

**Der Einfluß von aktivierten Th1- und Th2-
Lymphozyten auf Reorganisationsprozesse
im geschädigten ZNS**

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

eingereicht im

FACHBEREICH

**BIOLOGIE, CHEMIE, PHARMAZIE
DER FREIEN UNIVERSITÄT BERLIN**

vorgelegt von

Stephanie Sallach

geboren am 17.12.1975 in Finsterwalde

Mai 2006

1. Gutachter: Prof. Dr. Robert Nitsch

2. Gutachter: Prof. Dr. Ronald Gust

Disputation am 07.09.2006

ZUSAMMENFASSUNG

T-Lymphozyten können eine entscheidende Rolle bei Verletzungen oder Erkrankungen des ZNS spielen und dabei sowohl neurodegenerative als auch neuroprotektive Effekte vermitteln. So führen T-Zellen im Rahmen neuroinflammatorischer Erkrankungen, wie der Multiplen Sklerose, zur Demyelinisierung der Axone und sind somit an der Ausbildung der sekundären Degeneration beteiligt. Nach einer mechanischen Schädigung des ZNS können T-Zellen verletzte Neurone jedoch auch vor einer Ausbreitung des Primärschadens schützen und die Ausbildung eines sekundären Zellschadens verhindern. In der letzten Zeit haben sich zunehmend Hinweise ergeben, daß diese konträren Wirkungsweisen auf die verschiedenen Subtypen von T-Helferzellen, Th1 und Th2, zurückzuführen sind. Dabei werden die schädigenden Effekte eher den Th1- Zellen und die protektiven Effekte eher den Th2-Zellen zugeschrieben.

Ausgehend von diesen Befunden wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob T-Zellen akut verletzte Neurone nicht nur vor einer Ausbreitung des Primärschadens schützen, sondern sogar das Auswachsen von Axonen aus dem geschädigten Hirngewebe im Sinne einer Neuroregeneration oder reaktivem Sprouting beeinflussen können. Unter Einsatz von in unserer Arbeitsgruppe entwickelten axonalen Auswachsassays sowie der organotypischen entorhino-hippokampalen Gewebeschnittkultur wurde bestätigt, daß akut verletzte Hirnschnitte *in vitro* axonales Wachstum aufweisen. Darüber hinaus konnte in verschiedenen Kokulturrexperimenten erstmals gezeigt werden, daß sowohl antigenspezifisch als auch unspezifisch aktivierte Th1-Zellen axonales Wachstum inhibieren und Th2-Zellen axonales Wachstum stimulieren. Weiterhin konnte sogar *in vivo* am Modell der entorhinalen Kortex-Läsion ein vermehrtes Auswachsen im Beisein von Th2-Zellen beobachtet werden.

Anschließend wurde mit der Analyse der an der Modulation des axonalen Auswachsens beteiligten sezernierten Faktoren begonnen. Die *in vitro* Untersuchungen haben ergeben, daß das beobachtete axonale Wachstum sowie die Th2-induzierte Stimulation dieses axonalen Wachstums Neurotrophin-abhängig sind. Die ELISA-Analyse des Kokulturmediums zeigte jedoch keine Veränderungen der Neurotrophinkonzentration im Vergleich zur Kontrolle. Im Gegensatz dazu ergab die immunhistochemische Analyse der verletzten Hirnschnitte eine gesteigerte neuronale Neurotrophin-Rezeptor-Expression unter dem Einfluß von Th2-Zellen. Somit kann davon ausgegangen werden, daß axonales Auswachsen nach einer Verletzung über die Bindung der Neurotrophine an ihre spezifischen Rezeptoren vermittelt wird und daß die Th2-induzierte Stimulation des axonalen Wachstums auf eine Hochregulation dieser Neurotrophin-Rezeptor-Expression zurückzuführen ist.

Welche sezernierten T-Zell-Faktoren letztendlich an den beschriebenen Effekten beteiligt sind, ist bisher noch nicht geklärt. Im Rahmen dieser Arbeit zeigten weder das Th1-Zytokin IFN- γ noch das Th2-Zytokin IL-4 die erwartete Beeinflussung des axonalen Wachstums bzw. der Neurotrophin-Rezeptor-Expression.

Die Ergebnisse dieser Arbeit stellen einen vielversprechenden Ansatzpunkt in der Therapie neurologischer Erkrankungen, insbesondere nach einer akuten Verletzung des ZNS, dar. Die Identifikation und funktionelle Charakterisierung der an axonalen Auswuchsvorgängen beteiligten sezernierten Faktoren wird daher auch Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein.

