierten entorhinalen Cortex unter grünem (A), roten (B) und gemischtem (C) Fluoreszenz-Auflicht. Es sind zu diesem Zeitpunkt keine GFP-Zellen mehr im Hirnparenchym nachweisbar (Originalvergrößerung: 40 fach, Maßstab: 50 μm).

3.2.1. Migrationsweg der intraparenchymal injizierten Monozyten

Für den Nachweis des Migrationsweges von intrazerebral injizierten Monozyten wurden periphere Blutmonozyten von GFP-exprimierenden Mäusen isoliert und für die Injektion präpariert. Die Injektion erfolgte in den Ort der ECL.

In der ersten Experimentenreihe sollte der Zielort der aus dem ZNS migrierenden Monozyten detektiert werden. Dafür wurden alle bis dato als das ZNS drainierende LK histologisch untersucht. Dazu gehörten die den Spinalkanal drainierenden inguinalen LK, als auch die tiefen und die oberflächlichen zervikalen LK. Es wurden demnach drei LK pro Körperseite entnommen. Zur Untersuchung des potentiellen venösen Abflussweges, wurden auch die Milzen der Versuchstiere auf GFP-Monozyten hin untersucht.

Gleichzeitig konnte anhand der verschiedenen Zeitpunkte ein zeitliches Schema des Auftauchens der GFP-Monozyten in den immunologischen Organen p.i. etabliert und die Organe, die zu den auffälligen Zeitpunkten entnommen wurden, konnten anschließend genauer analysiert werden. Die Entnahmen erfolgten zu den Zeitpunkten 12 h, 24 h, 48 h, 7 d, 14 d und 21 d p.i. (siehe Graphik 10).

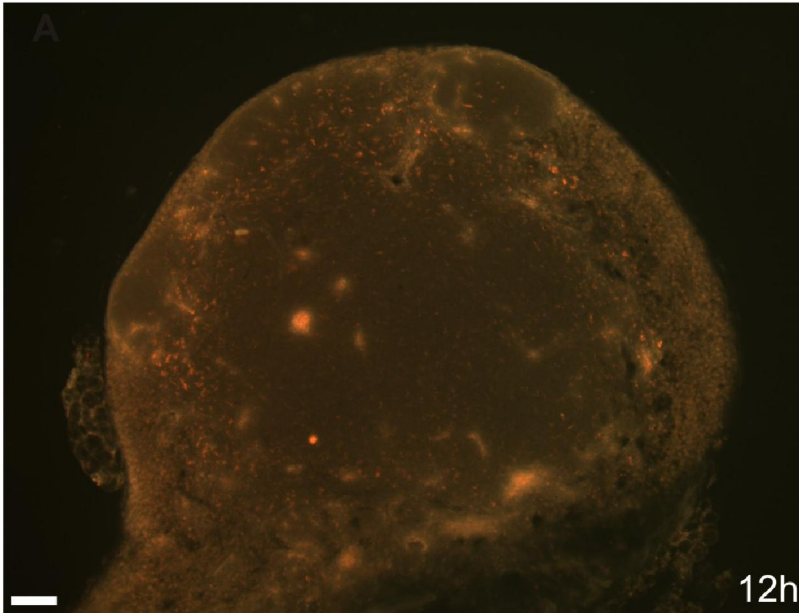
Tier-Zeitpunkt p.i.	Superfizielle LK rechts/ links	Tiefe LK rechts/ links	Inguinale LK rechts/ links	Milz
1- 12h 2-12h	x/x y/y			
3-24h 4-24h				
5-48h 6-48h				
7-7 Tage 8- 7 Tage				
9- 14 Tage 10- 14 Tage				
11- 21 Tage 12- 21 Tage				

Graphik 10: Exemplarische Tabelle für die Untersuchung der Lymphknoten.

Pro LK wurden zwischen 10-15 Schnitte angefertigt und auf Glasobjektträgern fixiert und anschließend insgesamt 6 LK histologisch auf GFP-Zellen untersucht (siehe Methoden: 2.2.8.3.).

3. ERGEBNISSE

In Graphik 11 ist exemplarisch ein histologischer Schnitt eines nach 12 h entnommenen zervikalen LK unter gemischtem Fluoreszenz-Auflicht dargestellt. Im gesamten LK sind keine grünleuchtenden GFP-Zellen erkennbar,

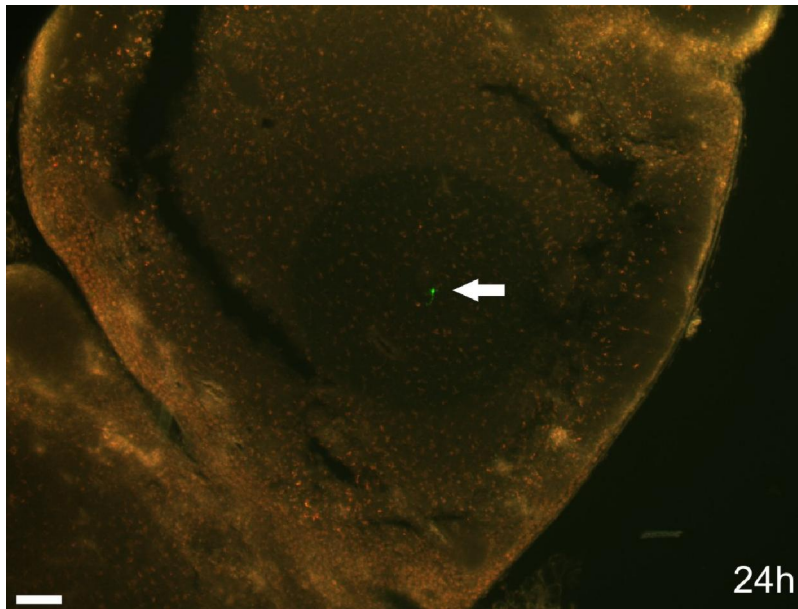


Graphik 11. Zervikaler Lymphknoten 12 h post injectionem.

Aufsicht eines LK Schnittes unter Doppellichtfluoreszenz.

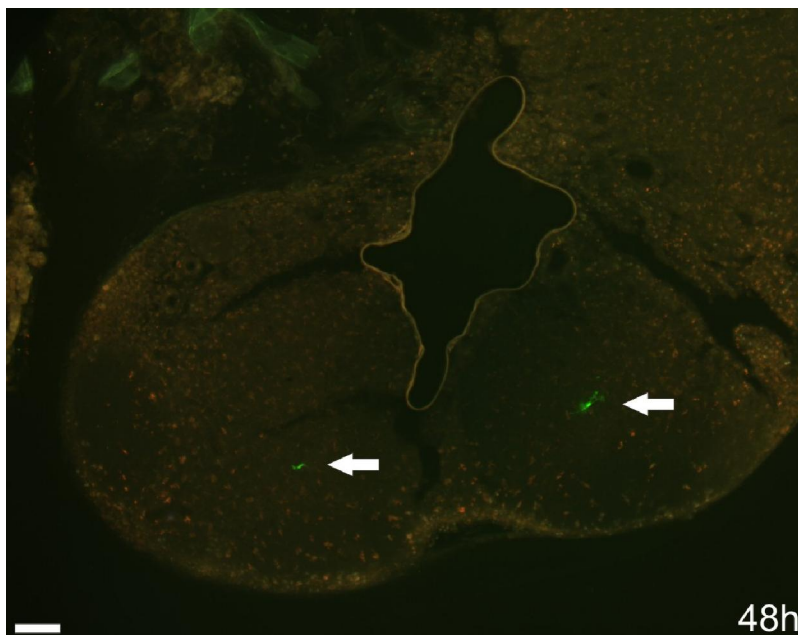
(Originalvergrößerung 100 fach, Maßstab: 200 μ m).

In den nach 24 h p.i. aus den Versuchstieren entnommenen LK wurden regulär 1-2 GFP-Monozyten pro untersuchten LK gefunden. Allerdings waren diese alle in den tiefen zervikalen LK lokalisiert. Weder in den oberflächlichen, noch in den inguinalen LK noch in der Milz eine GFP-Zelle aufzufinden war (Graphik 12).



Graphik 12. 24 h post injectionem. Ein bis zwei GFP-Zellen pro tiefen zervikalen LK konnten in der Doppelauflichtmikroskopie aufgefunden werden (Originalvergrößerung 100 fach, Maßstab: 200 μm).

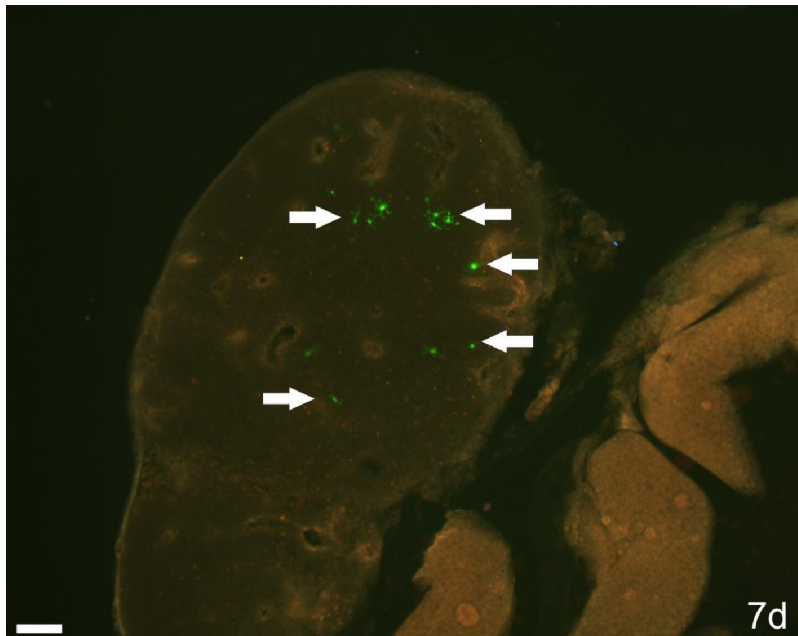
Die Anzahl der in den peripheren LK gefundenen GFP-Monozyten stieg zu den nachfolgend untersuchten Zeitpunkten an. In den LK, die nach 48 h p.i. aus den Versuchstieren entnommen wurden, konnten ein bis zwei GFP-Monozyten pro Schnitt gefunden werden (Graphik 13).



Graphik 13. 48 h post injectionem. Pro Schnitt des LK konnten ein bis zwei GFP-Monozyten detektiert werden (Doppellichtmikroskopie, Originalvergrößerung 100 fach, Maßstab: 200 μm).

3. ERGEBNISSE

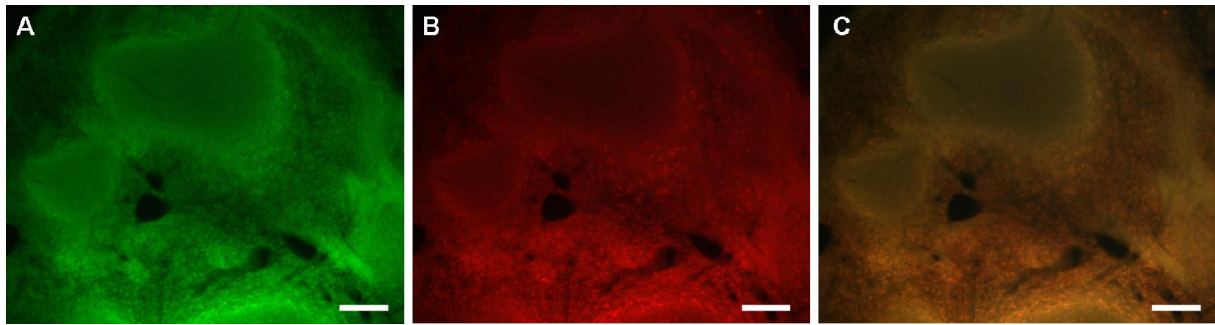
Sieben Tage nach der Injektion der isolierten Monozyten konnten durchschnittlich 10 GFP-positive Zellen pro Lymphknotenschnitt identifiziert werden, welches die höchste Akkumulation der GFP-Monozyten im Gesamtverlauf darstellte. Der repräsentative Schnitt eines tiefen zervikalen LK ist in Graphik 14 erkennbar. Nach sieben Tagen konnte nur in Einzelfällen in den superfizialen, in den inguinalen LK oder der Milz GFP-Zellen nachgewiesen werden.



Graphik 14. Sieben Tage post injectionem. Akkumulation der in den tiefen zervikalen LK gefundenen GFP-Monozyten sieben Tage nach der Läsion bzw. Injektion (Doppellichtmikroskopie, Originalvergrößerung 100 fach, Maßstab 200 µm).

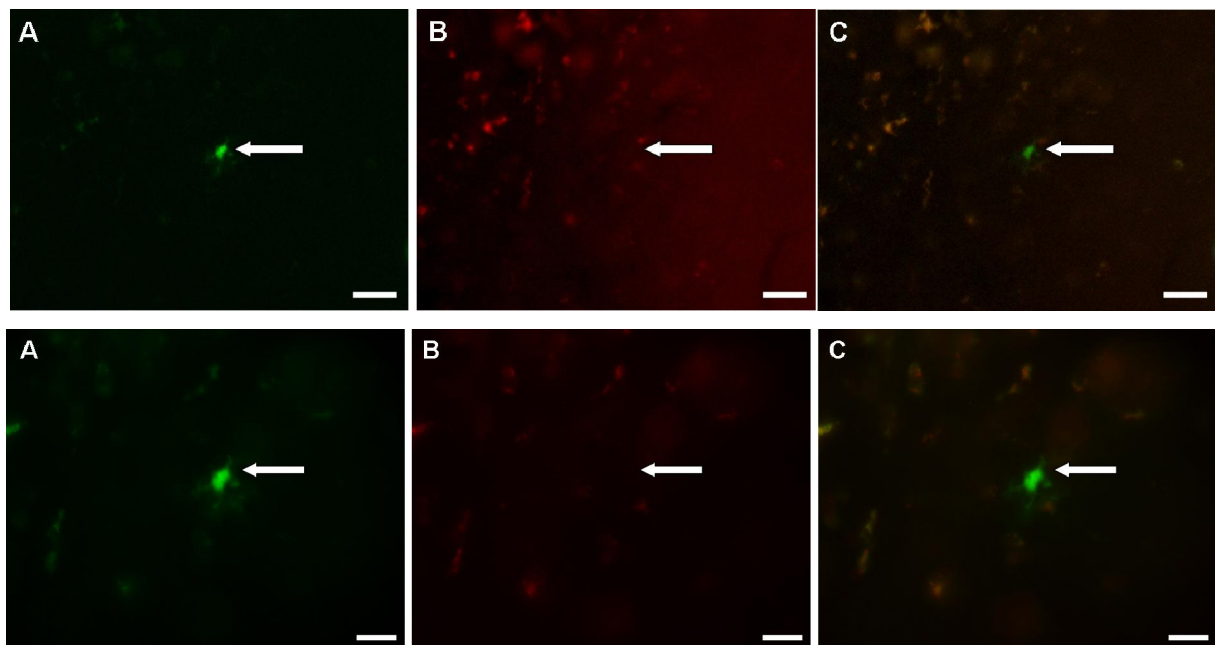
In der Milz konnten zu den untersuchten Zeitpunkten keine GFP-Zellen in den histologischen Schnitten unter Fluoreszenz-Auflicht detektiert werden. In Graphik 15 ist der Schnitt einer Milz, entnommen 7 Tage p.i. unter grünem (Graphik 15 A), roten (Graphik 15 B) bzw. gemischtem (Graphik 15 C) Fluoreszenz-Auflicht dargestellt. Die grüne Fluoreszenz des Gewebes in 15 A und die rote Fluoreszenz in 15 B ist als Eigenfluoreszenz identifizierbar, da sich in 15 C unter dem gemischten Auflicht keine rein grüne oder rein rote Fluoreszenz abhebt.

