

4 ERGEBNISSE

4.1 Charakterisierung der T-Zellen

Die primären T-Lymphozyten wurden nach der Differenzierung in Th1- und Th2-Zellen hinsichtlich ihres spezifischen Zytokin- und Neurotrophin-Expressionsmusters und ihrer Aktivierung charakterisiert.

4.1.1 Expressionsmuster der T-Zellen auf Protein-Ebene

Für die Detektion der freigesetzten Proteine wurden isolierte MBP- und OVA-spezifische T-Lymphozyten wie unter 3.1.3 ausführlich beschrieben restimuliert und in die Subpopulationen Th1 und Th2 ausdifferenziert. Anschließend wurden die Überstände der Th1- und Th2-Zellkulturen an den Tagen 1 bis 7 nach Restimulation abgenommen und auf ihre Proteinkonzentration mittels ELISA untersucht. Im folgenden sind die Ergebnisse dieser Messungen dargestellt.

Die Abb. 4.1a bis c zeigen die Zytokin-Expressionen MBP-spezifischer Th1-Zellen im Vergleich zu Th2-Zellen. Während die Th1-Zellen an allen Tagen nach Restimulation signifikant größere Mengen ihres Markerzytokins IFN- γ produziert haben (Werte bis 20 ng/ml; $p < 0,05$), sezernierten die Th2-Zellen am Tag 3 nach Restimulation signifikant mehr IL-4 (Werte um 600 pg/ml; $p < 0,05$). Die IL-10-Expression nahm sowohl bei den Th1- als auch bei den Th2-Zellen bis zum Tag 3 nach Restimulation zu und fiel anschließend bei beiden Subpopulationen wieder ab. Die Th2-Zellen sezernierten hierbei mit 3 ng/ml signifikant mehr IL-10 als die Th1-Zellen, bei denen das Expressionsmaximum nur bei 1,7 ng/ml lag ($p < 0,05$). Die gemessenen TNF- α - und TGF- β -Konzentrationen bewegten sich hingegen bei beiden Subpopulationen unter der jeweiligen Nachweisgrenze von 15,6 pg/ml bzw. 62,5 pg/ml.

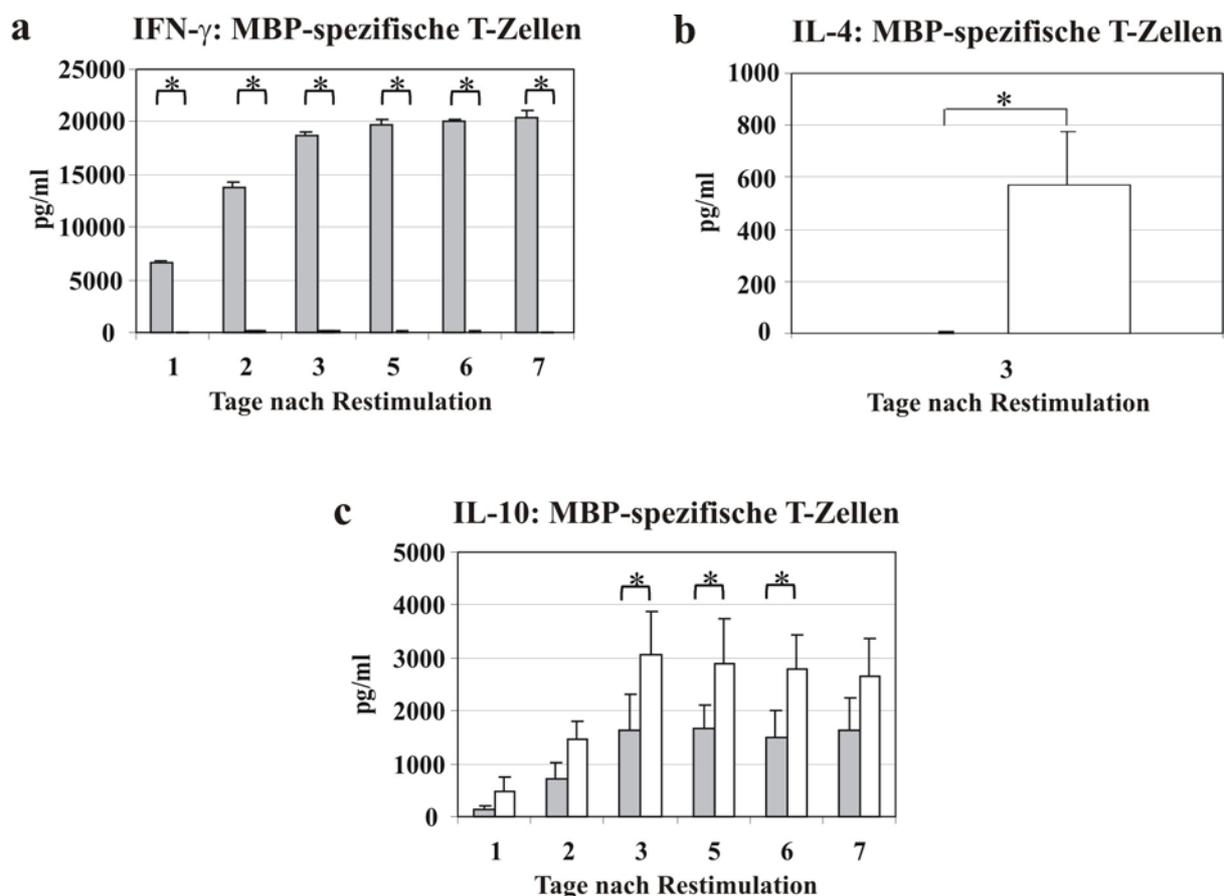


Abbildung 4.1: Zytokin-Expression MBP-spezifischer T-Zellen.

