
1. Einleitung

1.1. Immunologie der Nervenläsion im peripheren Nervensystem

Nach mechanischer Läsion eines Nerven entstehen zwei ungleichwertige Abschnitte, von denen der distale im Prozess der Waller-Degeneration atrophiert, während der proximale Abschnitt erhalten bleibt und die Grundlage regenerativer Prozesse bildet (1). Bereits im Jahre 1850 beschrieb der britische Neurophysiologe August Volney Waller die Degeneration der Nervi hypoglossus und glossopharyngeus des Frosches nach Axotomie (2). Er beobachtete, dass Axone nach Durchtrennung deutliche Zeichen einer Desorganisation zeigen. Dieser Prozess wird ihm zu Ehren heute als „*Wallersche Degeneration*“ bezeichnet. Ein halbes Jahrhundert später bestätigte Ramón y Cajal die Beobachtungen Wallers und lieferte eine brillante und sehr detaillierte histologische Beschreibung der Axondegeneration, Ovoidbildung, Schwanzzell-Reaktionen und Leukozyteninfiltration (Reprint der englischen Übersetzung: 3). Charakteristischerweise finden sich im distalen Stumpf eines peripheren Nerven während der Wallerschen Degeneration die folgenden Zytokin-Expressionsmuster: Transkripte der Zytokine Interleukin (IL)-1 β , IL-6 und IL-10 erreichen Höchstwerte innerhalb von 24h nach Nervenschädigung, die danach langsam wieder absinken (4-6). Die Hauptquellen dieser frühen Zytokinantwort sind Schwanzzellen (4, 5, 7). Eine nachhaltigere Hochregulation in späteren Phasen der Wallerschen Degeneration wurde auch für die mRNA-Level der proinflammatorischen Zytokine Interferon (IFN)- γ und TNF- α nachgewiesen (6, 8).

Entzündungsprozesse werden im Kontext von Autoimmunprozessen des peripheren Nervensystems (PNS) gemeinhin als schädlich interpretiert. Im humanen Guillain-Barré-Syndrom und im entsprechenden Tiermodell, der Experimentellen Autoimmunen Neuritis, werden periphere Nerven von T-Zellen und Makrophagen infiltriert, was in unterschiedlichem Maße zu Demyelinisierung und Axonschädigung führt (Übersicht in: 9, 10). Ebenso werden bei der Multiplen Sklerose und dem korrespondierenden Tiermodell, der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis, Entzündungsprozesse zumeist als primär schädlich verstanden, obwohl den Immunzellen auch eine förderliche Rolle in der Remission dieser Erkrankungen zugeschrieben wird (11).

Im Gegensatz dazu werden die Entzündungsprozesse, die einer Axotomie folgen als hilfreiche „Wundheilungsreaktion“ interpretiert. Cajal beschrieb bereits Leukozyten in Nerven im Rahmen der Wallerschen Degeneration. Spätere immunhistochemische Analysen bestätigten, dass nach einer Quetschläsion des N. ischadicus T-Zellen und Makrophagen die Läsion innerhalb von zwei Tagen infiltrieren und sich bereits am vierten Tag im gesamten distalen Stumpf ausgebreitet haben (12-14). Auch im zentralen Nervensystem (ZNS) kommt es nach mechanischer Läsion zu einer Rekrutierung von Makrophagen und Mikroglia (15). Dies führt zu einer raschen Beseitigung des Myelin-Debris, der Inhibitoren des Neuritenauswachsens wie z. B. *Myelin-associated glycoprotein* enthält (16), so dass hierdurch die Nervenregeneration beschleunigt wird.