3. ERGEBNISSE

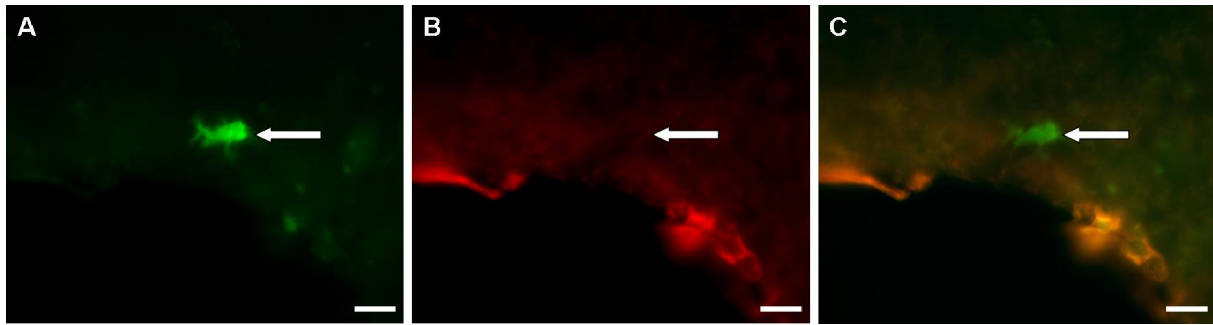


Graphik 15. Milz sieben Tage post injectionem. In histologischen Querschnitten der Milz aus Tieren sieben Tage p.i. konnten weder unter grüner (A) noch unter roter (B) oder Doppellichtfluoreszenz (C) grünleuchtende GFP-Zellen entdeckt werden (Originalvergrößerung 200fach).

In Graphik 16 und Graphik 17 sind Nahaufnahmen von zervikalen LK, entnommen nach 14 (Graphik 16) und 21 Tagen (Graphik 17) p.i. dargestellt. Wie anhand der Abbildungen erkennbar, waren nur sehr vereinzelt GFP-Monozyten zu diesen Zeitpunkten auffindbar.



Graphik 16. Vereinzelter ramifizierter Monozyt in zervikalem Lymphknoten 14 dpi. In oberer Reihe in 100 facher Vergrößerung. In A ist unter grüner Fluoreszenz eine ramifizierte GFP-Zelle zu erkennen. Unter rotem Auflicht (B) ist im selben Bildausschnitt keine GFP-Zelle zu sehen, allerdings unter dem gemischten Auflicht (C): Die grün leuchtende Zelle ist der 14 Tage vorher injizierte GFP-Monozyt im umgebenden rötlich leuchtenden LK Gewebe. In unterer Reihe ist die GFP-Zelle im selben Bildausschnitt in höherer Vergrößerung dargestellt (1000 fach), die grünleuchtenden Ramifizierungen der Zelle sind deutlich erkennbar (A-C) (Originalvergrößerung: obere Reihe: 100 fach, untere Reihe: 1000 fach; Maßstab: 200 μ m bzw. 20 μ m).

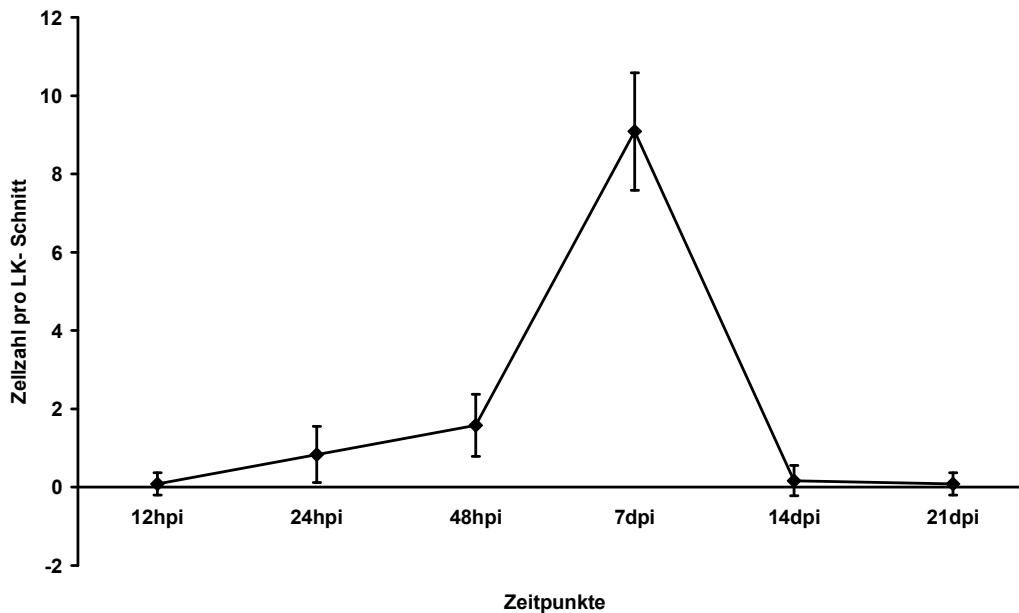


Graphik 17. Vereinzelter ramifizierter Monozyt im tiefen zervikalen LK 21 dpi. Unter grünem Auflicht ist der ramifizierte GFP-Monozyt gut erkennbar (A). Unter rotem Auflicht im selben Bildausschnitt ist nur das rot-autofluoreszierende LK-Gewebe aber keine GFP-Zelle detektierbar (B). Unter gemischtem Auflicht ist der grünfluoreszierende Monozyt im rötlich leuchtendem LK-Gewebe erkennbar (C). (Originalvergrößerung: 1000 fach, Maßstab: 20 μ m).

Zusammenfassend wurden die postläsional zentral injizierten GFP-Monozyten im Verlauf in den tiefen zervikalen LK gefunden. Die Zellanzahl stieg dort ab dem untersuchten Zeitpunkt von 12 h p.i. stetig an und erreichte am siebten d p.i. ihren Höchstwert. Anschließend fiel die Zellzahl zu den untersuchten Zeitpunkten 14 d p.i. und 21 d p.i. wieder ab (Graphik 16, 17).

In Graphik 18 ist der Verlauf der in den zervikalen LK gefundenen Zellanzahl über die untersuchten Zeitpunkte graphisch dargestellt. Ab 12 h p.i. bis zu 48 h p.i. ist ein langsamer Anstieg der Zellanzahl in den LK zu verzeichnen. Ein deutliches Maximum der Zellanzahl der GFP-Monozyten in den zervikalen LK hebt sich 7 d p.i. hervor. Nach 14 und 21 d sinkt die Zellzahl deutlich auf ein Minimum ab.

3. ERGEBNISSE



Graphik 18. Graphische Darstellung der ansteigenden Zellanzahl in den tiefen zervikalen LK über eine Zeitspanne von 12 h- 21 d (hpi= Stunden p.i., d= Tage p.i.). Die absolute Zellanzahl bezieht sich auf die durchschnittliche gefundene Zellanzahl auf einem LK Präparat.

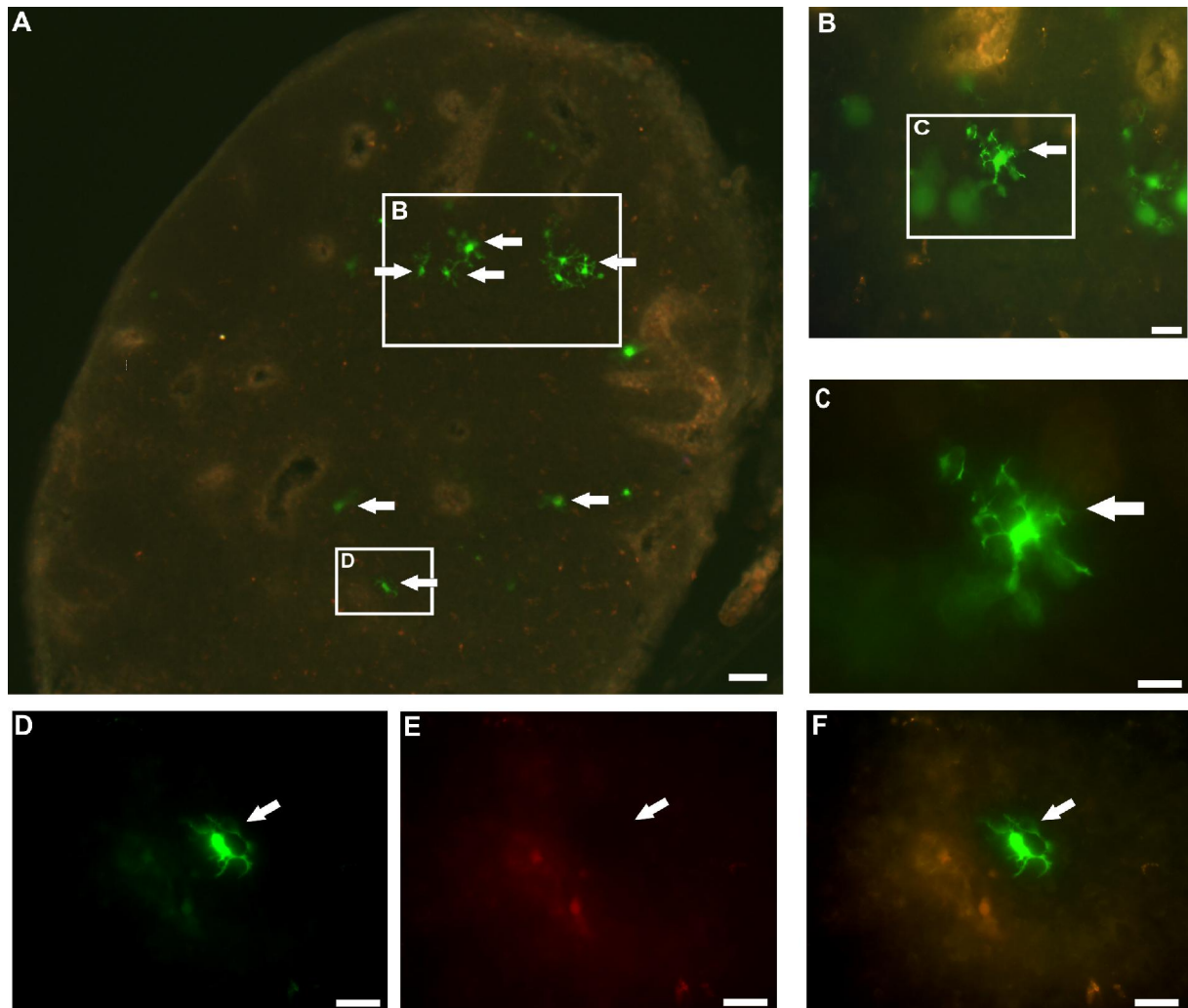
In der Kontrollgruppe A bestand die Injektion aus reinem PBS ohne Zellen. Hierbei war in den Kontrolltieren keine grüne Fluoreszenz in den LK zu eruieren. In der Kontrollgruppe B implizierte die Injektion mit PFA fixierte GFP-Monozyten. In diesem Fall wurden sieben d p.i. keine Zellen in den LK gefunden.

3.2.2. Ramifizierte Morphologie im Parakortex der zervikalen LK

Zu den untersuchten Zeitpunkten konnten die gefundenen GFP-Monozyten hauptsächlich im Parakortex der LK lokalisiert werden.

Phänotypisch zeigten die Zellen eine stark ramifizierte Morphologie mit in alle Richtungen ausgestreckten Fortsätzen (Graphik 19). Die GFP-Zellen exprimierten die grüne Fluoreszenz ubiquitär im gesamten Zellplasma bis hinein in jeden einzelnen Fortsatz.

Die grüne Fluoreszenz erschien lediglich unter dem grünen und dem Doppellichtfilter, wohingegen unter dem roten Auflicht keine Fluoreszenz sichtbar wurde. Anhand dessen konnte die grüne Fluoreszenz der GFP-Zellen zugeordnet werden und ist nicht etwa als Autofluoreszenz des Gewebes erkennbar.



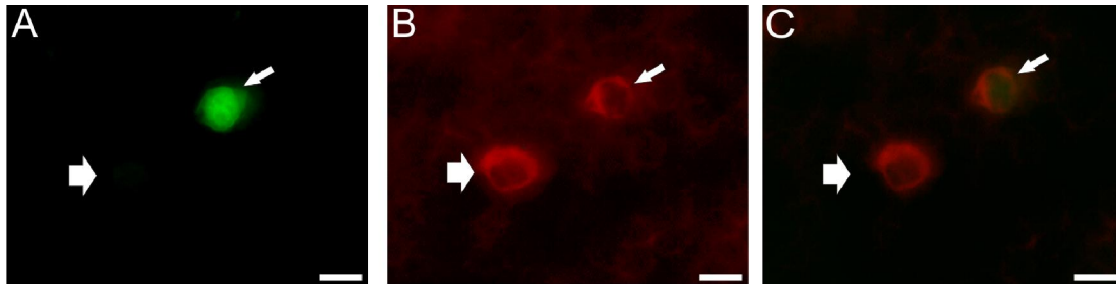
Graphik 19. Überblick auf einen zervikalen Lymphknoten, entnommen 7 Tage nach Injektion von GFP Monozyten in die ECL Läsionsstelle.

A. 7 Tage nach intrazerebraler Injektion von GFP-Monozyten in den Ort der ECL. Akkumulation der ramifizierten Zellen in den tiefen zervikalen LK: Pfeile zeigen auf die ramifizierten Zellen, die grüne Fluoreszenz der Monozyten wird demonstriert anhand des Doppellicht-Filters (Originalvergrößerung 200 fach, Maßstab: 40 μm). Graphik 19 **(B)** zeigt einen vergrößerten Ausschnitt der Einrahmung in **(A)** (Originalvergrößerung 600 fach, Maßstab: 20 μm), Graphik 19 **(C)** zeigt die vergrößerte Version der eingerahmten Zelle in **(B)** (Originalvergrößerung 1000 fach, Maßstab 20 μm).

Der untere eingerahmte Kasten in **(A)** ist in **(D)** vergrößert zur Darstellung der grünen Fluoreszenz: unter grünem **(D)** und doppeltem Auflicht **(F)** erscheint die GFP-Zelle grün, unter rein rotem Auflicht **(E)** ist die Zelle hingegen nicht zu erkennen (Originalvergrößerung 1000 fach, Maßstab: 20 μm).