Die Zellkulturüberstände MBP-spezifischer Th1- und Th2-Zellen wurden an den Tagen 1 bis 7 nach Restimulation hinsichtlich ihres spezifischen Zytokin-Expressionsmusters mittels ELISA untersucht.

Da die Ausdifferenzierung der Th2-Zellen unter Zugabe von IL-4 erfolgte und dies zu einer Verfälschung der gemessenen IL-4 Konzentration führt, wurden die Th2-Zellen am Tag 2 nach Restimulation einmal gewaschen, für einen weiteren Tag ohne IL-4 inkubiert und anschließend der Zellkulturüberstand für die Bestimmung der IL-4-Konzentration abgenommen. Dargestellt sind die gemessenen Zytokin-Konzentrationen in pg/ml.

(a) IFN- γ , (b) IL-4, (c) IL-10. ■ = Th1-Zellen, □ = Th2-Zellen. Mean \pm S.D., n = 5, * = p < 0,05.

In den Abb. 4.2a bis c sind die Zytokin-Expressionsmuster OVA-spezifischer Th1- und Th2-Zellen dargestellt. Auch hier ist zu erkennen, daß die Th1-Zellen an allen Tagen nach Restimulation signifikant mehr IFN- γ produzierten (Werte um 25 ng/ml; p < 0,05) und IL-4 am Tag 3 nach Restimulation vermehrt von den Th2-Zellen gebildet wurde (Werte um 1,4 ng/ml; p < 0,05). Die IL-10-Expression stieg auch hier bei beiden Subpopulationen bis zum Tag 3 nach Restimulation an und fiel anschließend wieder ab. Während die Th1-Zellen dabei nur maximale Werte von 2 ng/ml erreichten, sezernierten die Th2-Zellen mit 12 ng/ml signifikant mehr IL-10 (p < 0,05). Die ermittelten TNF- α - und TGF- β -Mengen lagen auch hier bei beiden Subpopulationen unter der jeweiligen Nachweisgrenze von 15,6 pg/ml bzw. 62,5 pg/ml.

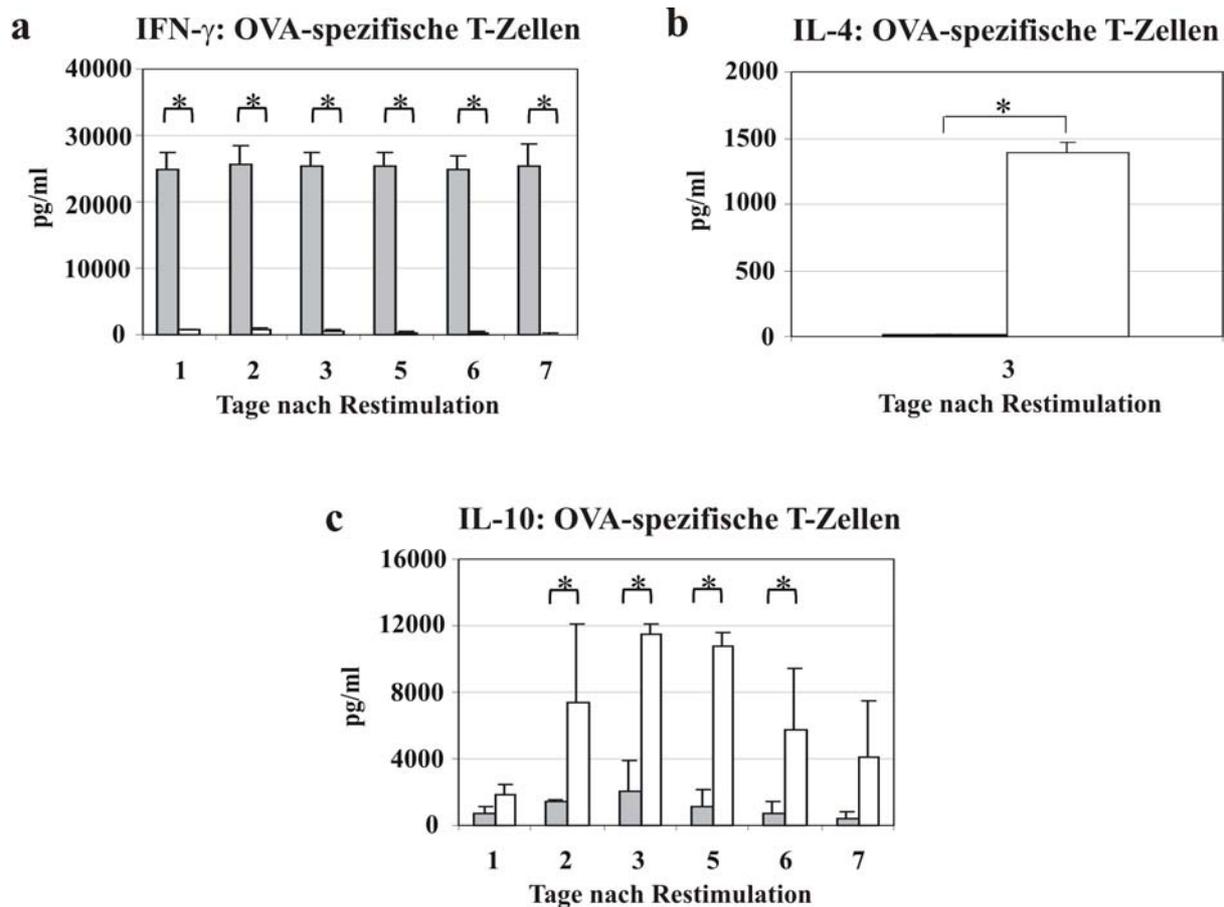


Abbildung 4.2: Zytokin-Expression OVA-spezifischer T-Zellen.