1.2. Die Rolle der Neurotrophine in der axonalen Regeneration

In den letzten Jahren wurden beachtliche Anstrengungen unternommen, die Mechanismen axonalen Auswachsens in der Morphogenese und nach Läsion zu entschlüsseln (17). Ein besonderer Schwerpunkt lag dabei auf der Untersuchung neurotropher Faktoren, insbesondere der sogenannten Neurotrophine. Diese gehören zu einer Familie verwandter Polypeptide, die zuerst aufgrund ihrer Effekte im ZNS und PNS beschrieben und charakterisiert wurden, dann jedoch in allen Organsystemen elementare Funktionen zugeschrieben bekamen (18-20). Die Mitglieder dieser Familie sind *Nerve Growth Factor* (NGF), *Brain-Derived Neurotrophic Factor* (BDNF), *Neurotrophin-3* (NT-3) und *Neurotrophin-4* (NT-4). Ihre bevorzugten Rezeptoren sind die Tyrosin-Kinase-Rezeptoren *Tropomyosin-Related Kinase-A* (Trk-A; für NGF), Trk-B (für NT-4 und BDNF) und Trk-C (für NT-3). NT-3 bindet mit geringerer Affinität auch an TrkA und TrkB. Ein weiterer Rezeptor, p75NTR, kann mit den Trks eine Rezeptorplattform bilden, wodurch die Spezifität und Affinität der Bindung an die bevorzugten Liganden gesteigert wird (19, 21).

Eine entscheidende Frage, die lange nicht beantwortet werden konnte ist, ob Axone konstitutiv wachsen oder ob Axonwachstum spezifischer extrinsischer Signale (also z. B. Neurotrophine) bedarf. Dies war bisher schwer zu beantworten, da dieselben Signale, die axonales Auswachsen stimulieren auch für neuronales Überleben notwendig sind, d.h., diese beiden Prozesse waren experimentell schwer von einander zu trennen, da der Entzug der Faktoren zum Zelltod führte und somit auch

kein Axonwachstum stattfand. Doch die Verwendung gentechnischer Methoden zur Apoptose-Inhibition in Neuronen des PNS und ZNS machte es möglich, diese Schlüsselfrage zu beantworten (17). Schon seit mehr als zwei Jahrzehnten ist bekannt, dass embryonale periphere Neurone, die in der Kultur ohne trophische Faktoren überleben, keine Axone entwickeln und dass adulte Spinalganglien, die nicht von neurotrophen Faktoren abhängig zu sein scheinen, auf die Zugabe von diesen Faktoren mit Axonwachstum reagieren (22). Sich entwickelnde Spinalganglien-Neurone aus transgenen Mäusen, denen das pro-apoptotische Protein Bax fehlt, überleben den Entzug neurotropher Faktoren und lassen nur rudimentäre Axone auswachsen. Nur die Zugabe von Neurotrophen führt zu einer Steigerung des Axonwachstums (23). Retinale Ganglion-Zellen (RGZ) überleben nach Hochregulation des anti-apoptotischen Proteins Bcl-2 selbst bei Entzug aller trophischen Signale, aber es werden keinerlei Axone gebildet, bevor nicht neurotrophe Faktoren präsent sind (17). Dies sind die entscheidenden Belege, dass Axonwachstum im PNS und ZNS keine intrinsische Eigenschaft neuronaler Zellen ist, sondern das Ergebnis extrinsischer Signale.

Im Rahmen der hier zusammengefassten Studien sind insbesondere die Neurotrophine NGF, NT-3 und NT-4 von großer Bedeutung, da alle drei Neurotrophine das axonale Auswachsen nach Verletzung peripherer Nerven stimulieren. NGF (23-25) und NT-3 (23, 24, 26) können sowohl als Einzelfaktor als auch in Kombination (27) nach Läsion das axonale Auswachsen *in vitro* und *in vivo* fördern. NT-4 scheint zwar einen inhibitorischen Effekt auf die Neuriten-Extension bestimmter Neurone *in vitro* zu haben (28; 29), ist aber *in vivo* für die axonale Regeneration peripherer Nerven von entscheidender Bedeutung (30-32).

1.3. Immunologie der Nervenläsion im zentralen Nervensystem

Das ZNS wird routinemäßig und effektiv vom Immunsystem überwacht (33). Selbst bei völliger Abwesenheit von entzündlichen Erkrankungen durchwandern aktivierte Lymphozyten das ZNS (34, 35). Im gesunden Gehirn finden sich nur kleine Zahlen von T-Zellen (36), die aber im Rahmen starker immunologischer Reaktionen im Körper zunehmen, auch wenn das Nervensystem selbst nicht betroffen ist (37). Dies deutet darauf hin, dass die Immunüberwachung des gesamten Körpers einschließlich des Gehirns nach immunologischer Aktivierung gesteigert ist.