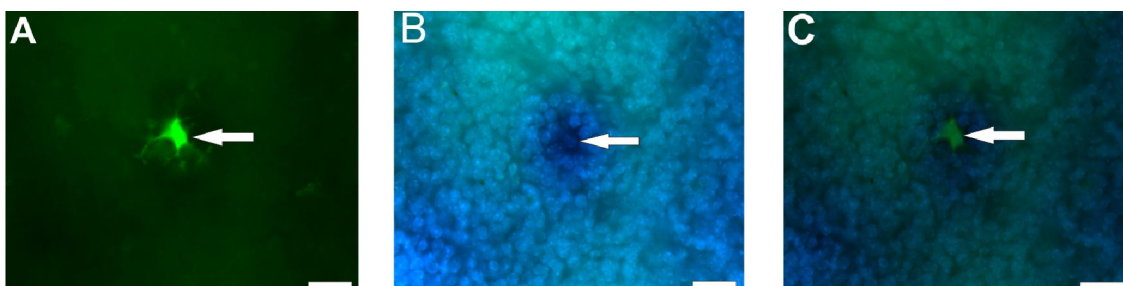
3. ERGEBNISSE

Um die GFP-Zellen als Monozyten identifizieren zu können, wurden die Schnitte der zervikalen LK mit MAC-1 eingefärbt. Durch den makrophagenspezifischen Marker erscheint die Zellmembran der Monozyten unter rotem sowie gemischtem Fluoreszenz-Auflicht rot. Die gleichzeitige Präsenz einer roten sowie einer grünen Fluoreszenz bei den in den LK detektierten Zellen, verifiziert die Zellen als die zuvor intrazerebral injizierten GFP-Monozyten (Graphik 20).



Graphik 20. Naheinstellung von zwei Monozyten im tiefen zervikalen Lymphknoten im Präparat einer 7 d p.i. perfundierten Maus. Unter dem grünen Lichtfilter (A) erscheint nur der GFP-Monozyt ubiquitär mit grüner Fluoreszenz. Durch die MAC-1 Färbung erscheinen im selben Bildausschnitt aber unter rotem Auflicht zwei MAC-1 positive Zellen (B). Unter Doppelauflicht zeigt nur die rechte Zelle eine intrazelluläre grüne Fluoreszenz und kann somit als ein vorher injizierter GFP-Monozyt identifiziert werden. Dahingegen zeigt die linke Zelle keine grüne Fluoreszenz sondern eine rot fluoreszierende Mac-1 positive Membran und ist somit ein ortsständiger Monozyt (Originalvergrößerung 1000 fach, Maßstab: 20 μm).

Die Viabilität der GFP-exprimierenden Zellen in den LK von den Versuchstieren 7 d p.i. wurde mittels einer DAPI Färbung überprüft. Hierdurch konnten die intakten Nuklei der Monozyten dargestellt werden (Graphik 21).



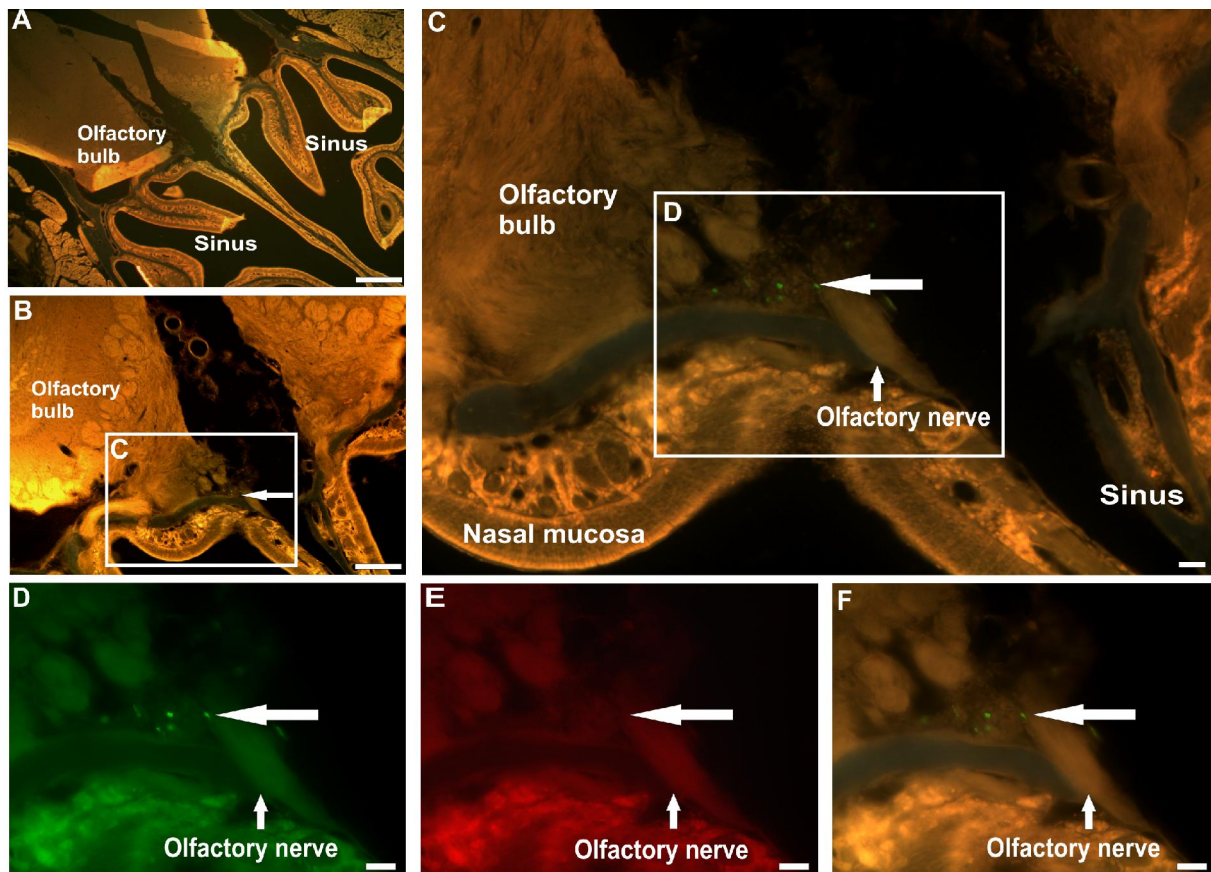
Graphik 21. Vitalität der GFP-Monozyten (A) bewiesen durch eine DAPI-Färbung (B) eines tiefen zervikalen LK einer 7 Tage p.i. perfundierten Maus. Die intakten Nuklei wurden intrazellulär der GFP-Monozyten detektiert (Pfeilspitze weist auf den Nukleus, Originalvergrößerung 1000 fach, Maßstab 20 μm).

3.2.3. Migration der intraparenchymal injizierten Monozyten

Im zweiten Experimentenansatz, wurden die injizierten Zellen in ganzen entkalkifizierten Köpfen verfolgt. Nach 48 h wurden die injizierten GFP-Monozyten direkt proximal des Nervus olfactorius in der Lamina cribrosa entdeckt. An dieser Stelle penetriert der erste Hirnnerv vom Bulbus olfactorius kommend die Lamina cribrosa und befindet sich auf dem Weg nach kaudal in Richtung des nasalen Sinus (Graphik 22).

Die grüne Fluoreszenz ist unter grünem und doppeltem Auflicht sichtbar, allerdings nicht unter dem roten Filter. Dadurch ließ sich ausschließen, dass es sich bei der sichtbaren grünen Fluoreszenz um Autofluoreszenz des Gewebes handelt.

3. ERGEBNISSE



Graphik 22. GFP-Monozyten migrieren aus dem ZNS über die Lamina cribrosa entlang der Filae olfactoriae in die zervikalen Lymphknoten.

(A) Übersicht eines ganzen Schädelpräparates 48 h nach der GFP-Monozyten Injektion in die ECL-Stelle. (*Olfactory bulb*: Bulbus olfactorius (Originalvergrößerung 40 fach, Maßstab: 500 μ m)).

(B) Großaufnahme der Lamina cribrosa und des Nervus olfactorius ausgehend vom Bulbus olfactorius in Richtung Sinus laufend, großer Pfeil zeigt auf die proximal sich befindlichen GFP-Monozyten sowie auf den Nervus olfactorius (Originalvergrößerung 400 fach, Maßstab: 50 μ m). (C) Höhere Vergrößerung der neben dem Nervus olfactorius (= *Olfactory nerve*) sich befindenden identifizierten GFP-Monozyten (Pfeilspitze). Die Graphiken (A-C) wurden unter dem Doppelauflicht festgehalten um die grüne Fluoreszenz der GFP-Monozyten als auch simultan die anatomischen Strukturen darzustellen (*Nasal mucosa*= Nasenschleimhaut) (Originalvergrößerung 600 fach, Maßstab: 50 μ m).

(D-E) Der weiße Rahmen in (C) fokussiert den Bereich, welcher die GFP-Monozyten beinhaltet (Originalvergrößerung 1000 fach, Maßstab: 50 μ m). Die Spezifität der grünen Fluoreszenz wird über ihr Verschwinden unter rotem Auflicht deutlich (Graphik 22 E).

3.3. Ergebnisse-Ausblick

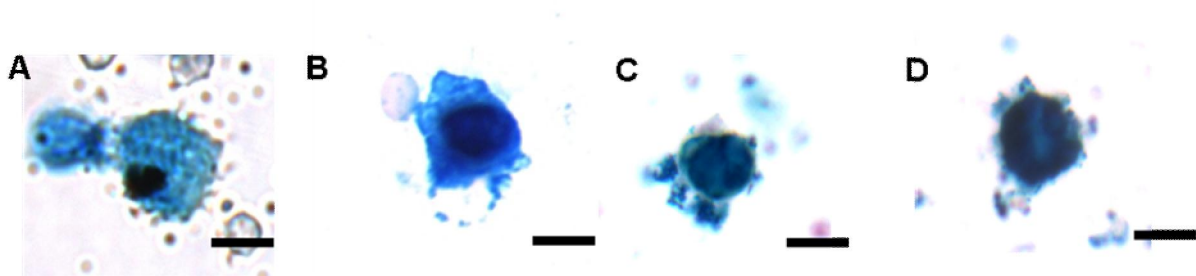
3.3.1. Eisenbeladung von Monozyten

Für die geplante MRT-gesteuerte Verfolgung der Migration von Monozyten aus dem ZNS musste zunächst die Beladung der Monozyten mit Eisen voran gehen.

Zur Erforschung der optimalen Kombination von Eisenbeladungszeit und Eisenbeladungsmenge wurde die isolierte Monozytenfraktion in variierender Menge und Inkubationszeit mit VSOP beladen.

Durch die anschließende Berliner-Blau-Färbung konnte die Eisenbeladung im Zytoplasma in blauer Farbe sowie die Kernintaktheit der einzelnen Zellen mit der Kernechtfärbung in roter Farbe sichtbar gemacht werden. Die optimale Kombination wurde an einer intakten Zytomembran, intrazellulärem und intaktem Nukleus, sowie einer gleichmäßigen Blaufärbung des Zytoplasmas festgemacht.

Im Vergleich der variablen Ansätze ergab sich bei einer Inkubationsdauer von 12 h mit einer Beladungsmenge von 0,5 μl (0,5 mM) VSOP das optimale Ergebnis.



Graphik 23. Eisenbeladene Monozyten. Monozyten 12 h mit

0,3 μl (A), 0,5 μl (B), 1 μl (C) und 2 μl (D) VSOP beladen. Beachtenswert ist das durch die Eisen-Phagozytose blaugefärbte Zytoplasma sowie der durch die Kernechtfärbung sichtbare Zellkern, der durch die blaue Färbung hindurch violett erscheint. Mit einer Eisenbeladung von $> 0,5 \mu\text{l}$ zeigen sich die Monozyten stark blau angefärbt und die Kernfärbung ist nahezu unerkennbar (C, D). Bei einer Beladung von 0,5 μl (B) sind die Zellfortsätze homogen gefärbt und der Zellkern erkennbar. (Originalvergrößerung 1000 fach, Maßstab: 20 μm).

3.3.2. Isolation und Injektion von adulter Mikroglia

In den bisherigen Experimenten wurden die der Makrophagen Familie entstammenden peripher im Blut vorkommenden Monozyten isoliert und injiziert, da bekannt ist, dass die von peripher einwandernden im Verlauf von zentralen neurodegenerativen Prozessen Monozyten eine essentielle Rolle spielen. Daneben tragen allerdings auch die perinatal von peripher eingewanderten, und seitdem zentral ansässigen Makrophagen, namentlich Mikroglia, eine ausschlaggebende Bedeutung in zentralen postläsionalen Zuständen. Bisher wurde nur die Migration von aus perinatalen Versuchstieren und in Kultur gehaltener Mikroglia intrazerebral injiziert und verfolgt.

Mikroglia aus GFP-exprimierenden Mäusen wurden isoliert und injektionsbereit präpariert. Die LK wurden 7 d postläsional entnommen und histologisch examiniert. Zu diesem Zeitpunkt konnten keine GFP-Zellen in den peripheren LK nachgewiesen werden.

3.3.3. Zusammenfassung der Ergebnisse

Isolation peripherer Monozyten

Das Isolationsprotokoll konnte soweit optimiert werden, dass stets eine Vitalität und Reinheit bei der Monozytenisolation aus dem peripheren Blutkreislauf von über 90% erreicht werden konnte. Die Phänotypisierung und Vitalitätskontrolle erfolgte mit Hilfe von FACS Färbungen und anschließenden FACS Messungen und Auswertungen als auch der histologischen Evaluation der isolierten Zellfraktion unter dem Mikroskop.

Akkumulation der GFP-Monozyten in tiefen zervikalen LK

Die aus dem Blut der Versuchstiere isolierten und aufgereinigten vitalen grün fluoreszierenden Monozyten wurden intrazerebral in die zuvor stereotaktisch gesetzte entorhinale Kortexläsion injiziert. Anhand der Analyse von histologischen Vibratomschnitten von ganzen LK konnten die GFP-Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop in den tiefen zervikalen LK detektiert werden. Durch die Untersuchung von Schnitten ganzer lymphatischer Organe zu den Zeitpunkten 12 hpi, 24 hpi, 48 hpi, 7 dpi, 14 dpi und 21 dpi ließ sich ein Zeitschema der Migrationsdynamik der Monozyten erstellen. Die grün fluoreszierenden Zellen akkumulierten langsam ansteigend zu den Zeitpunkten 12 hpi- 48 hpi. Die höchste Zellzahl der GFP-Monozyten konnte sieben Tage nach der postläsionalen Injektion in den tiefen zervikalen LK entdeckt werden. Im Anschluß zeigte sich zu den Zeitpunkten 14 dpi und 21 dpi ein starker Abfall der GFP-Zellzahl in den untersuchten zervikalen LK.

In den Kontrollen mit PFA-fixierten GFP-Monozyten zeigte sich keine Ansammlung der GFP-Monozyten mit einem Höhepunkt am siebten Tag.

In der *vehicle*-Kontrolle mit einer Injektion von PBS konnte in der histologischen Analyse keine GFP-Zellen in den lymphatischen Organen gefunden werden.