Die Zellkulturüberstände OVA-spezifischer Th1- und Th2-Zellen wurden an den Tagen 1 bis 7 nach Restimulation hinsichtlich ihres spezifischen Zytokin-Expressionsmusters mittels ELISA untersucht.

Da die Ausdifferenzierung der Th2-Zellen unter Zugabe von IL-4 erfolgte und dies zu einer Verfälschung der gemessenen IL-4 Konzentration führt, wurden die Th2-Zellen am Tag 2 nach Restimulation einmal gewaschen, für einen weiteren Tag ohne IL-4 inkubiert und anschließend der Zellkulturüberstand für die Bestimmung der IL-4-Konzentration abgenommen. Dargestellt sind die gemessenen Zytokinkonzentrationen in pg/ml.

(a) IFN- γ , (b) IL-4, (c) IL-10. ■ = Th1-Zellen, □ = Th2-Zellen. Mean \pm S.D., n = 5, * = p < 0,05.

Anschließend wurde untersucht, ob T-Zellen Neurotrophe Faktoren produzieren und ob eventuelle subtypspezifische Unterschiede im Zellkulturüberstand zu detektieren sind. Die Abb. 4.3a bis c zeigen, daß MBP-spezifische Th2-Zellen im Gegensatz zu MBP-spezifischen Th1-Zellen signifikant höhere Konzentrationen der Neurotrophen Faktoren NT-3, NT-4 und NGF sezernierten (p < 0,05). Dabei erreichten die Th2-Zellen ihr Expressionsmaximum jeweils am Tag 5 nach Restimulation, wobei Werte von 800 pg/ml für NT-3, 500 pg/ml für NT-4 und 250 pg/ml für NGF ermittelt wurden. Die von den Th1-Zellen sezernierten Neurotrophinmengen lagen hingegen an allen Tagen nur knapp über der jeweiligen Detektionsgrenze von 4,7 pg/ml für NT-3 und NT-4 sowie 7,8 pg/ml für NGF.

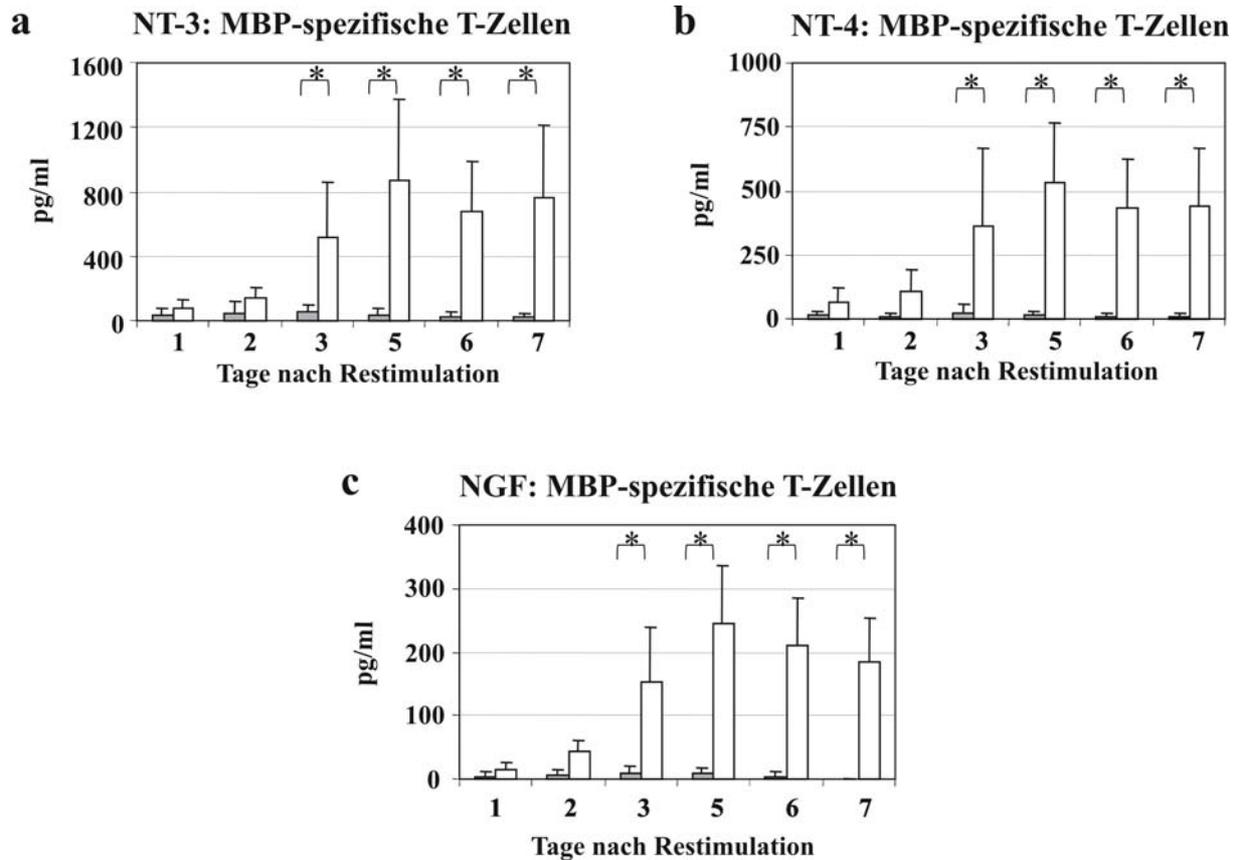


Abbildung 4.3: Neurotrophin-Expression MBP-spezifischer T-Zellen.