Mechanische Verletzungen des ZNS sind charakterisiert durch die Einwanderung von T-Zellen und Makrophagen (ähnlich wie im PNS) (13, 38) sowie durch die Zunahme und Aktivierung von gewebeständigen Mikrogliazellen und Astrozyten (15, 39). Es kommt in Abhängigkeit vom studierten Modell zu mindestens ein bis zwei Phasen der T-Zell-Infiltration (13, 38). Aktivierte T-Zellen infiltrieren das verletzte Gehirn vermehrt unabhängig von ihrer Antigenspezifität, doch nur ZNS-spezifische T-Zellen akkumulieren im Läsionsbereich (40, 41). Interessanterweise lassen sich erhöhte Zahlen von T-Zellen noch lange nach der akuten Entzündungsreaktion im Läsionsbereich nachweisen (38, 42). Dies könnte darauf hindeuten, dass T-Zellen nicht nur eine Rolle in der akuten Entzündungsreaktion, sondern auch in der länger dauernden Wundheilungsreaktion im Sinne einer längerfristigen Neuroregeneration spielen könnten (43).

Tatsächlich ist die Rolle von T-Zellen im Rahmen der ZNS-Schädigung sehr umstritten. Wie oben bereits angedeutet, werden T-Zellen im Rahmen von Autoimmunerkrankungen wie der Multiplen Sklerose zumeist als primär schädlich interpretiert, obwohl Immunzellen auch eine Rolle in der Remission dieser Erkrankungen zugeschrieben wird (11). Im Rahmen von Rückenmarksverletzungen und Schlaganfall (44, 45) und nach experimenteller oder klinischer Nervenläsion (46) lassen sich aktivierte autoreaktive T-Zellen nachweisen, obwohl diese Zustände als nicht-autoimmun angesehen werden. Sieben Tage nach einer Rückenmarksläsion lassen sich autoreaktive, ZNS-spezifische T-Zellen aus den Lymphknoten von Nagern isolieren. Sie können in Lewis-Ratten und transgenen Mäusen nach einer Rückenmarksläsion die axonale Schädigung, Demyelinisierung und Funktionseinbußen verschlimmern (47, 48). Werden diese autoreaktiven T-Zellen gesunden Tieren gespritzt, dann entwickeln diese einen der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis ähnlichen klinischen Phänotyp (47). An späteren Zeitpunkten isolierte T-Zellen verlieren diese Wirkung, sodass von regulatorischen Mechanismen ausgegangen werden kann, welche nach der ersten Woche die autoimmune Reaktion unterdrücken (47). Allerdings gibt es eine seit Jahren anhaltende Diskussion darüber, ob die autoimmunen T-Zellen zu Nervenuntergang und Demyelinisierung während dieses einwöchigen Zeitfensters beitragen oder ob sie

im Gegenteil, neuroprotektive Effekte haben und die Regeneration unterstützen (49, 50).

Es konnte in multiplen Studien gezeigt werden, dass die Injektion autoimmuner T-Zellen sowie Vakzinierungsstrategien mit enzephalitogenen Antigenen in Abhängigkeit vom Modell sowohl zu einer Verbesserung als auch zu einer Exazerbation von Läsionen des Nervensystems führen kann (z. B.: 41, 51, 52). Dies deutet darauf hin, dass unterschiedliche Subtypen von T-Zellen für hilfreiche oder schädliche Effekte verantwortlich sein könnten (43).