SUMMARY

T lymphocytes play a significant role in CNS injuries and diseases, where they are involved in both neurodegenerative and neuroprotective processes. During neuroinflammatory diseases, such as multiple sclerosis, T cells lead to demyelination and secondary degeneration. At the same time, T cells can protect damaged neurons in the primary stage from progressing to secondary damage after mechanical lesion of the CNS. It has been supposed that differential T helper cell subtypes (Th1 and Th2) are responsible for these opposite mechanisms. Whereas Th1 cells seem to be harmful, Th2 cells may exert beneficial effects.

However, the role of T helper cells in axonal outgrowth in the context of neuroregeneration and reactive sprouting is not yet clear. To investigate the influence of activated T cells on axonal outgrowth, modified classical neurobiological outgrowth assays combined with organotypic entorhino-hippocampal slice cultures were used. In this study it was confirmed that damaged brain slices show neuronal outgrowth *in vitro*. While Th1 cells suppressed this axonal outgrowth, Th2 cells significantly stimulated axonal outgrowth compared to controls. The Th2-induced stimulation of axonal outgrowth could also be reproduced *in vivo* by using entorhinal cortex lesion.

Furthermore, the identification of secreted factors and mechanisms responsible for these modulation of axonal outgrowth started. *In vitro* investigations demonstrated that Th2 cells stimulate axonal outgrowth in a neurotrophin-dependent manner. ELISA analyses revealed, however that Th2 cells did not substantially modulate neurotrophin levels in T cell/brain slice cocultures. In contrast, immunohistochemical analyses of damaged brain slices resulted in an upregulation of neuronal neurotrophin receptor expression by these Th2 cells. The described data suggest that axonal outgrowth is mediated by the binding of neurotrophins to their specific neurotrophin receptors. Moreover, Th2 cells might induce axonal outgrowth via neurotrophin receptor upregulation.

The secreted T cell factors responsible for the observed effects have not yet been identified. Within this study neither the Th1 cytokine IFN- γ nor the Th2 cytokine IL-4 showed the expected influence on axonal outgrowth and neurotrophin receptor expression.

Nevertheless, these results demonstrate the important role of Th2 cells and their soluble factors in neuroprotection and neuroregeneration after mechanical CNS lesion. It is therefore important that the identification and functional characterization of these factors be the subject of future investigations.

INHALTSVERZEICHNIS

1 Einleitung	1
1.1 Zentrales Nervensystem	1
1.1.1 Allgemeine Einführung	1
1.1.2 Neurotrophine und Neurotrophin-Rezeptoren	3
1.1.3 Beteiligung der Neurotrophine an Regenerationsprozessen	6
1.1.4 Die Hippokampusformation	7
1.1.4.1 Aufbau und Funktion der Hippokampusformation	7
1.1.4.2 Afferenzen und Efferenzen der Hippokampusformation	9
1.1.4.3 Anwendung der Hippokampusformation	10
1.2 Immunsystem	12
1.2.1 Allgemeine Einführung	12
1.2.2 Entwicklung und Aktivierung der T-Lymphozyten	13
1.2.3 Effektorfunktionen der T-Lymphozyten	14
1.2.3.1 Zytokine und Zytokin-Rezeptoren	15
1.2.3.2 Zytokinmilieu der Th1- und Th2-Lymphozyten	17
1.2.4 Autoimmunreaktionen	19
1.2.4.1 Multiple Sklerose	20
1.2.4.2 Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis	21
1.3 Wechselwirkungen zwischen zentralem Nervensystem und Immunsystem	22
1.3.1 Immunprivileg des zentralen Nervensystems	22
1.3.2 Neurodegeneration	23
1.3.3 Neuroprotektion	25
1.3.4 Einfluß der T-Lymphozyten auf neuropathologische Prozesse	28
1.4 Zielsetzungen	31
2 Material	32
2.1 Versuchstiere	32
2.2 Chemikalien	32
2.3 Peptide	34
2.4 Rekombinante Proteine	34
2.5 Antikörper	35
2.6 Seren	36