Die Zellkulturüberstände MBP-spezifischer Th1- und Th2-Zellen wurden an den Tagen 1 bis 7 nach Restimulation hinsichtlich ihres spezifischen Neurotrophin-Expressionsmusters mittels ELISA untersucht. Dargestellt sind die gemessenen Neurotrophinkonzentrationen in pg/ml.

(a) NT-3, (b) NT-4, (c) NGF. ■ = Th1-Zellen, □ = Th2-Zellen. Mean \pm S.D., n = 5, * = p < 0,05.

Auch OVA-spezifische Th2-Zellen produzierten am Tag 6 nach Restimulation signifikant größere Mengen an NT-3, NT-4 und NGF im Vergleich zu OVA-spezifischen Th1-Zellen (Abb. 4.4a bis c; p < 0,05), wobei hier Werte von 200 pg/ml für NT-3 sowie 100 pg/ml für NT-4 und NGF ermittelt wurden. Die gemessenen Neurotrophinkonzentrationen der Th1-Zellen lagen hingegen bei NGF um die 50 pg/ml, bei NT-3 nur knapp über und bei NT-4 sogar unter der Detektionsgrenze von 4,7 pg/ml.

BDNF konnte weder im Überstand MBP- oder OVA-spezifischer Th1-Zellen noch im Überstand MBP- oder OVA-spezifischer Th2-Zellen gemessen werden.

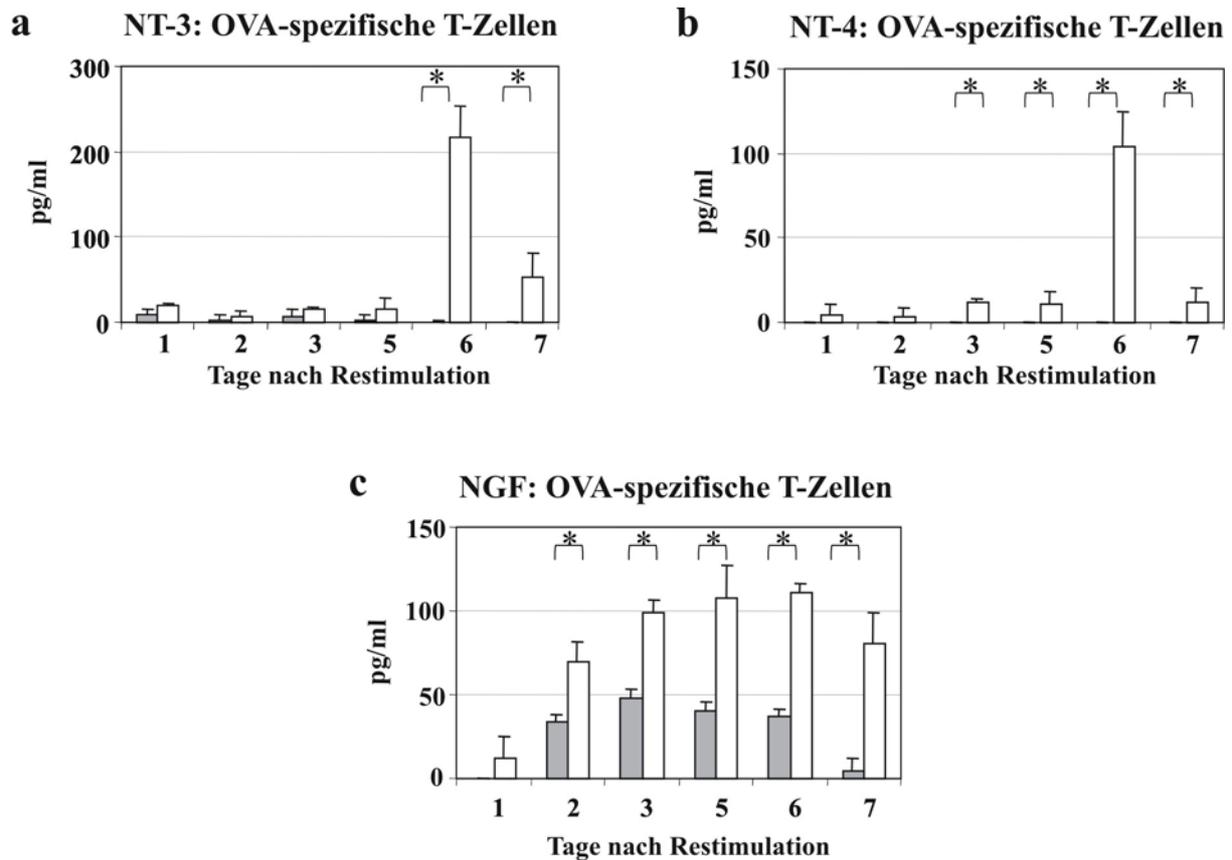


Abbildung 4.4: Neurotrophin-Expression OVA-spezifischer T-Zellen.

Die Zellkulturüberstände OVA-spezifischer Th1- und Th2-Zellen wurden an den Tagen 1 bis 7 nach Restimulation hinsichtlich ihres spezifischen Neurotrophin-Expressionsmusters mittels ELISA untersucht. Dargestellt sind die gemessenen Neurotrophinkonzentrationen in pg/ml.

(a) NT-3, (b) NT-4, (c) NGF. ■ = Th1-Zellen, □ = Th2-Zellen. Mean \pm S.D., n = 5, * = p < 0,05.