Wir konzentrieren uns auf zwei Subtypen von T-Effektorzellen, nämlich T-Helferzellen vom Typ 1 (Th1) und Typ 2 (Th2), die sehr unterschiedliche Funktionen haben und durch ein unterschiedliches Zytokinsekretionsmuster gekennzeichnet sind (53, 54). Th1-Zellen sezernieren die Markerzytokine IL-2 und IFN- γ . Sie aktivieren u. a. Makrophagen, kontrollieren Infektionen mit intrazellulären Pathogenen und haben neurodegenerative Effekte im Kontext autoimmuner Erkrankungen wie der Multiplen Sklerose. Th2-Zellen sezernieren die Markerzytokine IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13. IL-4-positive T-Zellen sind potente Mediatoren humoraler Immunantworten und haben eine große Bedeutung in autoimmunen, allergischen Reaktionen und atopischen Erkrankungen (53, 54).

Es gibt verschiedene Hinweise darauf, dass Th2-Zellen eine Schlüsselrolle bei traumatischen, nicht-autoimmunen Schädigungen des ZNS spielen (43). ZNS-Schädigungen wie operative Schnittverletzungen oder Schlaganfall führen zu einer systemischen Immunsuppression (55), die mit einer systemischen Immundeviation in Richtung Th2-Status einhergeht (56). Darüber hinaus führt die Behandlung mit potenten Th2-Induktoren wie Glatirameracetat oder Statinen sowie die Verwendung von Th2-induzierenden Adjuvantien (Inkomplettes Freundesches Adjuvans, Aluminiumhydroxid) im Rahmen von Vakzinierungen zu neuroprotektiven und pro-regenerativen Effekten nach ZNS-Läsionen (57-61).

Die Bildung neuer Axone ist ein Schlüsselprozess der Neuroregeneration, der der funktionellen Wiederherstellung vorangehen muss und zumeist Neurotrophin-abhängig ist (17). Da T-Zellen in der Lage sind, Neurotrophine zu produzieren (46,

62, 63), wurde vorgeschlagen, dass infiltrierende T-Zellen die Neuroregeneration nach Läsion durch lokale Neurotrophinsekretion fördern können (11). Wir konnten jedoch zeigen, dass ein anderer Mechanismus eine entscheidende Bedeutung bei der axonalen Regeneration geschädigter Neuronen *in vitro* und *in vivo* besitzt: Th2-Zellen sind in der Lage, Neurotrophin-abhängiges axonales Auswachsen durch IL-4 zu fördern (64). Dies ist ein wichtiger Schritt, um die Interaktion von Zytokinen und Neurotrophinen in der Neuroregeneration zu verstehen und pharmakologisch zu beeinflussen.

1.4. Zytokine und Neurotrophine als Schnittstelle neuro-immuner Interaktionen bei der axonalen Regeneration

Wie oben ausgeführt spielen Neurotrophine eine entscheidende Rolle beim axonalen Auswachsen nach Nervenläsionen (17), die mit der Hochregulation der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 β , IL-6, IFN- γ und TNF- α einhergehen (65). Interessanterweise modulieren diese Zytokine die Expression oder Funktion von Neurotrophinen und deren Rezeptoren in den verschiedensten Zelltypen wie z. B. Astrozyten (66-73), Neuroblastom-Zellen (74, 75), Spinalganglien-Neurone (76), Schwannzellen (77), periphere Blutmonozyten (78), Fibroblasten (79-83) und Keratinozyten (84). In humaner Haut führte die Injektion von IFN- γ in die Haut von gesunden Probanden zu einem Anstieg der NT-4-Immunoreaktivität in den entnommenen Hautbiopsien (84). In Maushaut konnten wir zeigen, dass die kutane Expression von NGF, NT-3, NT-4 und deren Rezeptor p75NTR durch die Injektion von IL-1 β , TNF- α , IFN- γ hochreguliert wird (85). Darüber hinaus modulieren die Zytokine TNF α , IFN γ , IL-4 und IL-6 Neurotrophin-abhängiges Auswachsen von Spinalganglienzellen (86). Schließlich konnten wir nachweisen, dass Th2-Zellen durch das Zytokin IL-4 Neurotrophin-abhängiges Auswachsen im ZNS steigern (64). Diese Daten deuten darauf hin, dass die neuroimmunologische Homöostase der Haut sowie die axonale Regeneration nach Nervenschädigung im PNS und ZNS über eine Zytokin/Neurotrophin-Achse reguliert werden.