Migrationsweg der GFP-Monozyten aus dem ZNS

Bei der histologischen Untersuchung der Kryotomschnitte von den entkalkifizierten Schädeln der Versuchstiere konnten die postläsional injizierten GFP-Monozyten nach 48 h in der Lamina cribrosa entlang der Filae olfactoriae entdeckt werden. Der vorher unbekannte Migrationsweg von Monozyten aus dem ZNS in die Peripherie konnte hier somit nun identifiziert werden.

4. DISKUSSION

In der hier vorliegenden Arbeit konnten ramifizierte Zellen, nach der intrazerebralen Injektion von aus dem Blut stammenden GFP-Monozyten an die Stelle einer axonalen Läsion, in den zervikalen LK nachgewiesen werden.

Bemerkenswert ist dabei, dass die höchste Anzahl dieser Zellen sieben Tage nach der Injektion in den tiefen zervikalen LK nachgewiesen werden konnte, jedoch keine in den übrigen untersuchten LK oder in der Milz.

Die jeweiligen Ergebnisse der zusammenhängenden experimentellen Ansätze werden im Folgenden zunächst mit dem aktuellen Stand der Literatur verglichen. Im Anschluss werden die methodischen Aspekte der Studien diskutiert und die Resultate der Experimente in diesem Rahmen bewertet. Zum Abschluss sollen Schlussfolgerungen bezüglich weiterführender Fragestellung in der Neuroimmunologischen Forschung gezogen werden.

4.1. Neuroimmunologische Migrationswege

4.1.1. Drainage des ZNS in die zervikalen LK

Früher galt auch die Abstinenz von afferenten, das Gehirn drainierenden LK, als eine der ursächlichen Faktoren für das zentrale Immunprivileg. Inzwischen wurde die Rolle der Drainage des ZNS insbesondere im Rahmen zentraler Läsionen intensiv erforscht, mitunter auch die Beziehung zwischen dem ZNS und dem peripheren Immunsystem [133, 134]. Es konnten die Migrationsrouten von Leukozyten aus dem ZNS in Richtung der zervikalen LK entdeckt und die signifikante Rolle der LK bei neuropathologischen Prozessen aufgezeigt werden.

Unter anderem führte die Entnahme zervikaler LK von Tieren mit EAE zu einer Reduktion des Entzündungsvorgangs um 40 % [135]. Eine Erklärung dafür könnte das Auftauchen von ZNS-Antigenen in den drainierenden zervikalen LK und deren Interaktion mit reaktiven T Zellen sein [136]. Zudem wurde gezeigt, dass das Ausmaß einer zentralen Läsion proportional mit der Anzahl der neuronalen Antigene in den zervikalen LK zueinander steht [137]. Es bleibt bis dato ungeklärt, ob die neuronalen Antigene passiv zu den LK drainierten oder mit Hilfe von Immunzellen dorthin transportiert worden sind.

Bisher konnten Hatterer et al. das Auftauchen von kultivierten dendritischen Zellen in den zervikalen LK, sowohl nach Injektion in die zerebralen Liquorräume als auch nachdem ein neuroinflammatorischer Prozess im ZNS stattgefunden hatte, darstellen [5, 138]. Auch konnten mit Ovalbumin beladene dendritische Zellen nach Injektion in das ZNS in zervikalen LK nachgewiesen werden, wo sie spezifische T-Zellen stimulierten und wiederum das Rückkehren der T-Zellen in das ZNS auszulösen schienen [6].

Die Migration von T-Zellen aus dem ZNS wurde von Goldmann et al. nachgewiesen. Die T-Zellen konnten entlang den perineuralen Nervenscheiden des ersten Hirnnerves entdeckt werden, worüber sie Zugang zu den nasalen Lymphdrainagewegen via der Lamina cribrosa erhalten [25].

Die signifikante Mitwirkung von peripheren Blutmonozyten an neuroimmunologischen Ereignissen, wurde in vorausgegangenen Studien gezeigt [108, 111].

Doch blieb die Verbindung zwischen den postläsional von peripher einwandernden Monozyten in das ZNS und der Hintergrund für mit Myelin beladenen APZ in zervikalen LK [136] in mit EAE behandelten Rhesus-Affen [137] und in MS-Patienten [139] bislang ungeklärt.

In dieser Arbeit konnte das Bestehen eines Migrationsweges von Monozyten deutlich gezeigt werden: Injizierte Monozyten verlassen das ZNS durch die Lamina cribrosa entlang der Filiae olfactoriae und erreichen die höchste Anzahl 7 Tage nach der Injektion in den tiefen zervikalen LK.

4.1.2. Passive versus aktive Migration der Monozyten

Bis dato wurde herausgefunden, dass Antigene die zervikalen LK in Maximalzahl nach Minuten bis hin zu Stunden erreichen [140, 141], während GFP-Lymphozyten ihre höchste Anzahl in den zervikalen LK 48 h nach intrazerebraler Injektion aufweisen [25]. Die höchste Zellanzahl der Monozyten zeigte sich hingegen 7 Tage nach der Injektion. Das lässt vermuten, dass Monozyten nicht nur auf dem Weg des gleichen passiven Transportes nach peripher gelangen wie Lymphozyten [25], lösliche Antigene [21] oder Erythrozyten [142], sondern aufgrund der Verzögerung womöglich auch durch aktive Fortbewegung. Diese wäre mit vielen weiteren Faktoren verbunden, wie z.B. Interleukinen, Adhäsionsmolekülen etc., die für einen endgültigen Beweis der aktiven Migration noch untersucht werden müssen.

In der aktuellen Wissenschaft wird diskutiert, ob durch das Modell der ECL die BBB signifikant unterbrochen wird und die Zellen so passiv über den venösen Abfluss in die Peripherie gelangen. In diesem Fall wäre allerdings der Großteil der postläsional injizierten GFP-Monozyten unmittelbar oder spätestens innerhalb der ersten 12 h nach der Läsion/Injektion in den zervikalen LK aufgetaucht. Hinzu kommt, dass in der Milz, welche das venöse Blut filtert, keine GFP-Monozyten gefunden werden konnten.

Ein bedeutender Hinweis auf die aktive Migration der Monozyten auf dem Weg aus dem ZNS ist die Kontrolle; hierbei wurden mit PFA fixierte Zellen injiziert. Es zeigte sich auch am 7. Tag p.i. keine GFP-Zelle in den LK. Das bedeutet, dass die hohe Zellzahl am 7. Tag keine Folge von über passiven Transport sich ansammelnder Zellen ist. Dass ein Teil der durch PFA fixierten Zellen am Läsionsort direkt abgeräumt wurde lässt sich nicht ausschliessen. Dieser Teil fiel als Kontrollparameter zur Unterscheidung passive versus aktive Migration weg. Ein Großteil der toten Zellen würde die LK allerdings erreichen, wenn die Migration der Monozyten rein durch passiven Transport von statten gehen würde.

Insgesamt ist die Unterscheidung eines passiven versus aktiven Transport essentiell im Hinblick auf die Entwicklung neuer Therapieoptionen, da die in die aktive Migration involvierten Faktoren neue therapeutische Zielobjekte darstellen würden.

4.2. Ramifizierte Monozyten im Parakortex der tiefen LK

Die als GFP-Monozyten identifizierten Zellen sind in den zervikalen LK vornehmlich im Parakortex lokalisiert und weisen ähnlich wie dendritische Zellen oder Mikroglia multiple, sternförmige zytoplasmatische Fortsätze auf.

Die GFP-Fluoreszenz in den peripheren LK könnte als Autofluoreszenz des injizierten PBS mißinterpretiert werden, und durch z.B. Inkorporation LK-ortsansässiger Monozyten die Zellgestalt annehmen. Allerdings wäre das GFP dann nicht ubiquitär im Zellkörper zu sehen wie bei GFP-exprimierenden Zellen.

Zum weiteren Ausschluss wurden in einem Kontrollversuch reines PBS in die ECL Stelle injiziert und dabei nachfolgend keine Zellstrukturen entdeckt. Die PBS-Kontrolle diente auch als übliches *vehicle control experiment*.

4.2.1. Klassifizierbar als dendritische Zellen oder Mikroglia ?

Per definitionem wurden innerhalb dieser Arbeit periphere Blutmonozyten isoliert und durch Markierung mit dem CD11c-Marker ein Anteil dendritischer Zellen ausgeschlossen. Aufgrund der unmittelbaren Verwandtschaft der beiden Zellarten, bleiben die Klassifikationsgrenzen allerdings fließend.

In anderen Organen außer dem ZNS verlassen Monozyten unter entzündlichen Konditionen die Blutbahn und wandern ins Gewebe ein, wo sie anschließend in der Lage sind, sich in Makrophagen oder dendritische Zellen zu differenzieren [143]. Für das ZNS konnte jüngstens bewiesen werden, dass Monozyten im Rahmen zentraler Entzündungen das ZNS über die BBB hinweg infiltrieren und an den Läsionsorten akkumulieren [10]. Die Monozyten entwickeln sich dort dann zu einer Unterart von Makrophagen oder inflammatorischen dendritischen Zellen, welche viele der APZ charakteristischen phänotypischen Merkmale und Funktionen aufweisen, auch die Fähigkeit zur Antigenprozessierung und -präsentation gegenüber T-Zellen [144, 145]. In der Peripherie verbleiben inflammatorische Monozyten nach Phagozytose einerseits als Makrophagen im Gewebe, andererseits wandern sie in die T-Zell Region drainierender LK und nehmen einen den dendritischen-Zellen-ähnlichen Phänotyp an [144]. In das ZNS eingewanderte GFP-Monozyten sind nach 30 Tagen weder im ZNS nachweisbar, noch sind Apoptose-Merkmale in der Umgebung vorhanden (siehe 2.). Wie hier dargestellt, verlassen auch die in das ZNS eingewanderten Monozyten den Ort der Läsion gen LK. Dort nehmen die Monozyten im Parakortex (T-Zellzone) einen den dendritischen Zellen ähnlichen Phänotyp an. Es besteht die Möglichkeit, dass die im LK befindlichen Zellen nun zusätzlich zu CD11b auch CD11c exprimieren, so dass sie als dendritische Zellen klassifiziert werden müssten. Allerdings würde es an dieser Stelle keinen Unterschied für die nachfolgende Immunreaktion bedeuten, da sowohl Monozyten/Makrophagen als auch dendritische Zellen zu den APZ gehören und über T-Zell Interaktionen eine Immunreaktion auszulösen vermögen.

Erkennbar an der Exprimierung von Makrophagen-typischen Markern [40] und der Ausstattung mit Makrophagen ähnlichen Eigenschaften wie der Phagozytose [146, 147], können Mikroglia bewiesenermaßen als die Makrophagen des ZNS bezeichnet werden. Die im ZNS langfristig ansässige Mikroglia wandert während frühkindlicher Entwicklungsstadien, aber zu späteren Zeitpunkten auch in Form von Monozyten aus

4. DISKUSSION

der peripheren Blutzirkulation nach zentral ein und siedelt sich dort an [10, 17, 148, 149]. Unter physiologischen Konditionen verharrt Mikroglia ramifiziert in einem scheinbaren Ruhezustand, wobei sie mit kontinuierlichen Bewegungen ihrer Ramifizierungen permanent den extrazellulären Raum des ZNS-Parenchyms überwachen [100, 150-152]. Im aktivierten Zustand hypertrophieren die Zellkörper der Mikroglia und die Ramifizierungen werden eingefahren [43]. Gleichzeitig zeigen nach zentral aus dem peripheren Blutkreislauf eingewanderte Monozyten die amöboidartige Morphologie auf und bilden im Verlauf Verästelungen aus, so dass sie nichtaktivierter Mikroglia phänotypisch gleichkommen [4]. Interessanterweise konnte anhand der unterschiedlichen Expressierung von CD45 bei langansässiger Mikroglia versus eingewanderten Monozyten ein unterschiedliches immunologisches Potential zwischen den beiden Zellarten festgestellt werden. Erstere besitzen über die verstärkte Expressierung von CD45 eine verminderte Bereitschaft zur Phagozytose und Antigenpräsentation [10, 49, 153, 154]. Unklar ist bisher geblieben, bis zu welchem Funktionsgrad sich die hinzu gewanderten Monozyten in ihren Makrophagen-Eigenschaften im zentralen Milieu angepasst haben.

Speziell für die Unterscheidung von postnatal eingewanderten peripheren Makrophagen und Langzeit-Mikroglia konnte bis heute kein spezifischer Unterscheidungsmarker entdeckt werden [155]. Die multiplen Fortsätze der innerhalb dieser Arbeit in den LK gefundenen MAC-1 positiven Zellen, lassen hypothetisieren, dass es sich hierbei auch um Mikroglia handeln könnte. Insbesondere, da mittels der MAC-1 Färbung eine Unterscheidung zwischen Mikroglia und Monozyten nicht möglich ist, bestände auch die Option, dass Mikroglia die injizierten GFP-Monozyten phagozytierte und im Verlauf in die LK abgewandert ist. Allerdings zeigen sich nicht bloß teilweise grünfluoreszierende Komponenten in den Zellzytoplasmen, sondern es wird ubiquitär und homogen grünes fluoreszierendes Protein in den peripher gefundenen Zellen exprimiert. Außerdem konnte in einer weiteren Studie nachgewiesen werden, dass kultivierte Mikroglia das ZNS nach intrazerebraler Injektion nicht verlässt und direkt in die LK migriert [156], jedoch die zervikalen LK via passiven Transport über das Blut erreicht [157].

Es besteht durchaus die Möglichkeit, dass lokale Faktoren zu den scheinbaren Unterschieden zwischen der früh eingewanderten Mikroglia und der sich neu ansiedelnden Mikroglia (Monozyten) führen. Beide Zelltypen exprimieren zwar die gleichen Makrophagen Marker (MAC-1), jedoch in unterschiedlicher Stärke [154,

158, 159]. Die Fähigkeit der eingewanderten Monozyten zur Abwanderung aus dem ZNS, wie anhand der hier dargestellten Ergebnisse erkennbar, ist höchstwahrscheinlich eine Konsequenz des unterschiedlichen Expressionsniveaus. Letztendlich ist die Migrationsfähigkeit bis hierhin ein wichtiges Unterscheidungsmerkmal zwischen den neu einwandernden Monozyten und den permanent ansässigen Mikroglia im ZNS.

4.2.2. Präsentieren Monozyten zentrale Antigene in der Peripherie?

Bisher wurde davon ausgegangen, dass APZ unter physiologischen Umständen im ZNS unterrepräsentiert sind und dies mitunter Ursache für das Immunprivileg des ZNS ist. Als Folge der Injektion von dendritischen Zellen direkt in das ZNS, ergab sich eine erhöhte Einwanderung von T-Zellen an die zentralen Läsionsstellen [160]. Daraus wird erkennbar, dass bei einem pathologischen Prozess im ZNS, ZNS-assoziierte APZ im folgenden Immunprozess eine essentielle Rolle einnehmen. Dendritische Zellen besitzen zwar aus der Reihe der APZ die höchste Potenz zur Antigenpräsentation, spielen aber im zentralen Nervengewebe im Gegensatz zu einwandernden Monozyten eine untergeordnete Rolle [149].