4.1.2 Expressionsmuster der T-Zellen auf mRNA-Ebene

In Ergänzung zu den Untersuchungen auf Protein-Ebene wurde die Zytokin- und Neurotrophin-Expression der T-Zellen auch auf mRNA-Ebene nachgewiesen. Dafür erfolgte eine Isolation der Gesamt-RNA aus MBP-spezifischen CD4⁺ Th1- und Th2-Zellen. Zur Überprüfung der Integrität der isolierten RNA wurden die Proben der Th1- und Th2-Zellen zusammen mit dem λ -DNA-Marker auf ein mit Ethidiumbromid gefärbtes Agarose-Gel aufgetragen, welches in Abb. 4.5 dargestellt ist. Als Kontrolle diente die isolierte RNA aus Mausgehirn. Die Abbildung zeigt jeweils auf der Höhe der 4,7 kb Markerbande die 28s-Untereinheit und auf der Höhe der 1,9 kb Markerbande die 18s-Untereinheit der ribosomalen RNA. Aus dieser isolierten RNA wurde nachfolgend eine cDNA synthetisiert, welche anschließend mittels PCR hinsichtlich ihres Protein-Expressionsmusters untersucht werden konnte.

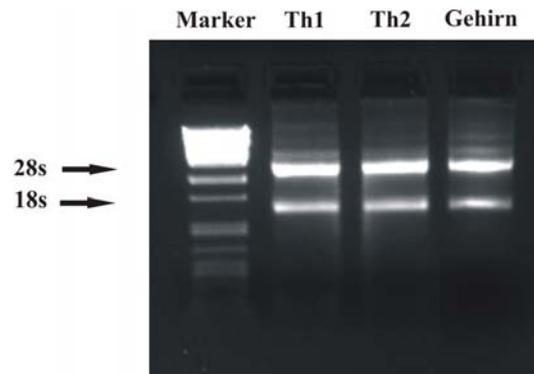


Abbildung 4.5: RNA-Isolation aus MBP-spezifischen T-Zellen.

Die Isolation der Gesamt-RNA aus MBP-spezifischen CD4⁺ Th1- und Th2-Zellen erfolgte am Tag 2 nach Restimulation. Als Kontrolle diente die Gesamt-RNA aus Mausgehirn. Dargestellt ist ein 1,5 % iges Agarose-Gel mit der aus Th1- und Th2-Zellen sowie Mausgehirn isolierten RNA.

4,7 kb = 28s rRNA, 1,9 kb = 18s rRNA, Marker = λ -DNA-Größenmarker.

Zur Überprüfung der aus der Gesamt-RNA synthetisierten cDNA, wurde zunächst eine PCR mit Primern für das house-keeping Gen β -Aktin durchgeführt. Jeweils 20 μ l der in der PCR amplifizierten und mit Ladepuffer gemischten DNA wurden auf ein Agarose-Gel aufgetragen und elektrophoretisch getrennt. Anhand eines mitgeführten 100 bp-Markers konnten nach dem Gellauf die amplifizierten Banden des β -Aktins auf erfolgreiche Vervielfältigung und auf die Größe der Amplifikate überprüft und anschließend dokumentiert werden. Abb. 4.6 zeigt den aufgetragenen 100 bp-Marker, die Th1- und die Th2-Proben sowie die Gehirnprobe nach Amplifizierung der β -Aktin-cDNA. Auf der Höhe von 387 bp ist in allen Proben eine spezifische Bande zu erkennen.

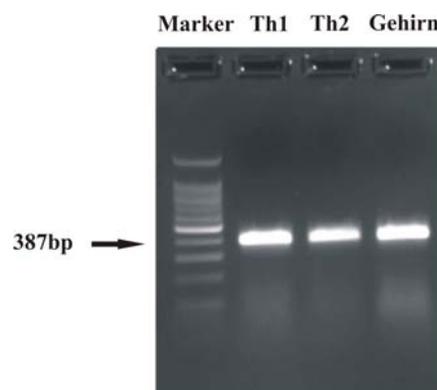


Abbildung 4.6: β -Aktin-Expression MBP-spezifischer T-Zellen.

Nach der RNA-Isolation aus MBP-spezifischen CD4⁺ Th1- und Th2-Zellen sowie anschließender cDNA-Synthese wurden die Proben hinsichtlich ihrer Expression für das house-keeping Gen β -Aktin mittels PCR untersucht. Als Kontrolle diente cDNA aus Mausgehirn. Dargestellt ist ein 1,5 % iges Agarose-Gel nach Amplifizierung der β -Aktin-cDNA (387 bp) aus Th1- und Th2-Zellen sowie Mausgehirn. Marker = 100 bp-Marker.

Anschließend erfolgte die Analyse des Zytokin- und Neurotrophin-Expressionsmusters der Th1- und Th2-Zellen sowie des Mausgehirns. Mit Hilfe der PCR, welche unter Verwendung jeweils genspezifischer Primerpaare durchgeführt wurde, konnten die bestimmten cDNA-Sequenzen selektiv vervielfältigt werden. Anhand des mitgeführten Markers wurden die Größen der Amplifikate ermittelt und dokumentiert.

Die gefundenen Protein-Expressionsmuster der Th1- und Th2-Zellen sind in den Abb. 4.7 und 4.8 zusammengefaßt. Sie zeigen die Agarose-Gele nach den Amplifizierungen der cDNA. In Abb. 4.7a ist die Zytokin-Expression der Th1-Zellen und im Vergleich dazu in Abb. 4.7b die Zytokin-Expression der Th2-Zellen dargestellt. Neben dem 100 bp-Marker wurden die PCR-Produkte in folgender Reihenfolge aufgetragen: IFN- γ , IL-1, IL-2, IL-4, IL-10 und TGF- β . Während der Faktor IFN- γ nur in Th1-Zellen exprimiert wurde, waren die Zytokine IL-1, IL-2, IL-4, IL-10 und TGF- β sowohl in Th1- als auch in Th2-Zellen nachzuweisen. In der als Vergleich mitgeführten Gehirnprobe konnten bis auf den Faktor IFN- γ ebenfalls alle Zytokine auf mRNA-Ebene detektiert werden (Abb. 4.7c).