2.7 Medien	36
2.8 Kits	36
2.9 Primer	37
2.10 Zubehör	37
2.11 Geräte	38
2.12 Lösungen und Puffer	40
3 Methoden	44
3.1 Primäre T-Zellkultur	44
3.1.1 Versuchstiere	44
3.1.2 Test auf Transgenität	44
3.1.3 Präparation und Restimulation primärer T-Zellen	46
3.1.4 Aufreinigung der T-Zellen	48
3.1.5 Charakterisierung der T-Zellen	49
3.1.5.1 ELISA-Analyse	49
3.1.5.2 mRNA-Analyse	51
3.1.5.2.1 RNA-Isolation	51
3.1.5.2.2 cDNA-Synthese	52
3.1.5.2.3 Polymerase-Ketten-Reaktion	53
3.1.5.2.4 Agarose-Gelelektrophorese	55
3.1.5.3 FACS-Analyse	55
3.1.6 Bestimmung der Zellzahl	56
3.2 Kollagen-Kokulturen	56
3.2.1 Versuchstiere	56
3.2.2 Präparation organotypischer entorhinaler Schnittkulturen	57
3.2.3 Kokultivierung entorhinaler Kortex-Explantate mit T-Zellen	57
3.2.4 Kokultivierung entorhinaler Kortex-Explantate mit rekombinanten Proteinen	58
3.2.5 Kokultivierung entorhinaler Kortex-Explantate mit T-Zellkulturüberständen	59
3.2.6 Kokultivierung entorhinaler Kortex-Explantate mit T-Zellen unter Zugabe neutralisierender Antikörper	59
3.2.7 Auswertung der Kollagen-Kokulturen	60

3.3 Membran Kokulturen	62
3.3.1 Versuchstiere	62
3.3.2 Präparation organotypischer entorhino-hippokampaler Schnittkulturen	62
3.3.3 Kokultivierung entorhino-hippokampaler Explantate mit T-Zellen	62
3.3.4 Kokultivierung entorhino-hippokampaler Explantate mit rekombinanten Proteinen	63
3.3.5 Fixierung und Kryostatschnitte	63
3.3.6 ELISA-Analyse des Kokulturmediums	64
3.3.7 Immunhistochemische Analyse der entorhino-hippokampalen Explantate	64
3.4 Entorhinale Kortex-Läsion und T-Zellinjektion	66
3.4.1 Versuchstiere	66
3.4.2 Präparation der entorhinalen Kortex-Läsion und T-Zellinjektion	66
3.4.3 Immunhistochemische Analyse der Gehirne nach der entorhinalen Kortex-Läsion	67
3.5 Auswertung und Analyse der Daten	67
3.6 Statistische Verfahren	68
4 Ergebnisse	70
4.1 Charakterisierung der T-Zellen	70
4.1.1 Expressionsmuster der T-Zellen auf Protein-Ebene	70
4.1.2 Expressionsmuster der T-Zellen auf mRNA-Ebene	74
4.1.3 Aktivierungszustand der T-Zellen	77
4.2 Kollagen-Kokulturen	78
4.2.1 Einfluß von T-Zellen auf das axonale Wachstum entorhinaler Kortex-Explantate	79
4.2.2 Einfluß von rekombinanten Proteinen auf das axonale Wachstum entorhinaler Kortex-Explantate	82
4.2.3 Einfluß von T-Zellkulturüberständen auf das axonale Wachstum entorhinaler Kortex-Explantate	84
4.2.4 Einfluß neutralisierender Antikörper auf das axonale Wachstum entorhinaler Kortex-Explantate	85
4.2.5 Zusammenhang zwischen axonaler Dichte und axonaler Länge entorhinaler Kortex-Explantate	88

4.3 Membran-Kokulturen	89
4.3.1 Analyse der Neurotrophin-Expression	90
4.3.2 Analyse der Neurotrophin-Rezeptor-Expression	91
4.4 Entorhinale Kortex-Läsion und T-Zellinjektion	98
5 Diskussion	102
5.1 Einfluß der T-Lymphozyten auf Neurodegeneration und Neuroprotektion	102
5.2 Einfluß der T-Lymphozyten auf Neuroregeneration	103
5.3 Analyse der sezernierten Faktoren	105
5.3.1 Neurotrophine	105
5.3.1.1 Neurotrophin-Expression	108
5.3.1.2 Neurotrophin-Rezeptor-Expression	109
5.3.2 Zytokine	111
5.4 Einfluß der T-Lymphozyten auf Reorganisationsprozesse <i>in vivo</i>	114
5.5 Therapeutische Anwendung	116
6 Zusammenfassung	120
7 Abkürzungsverzeichnis	123
8 Literaturverzeichnis	127
9 Anhang	151
I Publikationsverzeichnis	151
II Lebenslauf	153
III Danksagung	154
IV Eidesstattliche Erklärung	156