Mikroglia, als Abkömmlinge der Makrophagen-Familie wurden lange als die einzige APZ des ZNS angesehen [43, 161]. Da sie Makrophagen-typische Antigene exprimieren u.a. MAC-1 und CD-45, nahm man an, sie besäßen die gleichen Eigenschaften. Inzwischen konnte allerdings gezeigt werden, dass Mikroglia nur gering CD-45 exprimieren und als Konsequenz nur schwache APZ Eigenschaften besitzen [158]. Sie könnte daher auch wenn sie in die Peripherie emigrieren würde, die phagozytierten Moleküle nur gering an T-Zellen präsentieren und somit nur eine schwache Immunreaktion auslösen. Die Erkenntnis über die peripheren Monozyten, welche sich den langansässigen Mikroglia hinzufügen, führte zu neuen Spekulationen über die Auswirkung von APZ im ZNS. Im Vergleich zu den funktionsschwachen Mikroglia übernehmen die einwandernden Monozyten/Makrophagen die Hauptrolle der zentralen APZ Funktion.

Wie unter 4.1.1. bereits erwähnt, erreichen Myelin-Antigene nach einem neuroinflammatorischem Prozess die sekundären lymphatischen Organe, mit nachfolgender Wanderung von T-Zellen in das ZNS [136, 139]. Wie genau diese Myelin-Antigene die zervikalen LK erreichen, ist bisher noch unbekannt. Eine

Möglichkeit wäre zumindest, dass die Antigene mittels der Monozyten zu den LK transportiert werden. Somit würden die Monozyten ein wichtiges Glied in der Kette jenes Immunprozesses darstellen, welcher nachfolgend im ZNS zum Untergang von Nervengewebe führen kann.

Die GFP-Monozyten wurden p.i. im Parakortex der LK lokalisiert. In dieser sogenannten T-Zone findet physiologischerweise die Interaktion, z.B. in Form einer Antigenpräsentation, zwischen APZ und T-Zellen statt [136]. Zum letztendlichen Beweis dieses Kreislaufs müssen die gefundenen Zellen auf typische während der Antigenpräsentation vorhandenen Marker untersucht werden.

Die besondere Rolle speziell der tiefen zervikalen LK im Zusammenhang mit dem Immunsystem des ZNS wurde zum ersten Mal 1991 von Yamada et al. erkannt. Hierbei wurde der Abfluß von Albumin aus dem ZNS in tiefe zervikale LK untersucht [86]. Goldmann et al. demonstrierten 2006 für T-Zellen ebenfalls eine Bevorzugung der tiefen zervikalen LK im Rahmen neuroimmunologischer Vorgänge. Die zentrale Bedeutung der zervikalen LK wird auch deutlich durch die Reduktion der EAE nach Entfernung der LK [86, 137, 162].

4.3. Diskussion der Methoden

4.3.1. Reinheit und Überlebensrate

4.3.1.1. Abgrenzung zu dendritischen Zellen

Das primäre Ziel bestand in der Gewinnung von Monozyten in einer höchstmöglichen Reinheit als auch Überlebensrate zur anschließenden intrazerebralen Injektion.

Dafür wurde das Protokoll in mehreren Schritten optimiert. Ein entscheidender Schritt war dabei die magnetische Selektionierung per MACS. Monozyten/Makrophagen exprimieren das CD11b-Antigen. Zu einem geringen Maße wird das CD11b-Antigen ebenfalls auf einer Subspezies von dendritischen Zellen, auf Natürlichen Killerzellen und Granulozyten exprimiert. Für die histologische Untersuchung der LK auf GFP-positiven Monozyten ist der Anteil in der isolierten Zellfraktion der den Monozyten phänotypisch sehr ähnlichen dendritischen Zellen ausschlaggebend. Zum Ausschluss einer Kontamination durch Letzere, wurde eine FACS-Analyse über die CD11c/CD11b-Koexprimierung (Marker für dendritische Zellen) durchgeführt. Generell überstieg der Anteil der CD11b-positiven Zellen mit gleichzeitiger

Exprimierung von CD11c nie einen Prozentsatz von 4 %. Allerdings gehen die Subspezies und die Monozyten entwicklungsstechnisch fließend ineinander über, daher ist eine absolute Grenzsetzung zwischen beiden nicht möglich. In Kultur gehaltene Monozyten differenzieren sich mit Hilfe von Stimulationsfaktoren innerhalb von einigen Tagen in dendritische Zellen. Da in den hier diskutierten Experimenten die Monozyten im Rahmen der Aufreinigung nur 1h in Zellkultur ohne Stimulantien gehalten wurden, ist eine Klassifizierung der injizierten Monozyten als dendritische Zellen pro forma unwahrscheinlich.

4.3.1.2. MACS-Aufreinigung

Der CD11b-Antikörper bedeckt höchstens 30 % des exprimierten Antigens und reagiert mit einer Untereinheit des Cd11b/Cd18-Heterodimers, welcher wiederum als Rezeptor für den Komplementfaktor C3bi fungiert. Die Interaktion des Antikörpers schränkt die Funktionalität der Zelle bewiesenermaßen weder ein, noch führt die MACS-Präparation zu einer Präparationsinduzierten Zellaktivierung.

Beweisführend ist weiterhin, dass die magnetisch markierten Mikropartikel („microbeads“) auch zur Zellselektion für Zellen im Rahmen von anschließenden therapeutischen Maßnahmen eingesetzt wird, bei denen eine volle Zellfunktion unabdingbar ist [125, 126, 163].

4.3.2. ECL und Injektion

Bisher konnte die Einwanderung von peripheren Monozyten in das ZNS mittels transgener Mäuse nachgewiesen werden. Dabei wurde transgenes Knochenmark in Wildtypen transplantiert, so dass die in das ZNS eingewanderten Zellen histologisch unter dem Fluoreszenzmikroskop von den ortsständigen Zellen (v.a. Mikroglia) unterschieden werden konnten. Dadurch, dass im peripheren Kreislauf aufgrund des transgenen Knochenmarks ubiquitär grünleuchtende Zellen vorhanden waren, konnte spezifisch das Schicksal der eingewanderten Zellen im Rahmen der dazugehörigen Experimente nicht weiter verfolgt werden. Jegliche Ansammlung in beispielsweise sekundär lymphatischen Organen hätte nicht auf einen bestimmten Herkunftsort (z.B. ZNS) zurückverfolgt werden können.

4. DISKUSSION

Um trotzdem von diesem Forschungsstandpunkt aus das Schicksal der Monozyten weiter verfolgen zu können, wurde die letzte Ausgangssituation in Form einer Injektion von GFP-Zellen direkt in eine zentrale Läsionsstelle, imitiert.

Die Läsion war eine Voraussetzung für die Imitation eines möglichst realitätsnahen Szenarios. Denn im unlädierten Zustand kam es in vorherigen Versuchsreihen lediglich zu einer Invasion von Monozyten/Makrophagen in die perivaskulären Räume [1]. Erst durch die Anwendung einer intraparenchymalen Läsion erfolgte eine Rekrutierung von Monozyten aus dem peripheren Blutkreislauf in das zentrale Parenchym [17].

Als Läsionsmodell wurde innerhalb der hier angeführten Experimentenreihe die ECL genutzt. Durch die Anwendung von gleichbleibenden Koordinaten zur Läsionsortsetzung entstand eine standardmäßige, reproduzierbare Läsion. Praktisch jegliche Art eines ZNS-Schadens, einschließlich Degenerationen, Tumoren, Infektionen, sowie Autoimmunprozesse implizieren eine signifikante inflammatorische Komponente [164].

Desweiteren stellt die ECL ein Entzündungsmodell mit nachfolgenden neurodegenerativen Prozessen dar. Solche sind auch im sekundären Krankheitsprozess der MS für die Lähmungsprogression verantwortlich.

Eine EAE hätte ein durchaus repräsentatives Modell für chronisch entzündliche Erkrankungen dargestellt. Allerdings würde sich in dem Fall wiederum die Applikation von nachverfolgbaren Zellen als problematisch erweisen. Würde, wie in vorherigen Nachweisen zur Einwanderung von GFP-Zellen in das ZNS hinein, die Applikation von GFP-Zellen über die Schwanzvene erfolgen, könnte nicht ausgeschlossen werden, dass eine eventuelle Wanderung von GFP-Monozyten nur über den Blutweg zustande gekommen sei. Die Applikation von GFP-Zellen per injectionem nach Auslösung einer EAE hat auch den Nachteil, dass die Zellinjektion selbst eine Läsionsstelle mit sich bringt und diese Art der Läsion nicht standardmäßig durchführbar ist und damit nicht die Forderung nach kontrollierbaren Bedingungen erfüllt. Die Lokalisationen der im Rahmen der EAE entstehenden Läsionen sind zudem nicht kontrollierbar bzw. standardmäßig reproduzierbar. Bei Setzen einer ECL entsteht eine standardisiert reproduzierbare Läsion (in welche die Injektionsstelle praktisch versenkt wird) in festgelegten Koordinaten mit berechnetem Ausmaß. Ausserdem wird bei der ECL ein Trakt so geschädigt, dass auch eine

weitere distaler gelegene Läsion ohne Unterbrechung der BBB entsteht (siehe 2.2.8.1.).

Zweitens wäre der Applikationsort nur p.i. nicht ausreichend für das notwendige zu injizierende Volumen, so dass ein Lösungsteil stets schon während der Injektion wieder aus dem ZNS entweichen würde.

4.4. Ausblick

4.4.1. Weiteres Schicksal der injizierten Monozyten

In der hier dargestellten Experimentenreihe wurden pro Versuchstier mindestens 100.000 Zellen intraparenchymal injiziert. Bemerkenswerterweise wurde nur ein Bruchteil von diesen in den LK histologisch wieder entdeckt. Womöglich hat sich ein Teil im Verlauf im ZNS angesiedelt oder ist zwischen dem 10- und 30- Tag der Apoptose unterlegen. Ein anderer Teil verteilte sich vermutlich im peripheren Blutkreislauf, wobei allerdings keine GFP-Monozyten in der Milz detektiert wurden. Aufgrund des Abfalls der Monozyten-Zahl in den zervikalen LK nach 7 Tagen, stellt sich nun die Frage, wie das weitere Schicksal der injizierten Monozyten aussieht. Letzendlich bleibt noch zu klären, ob sie tatsächlich eine Rolle beim Myelintransport aus dem ZNS in die Peripherie spielen und im Verlauf Myelin an T-Zellen präsentieren und somit für eine eventuelle darauffolgende Immunantwort mitverantwortlich sind. Es bleibt nachzuweisen, ob die migrierten Monozyten tatsächlich Myelinbestandteile beinhalten. Außerdem müssten im nächsten Schritt die betroffenen LK auf Immunfaktoren untersucht werden, welche im Rahmen von Antigenpräsentationen nachweisbar sind.

Im Falle einer grösseren Bedeutung der migrierenden Monozyten unter neuropathologischen Bedingungen, wäre gleichfalls für optionale therapeutische Ansatzpunkte die Erforschung von im Verlauf der Migration exprimierten Rezeptoren relevant.

4.4.2. Monozyten in der Magnetresonanztomographie (MRT)

In bisherigen Projekten wurden hauptsächlich histologische Schnitte benutzt um die Abwanderungswege der Monozyten zu detektieren, dafür mussten gleich mehrere

gleichbehandelte Tiere in bestimmten zeitlichen Abständen getötet werden. Außerdem präsentiert ein Tier nur eine zeitliche Momentaufnahme. Um die Wanderung direkt in vivo verfolgen zu können, sollen zunächst in vivo MRT-Verlaufsuntersuchungen durchgeführt werden, bei denen mit einem MRT-Kontrastmittel wie Eisen markierte Monozyten appliziert, und in engem zeitlichen Abstand in einem Tier verfolgt werden. Die sich anschließende gezielte histologische Untersuchung einzelner Tiere wird mit den MRT-Befunden korreliert. Auf diesem Wege könne mehrere zeitliche Momentaufnahmen anhand eines Tieres dargestellt werden, dies reduziert die Anzahl benötigter Tiere und verspricht neue Perspektiven. Für die in vivo MRT-Verlaufsuntersuchungen müssen die Monozyten mit Eisen beladen werden. Das Eisen ist allerdings in zu hohen Mengen bzw. zu hoher Beladungszeit schädlich oder sogar letal für die Zellen, wobei die Letaldosis für jede Zellart unterschiedlich ist. Im weiteren Verlauf sollen die in vivo Detektionen mit der histologischen Untersuchung (unter Verwendung von mit Eisen beladenen GFP-Monozyten) korreliert werden.

4.4.3. Mikroglia

Da nach der intrazerebralen Injektion von kultivierter Mikroglia keine Wanderung in zervikale LK nachweisbar war, erfolgte im Rahmen dieser Versuchsreihe die Injektion von isolierter adulter Mikroglia. Da auch diese sich nach 7 Tagen nicht in den zervikalen LK ansammelte, scheint ortsständige Mikroglia nicht in der Lage zu sein das ZNS zu verlassen.

4.4.4. Seitendifferenzen

Proteine wurden nach unilateraler Injektion in den Nucleus caudatus nur in den ipsilateralen drainierenden zervikalen LK gefunden. Bei Injektion des Proteins in den lateralen Ventrikel, konnte keine bevorzugte Drainage-Seite bezüglich der zervikalen LK nachgewiesen werden. Das weist darauf hin, dass intraparenchymal injizierte Substanzen, die mit der interzellulären Flüssigkeit drainiert werden, sich kaum mit dem Liquorabfluss vermischen [138].

In Anbetracht dessen, könnte zur Unterstützung der Hypothese, dass injizierte GFP-Monozyten nach 7 Tagen mittels aktiver Migration entlang des Parenchyms über die Lamina cribrosa in die Peripherie gelangen und in den ersten Tagen via passivem Liquorabfluss zu den zervikalen LK gelangt sind, eine Untersuchung einer Seitendifferenz bezüglich der Zellquantität nützlich werden.

Dabei würde man bei Zutreffen der Hypothese erwarten, dass zu den ersten Zeitpunkten (12 h, 24 h, 48 h) kein Unterschied zwischen linkem und rechtem LK entdeckt wird. Nach 7 Tagen allerdings sollte sich in den LK auf der Seite der Läsionssetzung eine höhere Anzahl von GFP-Monozyten als auf der rechten, nicht – lädierten Körperhälfte, nachweisen lassen.

4.5. Therapeutische Perspektiven

Monozyten und Makrophagen spielen eine entscheidende Rolle in der Pathogenese autoimmunologischer Krankheiten wie z.B. MS [165].

Die Inhibition von Abkömmlingen der monozytischen Familie im ZNS als auch in der Peripherie stellt somit ein potentiell therapeutisches Ziel im Rahmen zentralinflammatorischer Krankheitsverläufe dar.

Bei Läsionen von peripheren Nerven räumen Makrophagen wachstumshemmende Zelltrümmer ab und tragen so zur Nervenzellregeneration bei [166]. Im Gegensatz dazu wirken Makrophagen in zentralen Nervenschädigungen wie bei MS oder spinalnahen Läsionen wie beim Guillain-Barré-Syndrom, eher als destruktive Effektorzellen [56, 167].