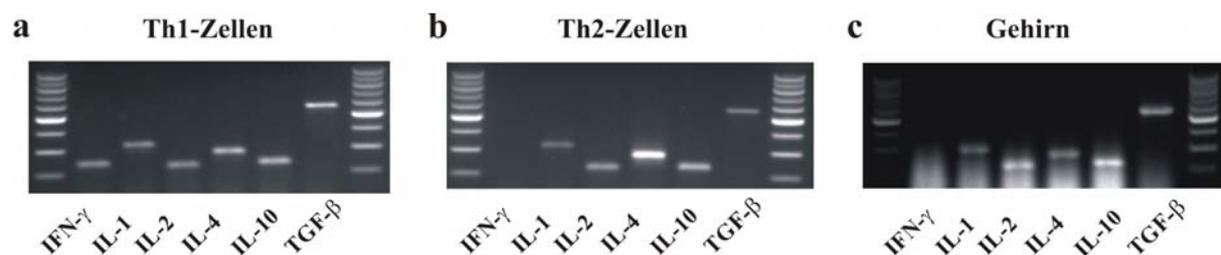


Abbildung 4.7: Zytokin-Expression MBP-spezifischer T-Zellen.

Nach der RNA-Isolation aus MBP-spezifischen CD4⁺ Th1- und Th2-Zellen sowie anschließender cDNA-Synthese wurden die Proben hinsichtlich ihres spezifischen Zytokin-Expressionsmusters mittels PCR untersucht. Als Kontrolle diente cDNA aus Mausgehirn. Dargestellt sind die 1,5 % igen Agarose-Gele nach Amplifizierung der Zytokin-cDNA IFN- γ (236 bp), IL-1 β (321 bp), IL-2 (225 bp), IL-4 (278 bp), IL-10 (231 bp) und TGF- β (551 bp).

(a) Th1-Zellen, (b) Th2-Zellen, (c) Mausgehirn. Marker = 100 bp-Marker.

In den Abb. 4.8a und b sind die Neurotrophin-Expressionsmuster der Th1- bzw. Th2-Zellen dargestellt. Neben dem 100 bp-Marker wurden die Faktoren jeweils in der Reihenfolge NGF, BDNF, NT-3 und NT-4 auf das Gel aufgetragen. Die Gelbilder zeigen, daß beide T-Zell-Subpopulationen NGF, BDNF, NT-3 und NT-4 exprimierten. Auch aus der aufgereinigten Gehirn-mRNA ließen sich alle Neurotrophinen Faktoren amplifizieren (Abb. 4.8c). Eine Kontamination der Proben mit genomischer DNA wurde durch das jeweilige Mitführen von RT-Negativkontrollen ausgeschlossen.

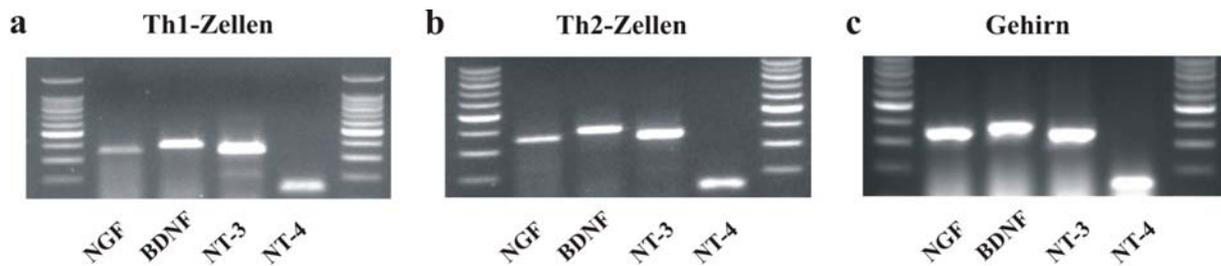


Abbildung 4.8: Neurotrophin-Expression MBP-spezifischer T-Zellen.

Nach der RNA-Isolation aus MBP-spezifischen CD4⁺ Th1- und Th2-Zellen sowie anschließender cDNA-Synthese wurden die Proben hinsichtlich ihres spezifischen Neurotrophin-Expressionsmusters mittels PCR untersucht. Als Kontrolle diente cDNA aus Mausgehirn. Dargestellt sind die 1,5 % igen Agarose-Gele nach Amplifizierung der Neurotrophin-cDNA NGF (353 bp), BDNF (389 bp), NT-3 (355 bp) und NT-4 (153 bp).

(a) Th1-Zellen, (b) Th2-Zellen, (c) Mausgehirn. Marker = 100 bp-Marker.

4.1.3 Aktivierungszustand der T-Zellen

Zur weiteren Charakterisierung der primären T-Lymphozyten wurde die CD25-Expression der Th1- und Th2-Zellen mittels Durchflußzytometrie bestimmt.

CD25 ist die α -Kette des IL-2-Rezeptors und wird zusammen mit dem T-Zell-Wachstumsfaktor IL-2 erst bei Aktivierung der T-Zellen synthetisiert. Die Expression von CD25 beginnt ungefähr 24 h nach Aktivierung der T-Zellen und bleibt für 3 bis 4 Tage detektierbar. Der so gebildete IL-2-Rezeptor weist eine hohe Affinität für das von den T-Zellen selbst sezernierte IL-2 auf, welches seine Wirkung para- oder autokrin vermittelt und für die Proliferation und Differenzierung der T-Zellen verantwortlich ist. Die CD25-Expression kann somit als einer der Marker für den Aktivierungszustand der T-Lymphozyten angesehen werden.

Für diesen Versuch wurden MBP-spezifische T-Lymphozyten wie unter 3.1.3 beschrieben präpariert, restimuliert und in die Subpopulationen Th1 und Th2 ausdifferenziert. Anschließend wurden an den Tagen 1 und 2 nach Restimulation Proben aus der Zellkultur entnommen und die Oberflächenmarker CD4 und CD25 gefärbt. Die Markierung von CD4 diente der Identifizierung CD4⁺ T-Helferzellen. CD25 wurde als Aktivierungsmarker verwendet.

In den Abb. 4.9a und b sind die Ergebnisse der FACS-Messung dargestellt. Die Histogramme zeigen die CD25-Expression aller CD4⁺ T-Helferzellen. Es ist zu erkennen, daß CD25 sowohl von den Th1- als auch von den Th2-Zellen am Tag 2 signifikant stärker als am Tag 1 nach Restimulation exprimiert wurde ($p < 0,05$).

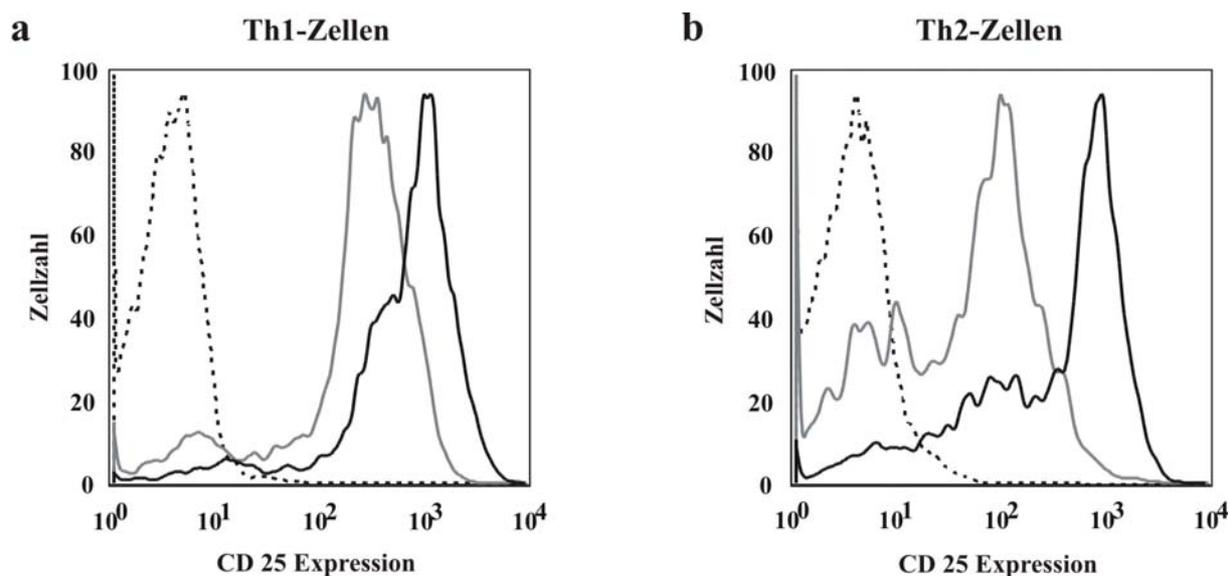


Abbildung 4.9: Aktivierungszustand MBP-spezifischer T-Zellen.

Jeweils 1×10^6 MBP-spezifische Th1- und Th2-Zellen wurden an den Tagen 1 und 2 nach Restimulation mit spezifischen Antikörpern gegen CD4 und CD25 doppelt gefärbt und anschließend mit Hilfe der Durchflußzytometrie analysiert. Die Markierung von CD4 diente der Identifizierung CD4+ T-Helferzellen. CD25 wurde als Aktivierungsmarker verwendet. Als Kontrollen dienen ungefärbte T-Zellen. Dargestellt ist die CD25-Expression aller CD4+ T-Helferzellen.

(a) Th1-Zellen, (b) Th2-Zellen. □ = ungefärbt, ▣ = 1 Tag nach Restimulation, ▤ = 2 Tage nach Restimulation.

Da die Th1- und Th2-Lymphozyten wie eben beschrieben am Tag 2 nach Restimulation aktiviert waren und sowohl auf mRNA- als auch auf Protein-Ebene ein spezifisches Zytokin- und Neurotrophin-Expressionsmuster zeigten, erfolgte die Aufreinigung und der anschließende Einsatz der T-Zellen in den *in vitro* Kokulturen und im *in vivo* Läsionsmodell 2 Tage nach ihrer Restimulation.

4.2 Kollagen-Kokulturen

Zur Untersuchung des axonalen Auswachsens im Rahmen neuroregenerativer Prozesse wurde ein modifiziertes klassisches neurobiologisches Kokulturmodell verwendet. Anhand dessen sollte geklärt werden, ob akut verletzte Hirnschnitte *in vitro* axonales Wachstum zeigen, ob T-Zellen dieses axonale Auswachsen beeinflussen und ob sogar subtypspezifische Unterschiede vorhanden sind. Hierfür wurden primäre T-Zellen mit entorhinalen Kortex-Explantaten in einer dreidimensionalen Kollagenmatrix kokultiviert. Da zwischen ihnen kein direkter Zell-Zell-Kontakt bestand, konnte der Einfluß sezernierter T-Zell-Faktoren auf das axonale Wachstum der EC-Explantate analysiert werden. Die akuten Hirnschnitte stellten hierbei ein geeignetes Modell für einen mechanisch gesetzten Primärschaden dar.