Die langzeitige Blockade von Monozyten durch pharmakodynamische Einflussnahme reduziert den Schweregrad eines zentralnervösen Schadens, erkennbar an der nachfolgenden verminderten Akkumulation von Monozyten und anderen Zellen des ZNS [168]. Die bisherigen Fakten suggerieren, dass, nachdem ein zentraler Immunprozess stattgefunden hat [4, 10], eingewanderte periphere Monozyten Schadensfragmente rund um die Läsionsstelle phagozytieren und diese zu den ZNS-drainierenden, peripheren LK transportieren [169-171]. Somit führen die Zellinteraktionen in den zervikalen LK [136] womöglich zu einer Verstärkung der T-Zellaktivität. Interessanterweise wird diese Annahme durch die Erkenntnis bestätigt, dass die Entnahme der zervikalen LK von zentral lädierten Versuchstieren einen um

4. DISKUSSION

40% reduzierten Schadensausmaß zur Folge hat, aufgrund der fehlenden T-Zellverstärkung [135, 137].

Weiterhin scheint die Antigenpräsentation gegenüber regulatorischen T-Zellen („Treg“) eine wichtige Rolle bei der Prävention autoimmunologischer Prozesse zu spielen, deren Funktion in der Herabregulation einer (Auto-) Immunreaktion besteht. Durch Modulation von APZ (Makrophagen) durch Glatirameracetat (Copolymer-1), stimulieren APZ über Zytokine naive T-Zellen zur Differenzierung in Treg-Zellen. Folglich reduzierte sich die EAE in Mäusen und die Invasion von Leukozyten in das ZNS und damit die Entzündungsreaktion [172].

Die Entdeckung des Migrationsweges von Leukozyten aus dem ZNS hinaus deutet auf die kritische Rolle der aus dem Blut stammenden Zellen bei der postläsionalen Regulation und Regeneration, hin. Vor allem demonstriert die Migration der Monozyten zu peripheren LK, dass die für das ZNS bedeutsame Immunzellaktivität nicht notwendigerweise innerhalb des Gehirns stattfindet. Dadurch ergeben sich neue Ansatzpunkte für zukünftige therapeutische Strategien, mit dem Augenmerk auf in der Peripherie stattfindende Immunprozesse. So könnte das zentrale Nervengewebe umgangen werden, was hinsichtlich der limitierten regenerativen Kapazität des ZNS essentielle Vorteile verspricht [58, 173].

Die zahlreichen Hinweise auf eine aktive Migration der Monozyten in den durchgeführten Experimenten stellen in Aussicht, die damit verbundenen Faktoren in Form von Rezeptoren oder Interleukinen zu erforschen und diese als Ansatzpunkt zur Inhibition der Immunprozesskette zu nutzen.

Insgesamt konnte ein „Proof of principle“ über die Migration von aus dem Blut stammenden Monozyten aus dem ZNS etabliert werden. Die Erkenntnisse um den komplexen und interaktiven Kreislauf zwischen dem ZNS und dem peripheren Immunsystem unter neuropathologischen Umständen sind damit ein Stück weiter gewachsen.

5. LITERATUR

1. Bechmann, I., Priller, J., Kovac, A., Bontert, M., Wehner, T., Klett, F.F., Bohsung, J., Stuschke, M., Dirnagl, U., Nitsch, R. (2001) Immune surveillance of mouse brain perivascular spaces by blood-borne macrophages. *Eur J Neurosci* **14**, 1651-8.
2. Hickey, W.F. (2001) Basic principles of immunological surveillance of the normal central nervous system. *Glia* **36**, 118-24.
3. Bechmann, I., Galea, I., Perry, V.H. (2007) What is the blood-brain barrier (not)? *Trends Immunol* **28**, 5-11.
4. Mutlu, L., Brandt, C., Kwidzinski, E., Sawitzki, B., Gimsa, U., Mahlo, J., Aktas, O., Nitsch, R., van Zwam, M., Laman, J.D., Bechmann, I. (2007) Tolerogenic effect of fiber tract injury: reduced EAE severity following entorhinal cortex lesion. *Exp Brain Res* **178**, 542-53.
5. Hatterer, E., Davoust, N., Didier-Bazes, M., Vuillat, C., Malcus, C., Belin, M.F., Nataf, S. (2006) How to drain without lymphatics? Dendritic cells migrate from the cerebrospinal fluid to the B-cell follicles of cervical lymph nodes. *Blood* **107**, 806-12.
6. Karman, J., Ling, C., Sandor, M., Fabry, Z. (2004) Initiation of immune responses in brain is promoted by local dendritic cells. *J Immunol* **173**, 2353-61.
7. Varol, C., Yona, S., Jung, S. (2009) Origins and tissue-context-dependent fates of blood monocytes. *Immunol Cell Biol* **87**, 30-8.
8. Gordon, S., Taylor, P.R. (2005) Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* **5**, 953-64.
9. Yona, S., Hayhoe, R., Avraham-Davidi, I. (2010) Monocyte and neutrophil isolation and migration assays. *Curr Protoc Immunol* **Chapter 14**, Unit 14 15.
10. Bechmann, I., Goldmann, J., Kovac, A.D., Kwidzinski, E., Simburger, E., Naftolin, F., Dirnagl, U., Nitsch, R., Priller, J. (2005) Circulating monocytic cells infiltrate layers of anterograde axonal degeneration where they transform into microglia. *FASEB J* **19**, 647-9.
11. Gall, C., Rose, G., Lynch, G. (1979) Proliferative and migratory activity of glial cells in the partially deafferented hippocampus. *J Comp Neurol* **183**, 539-49.
12. Jensen, M.B., Gonzalez, B., Castellano, B., Zimmer, J. (1994) 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* **98**, 245-60.
13. Charo, I.F., Ransohoff, R.M. (2006) The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N Engl J Med* **354**, 610-21.
14. Hailer, N.P., Grampp, A., Nitsch, R. (1999) Proliferation of microglia and astrocytes in the dentate gyrus following entorhinal cortex lesion: a quantitative bromodeoxyuridine-labelling study. *Eur J Neurosci* **11**, 3359-64.
15. Gehrman, J., Schoen, S.W., Kreutzberg, G.W. (1991) Lesion of the rat entorhinal cortex leads to a rapid microglial reaction in the dentate gyrus. A light and electron microscopical study. *Acta Neuropathol* **82**, 442-55.
16. Jensen, M.B., Finsen, B., Zimmer, J. (1997) Morphological and immunophenotypic microglial changes in the denervated fascia dentata of adult rats: correlation with blood-brain barrier damage and astroglial reactions. *Exp Neurol* **143**, 103-16.
17. Priller, J., Flugel, A., Wehner, T., Boentert, M., Haas, C.A., Prinz, M., Fernandez-Klett, F., Prass, K., Bechmann, I., de Boer, B.A., Frotscher, M.,

5. LITERATUR

- Kreutzberg, G.W., Persons, D.A., Dirnagl, U. (2001) Targeting gene-modified hematopoietic cells to the central nervous system: use of green fluorescent protein uncovers microglial engraftment. *Nat Med* **7**, 1356-61.
18. Bechmann, I., Nitsch, R. (1997) Astrocytes and microglial cells incorporate degenerating fibers following entorhinal lesion: a light, confocal, and electron microscopical study using a phagocytosis-dependent labeling technique. *Glia* **20**, 145-54.
 19. Bechmann, I., Lossau, S., Steiner, B., Mor, G., Gimsa, U., Nitsch, R. (2000) Reactive astrocytes upregulate Fas (CD95) and Fas ligand (CD95L) expression but do not undergo programmed cell death during the course of anterograde degeneration. *Glia* **32**, 25-41.
 20. Broadwell, R.D., Baker, B.J., Ebert, P.S., Hickey, W.F. (1994) Allografts of CNS tissue possess a blood-brain barrier: III. Neuropathological, methodological, and immunological considerations. *Microsc Res Tech* **27**, 471-94.
 21. Cserr, H.F., Knopf, P.M. (1992) Cervical lymphatics, the blood-brain barrier and the immunoreactivity of the brain: a new view. *Immunol Today* **13**, 507-12.
 22. Weller, R.O. (1974) Mechanisms of cerebrospinal fluid absorption. *Dev Med Child Neurol* **16**, 85-7.
 23. Boulton, M., Flessner, M., Armstrong, D., Mohamed, R., Hay, J., Johnston, M. (1999) Contribution of extracranial lymphatics and arachnoid villi to the clearance of a CSF tracer in the rat. *Am J Physiol* **276**, R818-23.
 24. Harling-Berg, C.J., Park, T.J., Knopf, P.M. (1999) Role of the cervical lymphatics in the Th2-type hierarchy of CNS immune regulation. *J Neuroimmunol* **101**, 111-27.
 25. Goldmann, J., Kwidzinski, E., Brandt, C., Mahlo, J., Richter, D., Bechmann, I. (2006) T cells traffic from brain to cervical lymph nodes via the cribroid plate and the nasal mucosa. *J Leukoc Biol* **80**, 797-801.
 26. Kovac, A.D., Kwidzinski, E., Heimrich, B., Bittigau, P., Deller, T., Nitsch, R., Bechmann, I. (2004) Entorhinal cortex lesion in the mouse induces transsynaptic death of perforant path target neurons. *Brain Pathol* **14**, 249-57.
 27. Dissing-Olesen, L., Ladeby, R., Nielsen, H.H., Toft-Hansen, H., Dalmau, I., Finsen, B. (2007) Axonal lesion-induced microglial proliferation and microglial cluster formation in the mouse. *Neuroscience* **149**, 112-22.
 28. Wirenfeldt, M., Babcock, A.A., Ladeby, R., Lambertsen, K.L., Dagnaes-Hansen, F., Leslie, R.G., Owens, T., Finsen, B. (2005) Reactive microgliosis engages distinct responses by microglial subpopulations after minor central nervous system injury. *J Neurosci Res* **82**, 507-14.
 29. Böcker, W. (2008) *Pathologie*. Elsevier, Urban & Fischer, München.
 30. Schmetzer, O. (2009) *Immunologie*. Elsevier.
 31. Antonio Pezzutto, T.U., Gerd-Rüdiger Burmester (2006) *Taschenatlas der Immunologie*. Thieme.
 32. Zinkernagel, R.M., Doherty, P.C. (1997) The discovery of MHC restriction. *Immunol Today* **18**, 14-7.
 33. Goodnow, C.C., Sprent, J., Fazekas de St Groth, B., Vinuesa, C.G. (2005) Cellular and genetic mechanisms of self tolerance and autoimmunity. *Nature* **435**, 590-7.
 34. Antonio Pezzutto, T.U., Gerd-Rüdiger Burmester (2006) *Immunologie*. Thieme.
 35. Volkman, A., Gowans, J.L. (1965) The Origin of Macrophages from Bone Marrow in the Rat. *Br J Exp Pathol* **46**, 62-70.

36. Yona, S., Jung, S. Monocytes: subsets, origins, fates and functions. *Curr Opin Hematol* **17**, 53-9.
37. Hickey, W.F. (1999) Leukocyte traffic in the central nervous system: the participants and their roles. *Semin Immunol* **11**, 125-37.
38. Hickey, W.F., Vass, K., Lassmann, H. (1992) Bone marrow-derived elements in the central nervous system: an immunohistochemical and ultrastructural survey of rat chimeras. *J Neuropathol Exp Neurol* **51**, 246-56.
39. Imai, F., Sawada, M., Suzuki, H., Kiya, N., Hayakawa, M., Nagatsu, T., Marunouchi, T., Kanno, T. (1997) Migration activity of microglia and macrophages into rat brain. *Neurosci Lett* **237**, 49-52.
40. Carson, M.J., Thrash, J.C., Lo, D. (2004) Analysis of microglial gene expression: identifying targets for CNS neurodegenerative and autoimmune disease. *Am J Pharmacogenomics* **4**, 321-30.
41. Graeber MB, B.W., Kreutzberg GW (2002) *Cellular pathology of the central nervous system*. Edward Arnold, London.
42. Carson, M.J., Bilousova, T.V., Puntambekar, S.S., Melchior, B., Doose, J.M., Ethell, I.M. (2007) A rose by any other name? The potential consequences of microglial heterogeneity during CNS health and disease. *Neurotherapeutics* **4**, 571-9.
43. Kreutzberg, G.W. (1996) Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci* **19**, 312-8.
44. Simard, A.R., Soulet, D., Gowing, G., Julien, J.P., Rivest, S. (2006) Bone marrow-derived microglia play a critical role in restricting senile plaque formation in Alzheimer's disease. *Neuron* **49**, 489-502.
45. Bell, M.D., Taub, D.D., Perry, V.H. (1996) Overriding the brain's intrinsic resistance to leukocyte recruitment with intraparenchymal injections of recombinant chemokines. *Neuroscience* **74**, 283-92.
46. Matyszak, M.K., Townsend, M.J., Perry, V.H. (1997) Ultrastructural studies of an immune-mediated inflammatory response in the CNS parenchyma directed against a non-CNS antigen. *Neuroscience* **78**, 549-60.
47. Carson, M.J., Sutcliffe, J.G. (1999) Balancing function vs. self defense: the CNS as an active regulator of immune responses. *J Neurosci Res* **55**, 1-8.
48. Vallieres, L., Sawchenko, P.E. (2003) Bone marrow-derived cells that populate the adult mouse brain preserve their hematopoietic identity. *J Neurosci* **23**, 5197-207.
49. Bechmann, I. (2005) Failed central nervous system regeneration: a downside of immune privilege? *Neuromolecular Med* **7**, 217-28.
50. Graeber, M.B., Streit, W.J. Microglia: biology and pathology. *Acta Neuropathol* **119**, 89-105.
51. Lüllmann-Rauch, R. (2009) *Histologie*. Thieme, Stuttgart.
52. Sainte-Marie, G. The lymph node revisited: development, morphology, functioning, and role in triggering primary immune responses. *Anat Rec (Hoboken)* **293**, 320-37.
53. Trepel, M. (2008) *Neuroanatomie*. Elsevier, Urban & Fischer, München.
54. Steinman, L. (1996) Multiple sclerosis: a coordinated immunological attack against myelin in the central nervous system. *Cell* **85**, 299-302.
55. Traugott, U., Scheinberg, L.C., Raine, C.S. (1982) Multiple sclerosis: heterology among early T cells and Tg cells. *Ann Neurol* **11**, 182-6.
56. Barnett, M.H., Henderson, A.P., Prineas, J.W. (2006) The macrophage in MS: just a scavenger after all? Pathology and pathogenesis of the acute MS lesion. *Mult Scler* **12**, 121-32.

57. Wucherpfennig, K.W., Strominger, J.L. (1995) Molecular mimicry in T cell-mediated autoimmunity: viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein. *Cell* **80**, 695-705.
58. Rezai-Zadeh, K., Gate, D., Town, T. (2009) CNS infiltration of peripheral immune cells: D-Day for neurodegenerative disease? *J Neuroimmune Pharmacol* **4**, 462-75.
59. Lassmann, H., Bruck, W., Lucchinetti, C.F. (2007) The immunopathology of multiple sclerosis: an overview. *Brain Pathol* **17**, 210-8.
60. Niino, M., Sasaki, H. Update on the treatment options for multiple sclerosis. *Expert Rev Clin Immunol* **6**, 77-88.
61. Comi, G. (2009) Treatment of multiple sclerosis: role of natalizumab. *Neurol Sci* **30 Suppl 2**, S155-8.
62. Billingham, R.E., Boswell, T. (1953) Studies on the problem of corneal homografts. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **141**, 392-406.
63. Medawar, P.B. (1948) Immunity to homologous grafted skin; the fate of skin homografts transplanted to the brain, to subcutaneous tissue, and to the anterior chamber of the eye. *Br J Exp Pathol* **29**, 58-69.
64. Matyszak, M.K., Perry, V.H. (1995) Demyelination in the central nervous system following a delayed-type hypersensitivity response to bacillus Calmette-Guerin. *Neuroscience* **64**, 967-77.
65. Stevenson, P.G., Hawke, S., Sloan, D.J., Bangham, C.R. (1997) The immunogenicity of intracerebral virus infection depends on anatomical site. *J Virol* **71**, 145-51.
66. Byrnes, A.P., MacLaren, R.E., Charlton, H.M. (1996) Immunological instability of persistent adenovirus vectors in the brain: peripheral exposure to vector leads to renewed inflammation, reduced gene expression, and demyelination. *J Neurosci* **16**, 3045-55.
67. Murphy, J.B., Sturm, E. (1923) Conditions Determining the Transplantability of Tissues in the Brain. *J Exp Med* **38**, 183-197.
68. Bechmann, I., Mor, G., Nilsen, J., Eliza, M., Nitsch, R., Naftolin, F. (1999) FasL (CD95L, Apo1L) is expressed in the normal rat and human brain: evidence for the existence of an immunological brain barrier. *Glia* **27**, 62-74.
69. Hauser, S.L., Bhan, A.K., Gilles, F.H., Hoban, C.J., Reinherz, E.L., Schlossman, S.F., Weiner, H.L. (1983) Immunohistochemical staining of human brain with monoclonal antibodies that identify lymphocytes, monocytes, and the Ia antigen. *J Neuroimmunol* **5**, 197-205.
70. Hickey, W.F., Kimura, H. (1987) Graft-vs.-host disease elicits expression of class I and class II histocompatibility antigens and the presence of scattered T lymphocytes in rat central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 2082-6.
71. Hickey, W.F., Osborn, J.P., Kirby, W.M. (1985) Expression of Ia molecules by astrocytes during acute experimental allergic encephalomyelitis in the Lewis rat. *Cell Immunol* **91**, 528-35.
72. Lawson, L.J., Perry, V.H., Gordon, S. (1992) Turnover of resident microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience* **48**, 405-15.
73. Lassmann, H., Schmied, M., Vass, K., Hickey, W.F. (1993) Bone marrow derived elements and resident microglia in brain inflammation. *Glia* **7**, 19-24.
74. Shrikant, P., Benveniste, E.N. (1996) The central nervous system as an immunocompetent organ: role of glial cells in antigen presentation. *J Immunol* **157**, 1819-22.

5. LITERATUR

75. Taylor, A.W., Streilein, J.W. (1996) Inhibition of antigen-stimulated effector T cells by human cerebrospinal fluid. *Neuroimmunomodulation* **3**, 112-8.
76. Liu, Y., Teige, I., Birnir, B., Issazadeh-Navikas, S. (2006) Neuron-mediated generation of regulatory T cells from encephalitogenic T cells suppresses EAE. *Nat Med* **12**, 518-25.
77. Meinl, E., Aloisi, F., Ertl, B., Weber, F., de Waal Malefyt, R., Wekerle, H., Hohlfeld, R. (1994) Multiple sclerosis. Immunomodulatory effects of human astrocytes on T cells. *Brain* **117 (Pt 6)**, 1323-32.
78. 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. (2004) Astrocyte-induced regulatory T cells mitigate CNS autoimmunity. *Glia* **47**, 168-79.
79. Magnus, T., Schreiner, B., Korn, T., Jack, C., Guo, H., Antel, J., Ifergan, I., Chen, L., Bischof, F., Bar-Or, A., Wiendl, H. (2005) Microglial expression of the B7 family member B7 homolog 1 confers strong immune inhibition: implications for immune responses and autoimmunity in the CNS. *J Neurosci* **25**, 2537-46.
80. Bart, J., Groen, H.J., Hendrikse, N.H., van der Graaf, W.T., Vaalburg, W., de Vries, E.G. (2000) The blood-brain barrier and oncology: new insights into function and modulation. *Cancer Treat Rev* **26**, 449-62.
81. Raine, C.S., Cannella, B., Duijvestijn, A.M., Cross, A.H. (1990) Homing to central nervous system vasculature by antigen-specific lymphocytes. II. Lymphocyte/endothelial cell adhesion during the initial stages of autoimmune demyelination. *Lab Invest* **63**, 476-89.
82. Wolburg, H., Wolburg-Buchholz, K., Engelhardt, B. (2005) Diapedesis of mononuclear cells across cerebral venules during experimental autoimmune encephalomyelitis leaves tight junctions intact. *Acta Neuropathol* **109**, 181-90.
83. Cserr, H.F., Harling-Berg, C.J., Knopf, P.M. (1992) Drainage of brain extracellular fluid into blood and deep cervical lymph and its immunological significance. *Brain Pathol* **2**, 269-76.
84. Bradbury, M.W., Cole, D.F. (1980) The role of the lymphatic system in drainage of cerebrospinal fluid and aqueous humour. *J Physiol* **299**, 353-65.
85. Widner, H., Jonsson, B.A., Hallstadius, L., Wingardh, K., Strand, S.E., Johansson, B.B. (1987) Scintigraphic method to quantify the passage from brain parenchyma to the deep cervical lymph nodes in rats. *Eur J Nucl Med* **13**, 456-61.
86. Yamada, S., DePasquale, M., Patlak, C.S., Cserr, H.F. (1991) Albumin outflow into deep cervical lymph from different regions of rabbit brain. *Am J Physiol* **261**, H1197-204.
87. Harling-Berg, C.J., Knopf, P.M., Cserr, H.F. (1991) Myelin basic protein infused into cerebrospinal fluid suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* **35**, 45-51.
88. Dickstein, J.B., Moldofsky, H., Hay, J.B. (2000) Brain-blood permeability: TNF- α promotes escape of protein tracer from CSF to blood. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **279**, R148-51.
89. Sakic, B., Szechtman, H., Denburg, J.A. (1997) Neurobehavioral alterations in autoimmune mice. *Neurosci Biobehav Rev* **21**, 327-40.
90. Yeager, M.P., DeLeo, J.A., Hoopes, P.J., Hartov, A., Hildebrandt, L., Hickey, W.F. (2000) Trauma and inflammation modulate lymphocyte localization in vivo: quantitation of tissue entry and retention using indium-111-labeled lymphocytes. *Crit Care Med* **28**, 1477-82.

5. LITERATUR

91. Flugel, A., Willem, M., Berkowicz, T., Wekerle, H. (1999) Gene transfer into CD4⁺ T lymphocytes: green fluorescent protein-engineered, encephalitogenic T cells illuminate brain autoimmune responses. *Nat Med* **5**, 843-7.
92. Hickey, W.F., Hsu, B.L., Kimura, H. (1991) T-lymphocyte entry into the central nervous system. *J Neurosci Res* **28**, 254-60.
93. Town, T., Bai, F., Wang, T., Kaplan, A.T., Qian, F., Montgomery, R.R., Anderson, J.F., Flavell, R.A., Fikrig, E. (2009) Toll-like receptor 7 mitigates lethal West Nile encephalitis via interleukin 23-dependent immune cell infiltration and homing. *Immunity* **30**, 242-53.
94. Finberg, R.W., Wang, J.P. (2009) Antiviral responses: different roles for different tolls. *Immunity* **30**, 173-5.
95. Matyszak, M.K., Perry, V.H. (1998) Bacillus Calmette-Guerin sequestered in the brain parenchyma escapes immune recognition. *J Neuroimmunol* **82**, 73-80.
96. Scheinberg, L.C., Kotsilimbas, D.G., Karpf, R., Mayer, N. (1966) Is the brain "an immunologically privileged site"? 3. Studies based on homologous skin grafts to the brain and subcutaneous tissues. *Arch Neurol* **15**, 62-7.
97. Bradbury, M.W., Cserr, H.F., Westrop, R.J. (1981) Drainage of cerebral interstitial fluid into deep cervical lymph of the rabbit. *Am J Physiol* **240**, F329-36.
98. Harling-Berg, C., Knopf, P.M., Merriam, J., Cserr, H.F. (1989) Role of cervical lymph nodes in the systemic humoral immune response to human serum albumin microinfused into rat cerebrospinal fluid. *J Neuroimmunol* **25**, 185-93.
99. Joly, S., Francke, M., Ulbricht, E., Beck, S., Seeliger, M., Hirrlinger, P., Hirrlinger, J., Lang, K.S., Zinkernagel, M., Odermatt, B., Samaradzija, M., Reichenbach, A., Grimm, C., Reme, C.E. (2009) Cooperative phagocytes: resident microglia and bone marrow immigrants remove dead photoreceptors in retinal lesions. *Am J Pathol* **174**, 2310-23.
100. Wake, H., Moorhouse, A.J., Jinno, S., Kohsaka, S., Nabekura, J. (2009) Resting microglia directly monitor the functional state of synapses in vivo and determine the fate of ischemic terminals. *J Neurosci* **29**, 3974-80.
101. Zhang, Z., Artelt, M., Burnet, M., Trautmann, K., Schluesener, H.J. (2006) Early infiltration of CD8⁺ macrophages/microglia to lesions of rat traumatic brain injury. *Neuroscience* **141**, 637-44.
102. Zhang, J., Shi, X.Q., Echeverry, S., Mogil, J.S., De Koninck, Y., Rivest, S. (2007) Expression of CCR2 in both resident and bone marrow-derived microglia plays a critical role in neuropathic pain. *J Neurosci* **27**, 12396-406.
103. Flugel, A., Bradl, M., Kreutzberg, G.W., Graeber, M.B. (2001) Transformation of donor-derived bone marrow precursors into host microglia during autoimmune CNS inflammation and during the retrograde response to axotomy. *J Neurosci Res* **66**, 74-82.
104. Flugel, A., Matsumuro, K., Neumann, H., Klinkert, W.E., Birnbacher, R., Lassmann, H., Otten, U., Wekerle, H. (2001) Anti-inflammatory activity of nerve growth factor in experimental autoimmune encephalomyelitis: inhibition of monocyte transendothelial migration. *Eur J Immunol* **31**, 11-22.
105. Kosel, S., Egensperger, R., Bise, K., Arbogast, S., Mehraein, P., Graeber, M.B. (1997) Long-lasting perivascular accumulation of major histocompatibility complex class II-positive lipophages in the spinal cord of stroke patients: possible relevance for the immune privilege of the brain. *Acta Neuropathol* **94**, 532-8.

5. LITERATUR

106. Schonrock, L.M., Kuhlmann, T., Adler, S., Bitsch, A., Bruck, W. (1998) Identification of glial cell proliferation in early multiple sclerosis lesions. *Neuropathol Appl Neurobiol* **24**, 320-30.
107. Kawanokuchi, J., Shimizu, K., Nitta, A., Yamada, K., Mizuno, T., Takeuchi, H., Suzumura, A. (2008) Production and functions of IL-17 in microglia. *J Neuroimmunol* **194**, 54-61.
108. Raivich, G., Banati, R. (2004) 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* **46**, 261-81.
109. Boyle, E.A., McGeer, P.L. (1990) Cellular immune response in multiple sclerosis plaques. *Am J Pathol* **137**, 575-84.
110. Hickey, W.F., Kimura, H. (1988) Perivascular microglial cells of the CNS are bone marrow-derived and present antigen in vivo. *Science* **239**, 290-2.
111. Fischer, H.G., Reichmann, G. (2001) Brain dendritic cells and macrophages/microglia in central nervous system inflammation. *J Immunol* **166**, 2717-26.
112. Laman, J.D., van Meurs, M., Schellekens, M.M., de Boer, M., Melchers, B., Massacesi, L., Lassmann, H., Claassen, E., Hart, B.A. (1998) Expression of accessory molecules and cytokines in acute EAE in marmoset monkeys (*Callithrix jacchus*). *J Neuroimmunol* **86**, 30-45.
113. Ajami, B., Bennett, J.L., Krieger, C., Tetzlaff, W., Rossi, F.M. (2007) Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life. *Nat Neurosci* **10**, 1538-43.
114. Mildner, A., Schmidt, H., Nitsche, M., Merkler, D., Hanisch, U.K., Mack, M., Heikenwalder, M., Bruck, W., Priller, J., Prinz, M. (2007) Microglia in the adult brain arise from Ly-6ChiCCR2+ monocytes only under defined host conditions. *Nat Neurosci* **10**, 1544-53.
115. Koutsilieris, E., Scheller, C., Tribl, F., Riederer, P. (2002) Degeneration of neuronal cells due to oxidative stress--microglial contribution. *Parkinsonism Relat Disord* **8**, 401-6.
116. Hansson, E., Ronnback, L. (2003) Glial neuronal signaling in the central nervous system. *FASEB J* **17**, 341-8.
117. Ramlackhansingh, A.F., Brooks, D.J., Greenwood, R.J., Bose, S.K., Turkheimer, F.E., Kinnunen, K.M., Gentleman, S., Heckemann, R.A., Gunanayagam, K., Gelosa, G., Sharp, D.J. Inflammation after trauma: microglial activation and traumatic brain injury. *Ann Neurol* **70**, 374-83.
118. Prinz, M., Priller, J., Sisodia, S.S., Ransohoff, R.M. Heterogeneity of CNS myeloid cells and their roles in neurodegeneration. *Nat Neurosci* **14**, 1227-35.
119. Frotscher, M., Heimrich, B., Deller, T. (1997) Sprouting in the hippocampus is layer-specific. *Trends Neurosci* **20**, 218-23.
120. Lynch, G., Matthews, D.A., Mosko, S., Parks, T., Cotman, C. (1972) Induced acetylcholinesterase-rich layer in rat dentate gyrus following entorhinal lesions. *Brain Res* **42**, 311-8.
121. Lynch, G., Deadwyler, S., Cotman, G. (1973) Postlesion axonal growth produces permanent functional connections. *Science* **180**, 1364-6.
122. Deller, T., Frotscher, M. (1997) Lesion-induced plasticity of central neurons: sprouting of single fibres in the rat hippocampus after unilateral entorhinal cortex lesion. *Prog Neurobiol* **53**, 687-727.
123. Bechmann, I., Nitsch, R. (2001) Plasticity following lesion: help and harm from the immune system. *Restor Neurol Neurosci* **19**, 189-98.

5. LITERATUR

124. Okabe, M., Ikawa, M., Kominami, K., Nakanishi, T., Nishimune, Y. (1997) 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Lett* **407**, 313-9.
125. Miltenyi, S., Muller, W., Weichel, W., Radbruch, A. (1990) High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry* **11**, 231-8.
126. Radbruch, A., Mechtold, B., Thiel, A., Miltenyi, S., Pfluger, E. (1994) High-gradient magnetic cell sorting. *Methods Cell Biol* **42 Pt B**, 387-403.
127. Philpott, N.J., Turner, A.J., Scopes, J., Westby, M., Marsh, J.C., Gordon-Smith, E.C., Dalgleish, A.G., Gibson, F.M. (1996) The use of 7-amino actinomycin D in identifying apoptosis: simplicity of use and broad spectrum of application compared with other techniques. *Blood* **87**, 2244-51.
128. Gill, J.E., Jotz, M.M., Young, S.G., Modest, E.J., Sengupta, S.K. (1975) 7-Amino-actinomycin D as a cytochemical probe. I. Spectral properties. *J Histochem Cytochem* **23**, 793-9.
129. Stroh, A., Zimmer, C., Werner, N., Gertz, K., Weir, K., Kronenberg, G., Steinbrink, J., Mueller, S., Sieland, K., Dirnagl, U., Nickenig, G., Endres, M. (2006) Tracking of systemically administered mononuclear cells in the ischemic brain by high-field magnetic resonance imaging. *Neuroimage* **33**, 886-97.
130. Kobelt, P., Tebbe, J.J., Tjandra, I., Bae, H.G., Ruter, J., Klapp, B.F., Wiedenmann, B., Monnikes, H. (2004) Two immunocytochemical protocols for immunofluorescent detection of c-Fos positive neurons in the rat brain. *Brain Res Brain Res Protoc* **13**, 45-52.
131. Drevets, D.A., Dillon, M.J., Schawang, J.S., Van Rooijen, N., Ehrchen, J., Sunderkotter, C., Leenen, P.J. (2004) The Ly-6Chigh monocyte subpopulation transports *Listeria monocytogenes* into the brain during systemic infection of mice. *J Immunol* **172**, 4418-24.
132. Sunderkotter, C., Nikolic, T., Dillon, M.J., Van Rooijen, N., Stehling, M., Drevets, D.A., Leenen, P.J. (2004) Subpopulations of mouse blood monocytes differ in maturation stage and inflammatory response. *J Immunol* **172**, 4410-7.
133. Cserr, H.F., DePasquale, M., Harling-Berg, C.J., Park, J.T., Knopf, P.M. (1992) Afferent and efferent arms of the humoral immune response to CSF-administered albumins in a rat model with normal blood-brain barrier permeability. *J Neuroimmunol* **41**, 195-202.
134. Weller, R.O., Galea, I., Carare, R.O., Minagar, A. Pathophysiology of the lymphatic drainage of the central nervous system: Implications for pathogenesis and therapy of multiple sclerosis. *Pathophysiology* **17**, 295-306.
135. Phillips, M.J., Needham, M., Weller, R.O. (1997) Role of cervical lymph nodes in autoimmune encephalomyelitis in the Lewis rat. *J Pathol* **182**, 457-64.
136. de Vos, A.F., van Meurs, M., Brok, H.P., Boven, L.A., Hintzen, R.Q., van der Valk, P., Ravid, R., Rensing, S., Boon, L., t Hart, B.A., Laman, J.D. (2002) Transfer of central nervous system autoantigens and presentation in secondary lymphoid organs. *J Immunol* **169**, 5415-23.
137. van Zwam, M., Huizinga, R., Heijmans, N., van Meurs, M., Wierenga-Wolf, A.F., Melief, M.J., Hintzen, R.Q., t Hart, B.A., Amor, S., Boven, L.A., Laman, J.D. (2009) Surgical excision of CNS-draining lymph nodes reduces relapse severity in chronic-relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Pathol* **217**, 543-51.
138. Hatterer, E., Touret, M., Belin, M.F., Honnorat, J., Nataf, S. (2008) Cerebrospinal fluid dendritic cells infiltrate the brain parenchyma and target the cervical lymph nodes under neuroinflammatory conditions. *PLoS One* **3**, e3321.

5. LITERATUR

139. Fabriek, B.O., Zwemmer, J.N., Teunissen, C.E., Dijkstra, C.D., Polman, C.H., Laman, J.D., Castelijns, J.A. (2005) In vivo detection of myelin proteins in cervical lymph nodes of MS patients using ultrasound-guided fine-needle aspiration cytology. *J Neuroimmunol* **161**, 190-4.
140. Gordon, L.B., Knopf, P.M., Cserr, H.F. (1992) Ovalbumin is more immunogenic when introduced into brain or cerebrospinal fluid than into extracerebral sites. *J Neuroimmunol* **40**, 81-7.
141. Ling, C., Sandor, M., Fabry, Z. (2003) In situ processing and distribution of intracerebrally injected OVA in the CNS. *J Neuroimmunol* **141**, 90-8.
142. Oehmichen, M., Gruninger, H., Wietholter, H., Gencic, M. (1979) Lymphatic efflux of intracerebrally injected cells. *Acta Neuropathol* **45**, 61-5.
143. Randolph, G.J., Beaulieu, S., Lebecque, S., Steinman, R.M., Muller, W.A. (1998) Differentiation of monocytes into dendritic cells in a model of transendothelial trafficking. *Science* **282**, 480-3.
144. Auffray, C., Sieweke, M.H., Geissmann, F. (2009) Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu Rev Immunol* **27**, 669-92.
145. Geissmann, F., Manz, M.G., Jung, S., Sieweke, M.H., Merad, M., Ley, K. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science* **327**, 656-61.
146. Perry, V.H., Gordon, S. (1988) Macrophages and microglia in the nervous system. *Trends Neurosci* **11**, 273-7.
147. Caldero, J., Brunet, N., Ciutat, D., Hereu, M., Esquerda, J.E. (2009) Development of microglia in the chick embryo spinal cord: implications in the regulation of motoneuronal survival and death. *J Neurosci Res* **87**, 2447-66.
148. Davoust, N., Vuillat, C., Androdias, G., Nataf, S. (2008) From bone marrow to microglia: barriers and avenues. *Trends Immunol* **29**, 227-34.
149. Greter, M., Heppner, F.L., Lemos, M.P., Odermatt, B.M., Goebels, N., Laufer, T., Noelle, R.J., Becher, B. (2005) Dendritic cells permit immune invasion of the CNS in an animal model of multiple sclerosis. *Nat Med* **11**, 328-34.
150. Raivich, G. (2005) Like cops on the beat: the active role of resting microglia. *Trends Neurosci* **28**, 571-3.
151. Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., Helmchen, F. (2005) Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* **308**, 1314-8.
152. Davalos, D., Grutzendler, J., Yang, G., Kim, J.V., Zuo, Y., Jung, S., Littman, D.R., Dustin, M.L., Gan, W.B. (2005) ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat Neurosci* **8**, 752-8.
153. Hirschberg, D.L., Schwartz, M. (1995) Macrophage recruitment to acutely injured central nervous system is inhibited by a resident factor: a basis for an immune-brain barrier. *J Neuroimmunol* **61**, 89-96.
154. Carson, M.J., Reilly, C.R., Sutcliffe, J.G., Lo, D. (1998) Mature microglia resemble immature antigen-presenting cells. *Glia* **22**, 72-85.
155. Schmid, C.D., Melchior, B., Masek, K., Puntambekar, S.S., Danielson, P.E., Lo, D.D., Sutcliffe, J.G., Carson, M.J. (2009) Differential gene expression in LPS/IFN γ activated microglia and macrophages: in vitro versus in vivo. *J Neurochem* **109 Suppl 1**, 117-25.
156. Melchior, B., Puntambekar, S.S., Carson, M.J. (2006) Microglia and the control of autoreactive T cell responses. *Neurochem Int* **49**, 145-53.
157. Hochmeister, S., Zeitelhofer, M., Bauer, J., Nicolussi, E.M., Fischer, M.T., Heinke, B., Selzer, E., Lassmann, H., Bradl, M. (2008) After injection into the striatum, in vitro-differentiated microglia- and bone marrow-derived dendritic

- cells can leave the central nervous system via the blood stream. *Am J Pathol* **173**, 1669-81.
158. Sedgwick, J.D., Schwender, S., Imrich, H., Dorries, R., Butcher, G.W., ter Meulen, V. (1991) Isolation and direct characterization of resident microglial cells from the normal and inflamed central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 7438-42.
 159. Becher, B., Fedorowicz, V., Antel, J.P. (1996) Regulation of CD14 expression on human adult central nervous system-derived microglia. *J Neurosci Res* **45**, 375-81.
 160. Carson, M.J., Reilly, C.R., Sutcliffe, J.G., Lo, D. (1999) Disproportionate recruitment of CD8+ T cells into the central nervous system by professional antigen-presenting cells. *Am J Pathol* **154**, 481-94.
 161. Perry, V.H., Andersson, P.B., Gordon, S. (1993) Macrophages and inflammation in the central nervous system. *Trends Neurosci* **16**, 268-73.
 162. Weller, R.O., Phillips, M.J., Kida, S., Zhang, E.T. (1997) [Immunologic significance of lymphatic drainage of the brain]. *Bull Acad Natl Med* **181**, 661-7; discussion 667-71.
 163. Braakman, E., Schuurhuis, G.J., Preijers, F.W., Voermans, C., Theunissen, K., van Riet, I., Fibbe, W.E., Slaper-Cortenbach, I. (2008) Evaluation of 'out-of-specification' CliniMACS CD34-selection procedures of hematopoietic progenitor cell-apheresis products. *Cytotherapy* **10**, 83-9.
 164. Becher, B., Bechmann, I., Greter, M. (2006) Antigen presentation in autoimmunity and CNS inflammation: how T lymphocytes recognize the brain. *J Mol Med* **84**, 532-43.
 165. Izikson, L., Klein, R.S., Luster, A.D., Weiner, H.L. (2002) Targeting monocyte recruitment in CNS autoimmune disease. *Clin Immunol* **103**, 125-31.
 166. Bruck, W. (1997) The role of macrophages in Wallerian degeneration. *Brain Pathol* **7**, 741-52.
 167. Kiefer, R., Kieseier, B.C., Stoll, G., Hartung, H.P. (2001) The role of macrophages in immune-mediated damage to the peripheral nervous system. *Prog Neurobiol* **64**, 109-27.
 168. Wang, Y., Cui, L., Gonsiorek, W., Min, S.H., Anilkumar, G., Rosenblum, S., Kozlowski, J., Lundell, D., Fine, J.S., Grant, E.P. (2009) CCR2 and CXCR4 regulate peripheral blood monocyte pharmacodynamics and link to efficacy in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Inflamm (Lond)* **6**, 32.
 169. Gimsa, U., Peter, S.V., Lehmann, K., Bechmann, I., Nitsch, R. (2000) Axonal damage induced by invading T cells in organotypic central nervous system tissue in vitro: involvement of microglial cells. *Brain Pathol* **10**, 365-77.
 170. Bechmann, I., Nitsch, R. (2000) Involvement of non-neuronal cells in entorhinal-hippocampal reorganization following lesions. *Ann N Y Acad Sci* **911**, 192-206.
 171. Buss, A., Schwab, M.E. (2003) Sequential loss of myelin proteins during Wallerian degeneration in the rat spinal cord. *Glia* **42**, 424-32.
 172. Weber, M.S., Hohlfeld, R., Zamvil, S.S. (2007) Mechanism of action of glatiramer acetate in treatment of multiple sclerosis. *Neurotherapeutics* **4**, 647-53.
 173. Heppner, F.L., Greter, M., Marino, D., Falsig, J., Raivich, G., Hovelmeyer, N., Waisman, A., Rulicke, T., Prinz, M., Priller, J., Becher, B., Aguzzi, A. (2005) Experimental autoimmune encephalomyelitis repressed by microglial paralysis. *Nat Med* **11**, 146-5

6. ANHANG

6.1. Abkürzungsverzeichnis

APZ	Antigen-präsentierende Zelle
BBB	Blut Hirn Schranke (<i>Blood brain barrier</i>)
BD	Becton und Dickinson
BRD	Bundesrepublik Deutschland
d	Tage (=days)
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol
dpi	dias post injectionem
EAE	Experimentelle Autoimmunenzephalitis
ECL	Entorhinale Kortex Läsion
EDTA	Ethylendiamintetraacetat hydriert
FACS	Fluorescence activated cell sorting
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
h	Stunden (=hours)
hpi	horas post injectionem
LK	Lymphknoten
MAC-1	Anti-macrophage antibody
MHC	Major-Histocompatibility-Complex 1
min	Minuten
MPS	Monozytäres Phagozytensystem
MS	Multiple Sklerose
n	Anzahl (=number)
NaCl	Natriumchlorid
PBS	Phosphatpuffersalz
PFA	Paraformaldehyd
p.i.	post injectionem
ZNS	Zentrales Nervensystem

6.2. Erklärung der Selbstständigkeit

„Ich, Miriam Kaminski, erkläre hiermit, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Migration von Monozyten nach Injektion in das lädierte Zentrale Nervensystem“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt.“

Ort, Datum

Unterschrift

6.3. Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

6.4. Eigene Publikationen

1. Kaminski M, Bechmann I, Pohland M, Kiwit J, Nitsch R, Glumm J. Migration of monocytes after intracerebral injection at entorhinal cortex lesion site. *J Leukoc Biol.* 2012 Jul;92(1):31-9. Epub 2012 Jan 30.

2. Kaminski M, Bechmann I, Kiwit J, Glumm J. Migration of monocytes after intracerebral injection. *Cell Adh Migr.* Epub 2012 May 1;6(3).

3. Kaminski M, Bechmann I, Nitsch R, Glumm J (08/2009) Fate of mononuclear cells after axonal lesion. Vortrag auf der *European Students Conference*, Berlin

4. Pohland* M, Robert Glumm*, **Kaminski M**, Kiwit J, Bräuer A, Nitsch R, Glumm J Cocultures of GFP motor cortex and spinal cord slices to investigate neuronal sprouting. (in preparation) * these authors contributed equally to this work

5. Korsten M, **Kaminski M**. Constipation- Pathomechanisms, diagnostics, therapy and prospects. *Review*. In: Bruce Sands M.D. (Hrsg.). Mount Sinai Expert Guide: Gastroenterology. Wiley-Blackwell, New York. (in process)

6.5. Danksagung

Ich danke Prof. Dr. Robert Nitsch für seine Hilfestellungen und die ausgezeichneten Bedingungen, unter denen ich in seinem Labor wissenschaftlich arbeiten durfte.

Mein Dank gilt besonders Frau Dr. Jana Glumm für die Bereitstellung dieses Promotionsthemas und für die Zusammenarbeit und Betreuung bei der Durchführung dieser Arbeit und nicht zuletzt für ihren motivierenden Optimismus.

Ein grosser Dank gebührt Prof. Dr. Ingo Bechmann, der mit seinen Ratschlägen und seiner konstruktiven Kritik maßgeblich zur Veröffentlichung meiner Ergebnisse beigetragen hat.

Bei der Gerhard-Starck Stiftung und der Studienstiftung des deutschen Volkes bedanke ich mich für die finanzielle und ideelle Unterstützung.

Vielen Dank an Martin Pohland und Friederike Ebner für die labortechnischen Tips und die Unterstützung im Laboralltag.

Besonders bei meinen Eltern, bei Lea, bei Marc Simon und bei Himama und Rebecca bedanke ich mich sehr für die liebevolle Unterstützung, mit der sie mich immer begleitet haben.

Ich bedanke mich von Herzen bei Ruwen Egri, für seine stetige Geduld und seinen kritischen Rat in allen Lebenslagen.