4.2.1 Einfluß von T-Zellen auf das axonale Wachstum entorhinaler Kortex-Explantate

Die Kokultivierung der CD4⁺ Th1- und Th2-Zellen mit den EC-Explantaten wurde wie unter 3.2.3 ausführlich beschrieben durchgeführt, sodaß bereits nach 2 Tagen *in vitro* die in die Kollagenmatrix eingewachsenen Axone in Bezug auf ihre Dichte semiquantitativ ausgewertet werden konnten. Die Analyse des axonalen Wachstums erfolgte nach den in Punkt 3.2.7 festgelegten Kriterien unter Verwendung der dort beschriebenen 4 Dichtegrade. Die folgenden Abbildungen zeigen die Ergebnisse der verschiedenen Kokulturansätze, die nach dieser Methode durchgeführt und ausgewertet wurden. In den Diagrammen ist als Maß für das axonale Wachstum zum einen die axonale Dichte der dem Zellaggregat zugewandten Explantathälfte dargestellt (Abb. 4.10a, 4.11a, 4.12a und 4.13a). Zum anderen wurde die Polarisierungsration aus den Dichtewerten der proximalen Explantathälfte und den Werten der distalen Explantathälfte ermittelt und angegeben, um attraktive oder repulsive Effekte zu charakterisieren (Abb. 4.10b, 4.11b, 4.12b und 4.13b).

In allen Kontrollexperimenten, die ohne Zugabe von T-Zellen erfolgten, konnte axonales Wachstum *in vitro* nachgewiesen werden.

In Abb. 4.10 ist der Einfluß MBP-spezifischer Th1- und Th2-Zellen auf das axonale Auswachsen dieser entorhinalen Kortex-Explantate dargestellt. Abb. 4.10a zeigt einerseits, daß die Th1-Zellen das axonale Wachstum im Vergleich zur Kontrolle signifikant inhibierten. Die axonale Dichte wurde hier um 24,4 % reduziert ($p < 0,05$). Andererseits ist zu erkennen, daß die Th2-Zellen das axonale Auswachsen im Vergleich zu den Kontroll-Schnitten signifikant stimulierten. Es kam zu einer Steigerung der axonalen Dichte um 13,5 % ($p < 0,05$). Abb. 4.10b zeigt in Gegenwart der Th2-Zellen eine signifikante Verschiebung der Polarisierungsration zugunsten der proximalen Explantathälfte. Der berechnete Wert stieg von 1,41 auf 1,57 ($p < 0,05$).

In Abb. 4.11 ist das axonale Auswachsen der EC-Explantate unter dem Einfluß OVA-spezifischer Th1- und Th2-Zellen dargestellt. Die Th2-Zellen bewirkten in diesen Kokulturen eine signifikante Erhöhung des axonalen Wachstums um sogar 54,6 % verglichen mit der Kontrolle (Abb. 4.11a; $p < 0,05$) und führten gleichzeitig zu einem attraktiven Auswachsmuster kortikaler Axone. Die Polarisierungsration stieg hier von 1,19 auf 1,46 (Abb. 4.11b; $p < 0,05$).

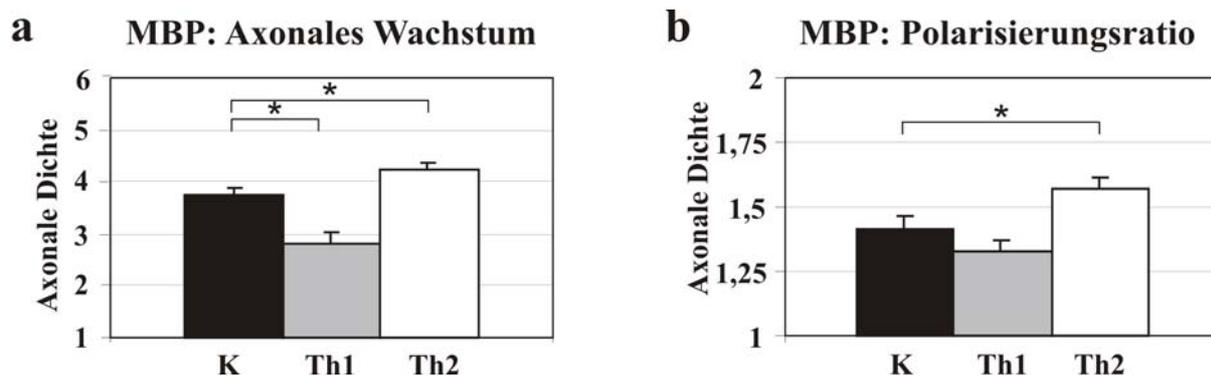


Abbildung 4.10: Einfluß MBP-spezifischer T-Zellen auf das axonale Wachstum entorhinaler Kortex-Explantate.

MBP-spezifische CD4⁺ Th1- und Th2-Zellen wurden mit organotypischen entorhinalen Gewebeschnitten 2 Tage alter B10.PL Mäuse in einer dreidimensionalen Kollagenmatrix kokultiviert. Als Kontrollen dienten EC-Explantate ohne T-Zellen. Nach einer Inkubationszeit von 2 Tagen wurde die Dichte der ausgewachsenen Axone nach festgelegten morphologischen Kriterien analysiert. Dazu wurden die Explantate in eine dem Zellaggregat zugewandte (proximale) und eine dem Zellaggregat abgewandte (distale) Hälfte unterteilt. Dargestellt ist zum einen die axonale Dichte der proximalen Explantathälfte als Maß für das axonale Wachstum. Zum anderen ist die Polarisierungsrate aus den Dichtewerten der proximalen und den Werten der distalen Explantathälfte angegeben.

(a) Axonales Wachstum, (b) Polarisierungsrate. K = Kontrolle, d.h. Kultivierung ohne T-Zellen, Th1 = Kokultivierung mit Th1-Zellen, Th2 = Kokultivierung mit Th2-Zellen. Mean \pm S.E.M., n = 82, * = p < 0,05.

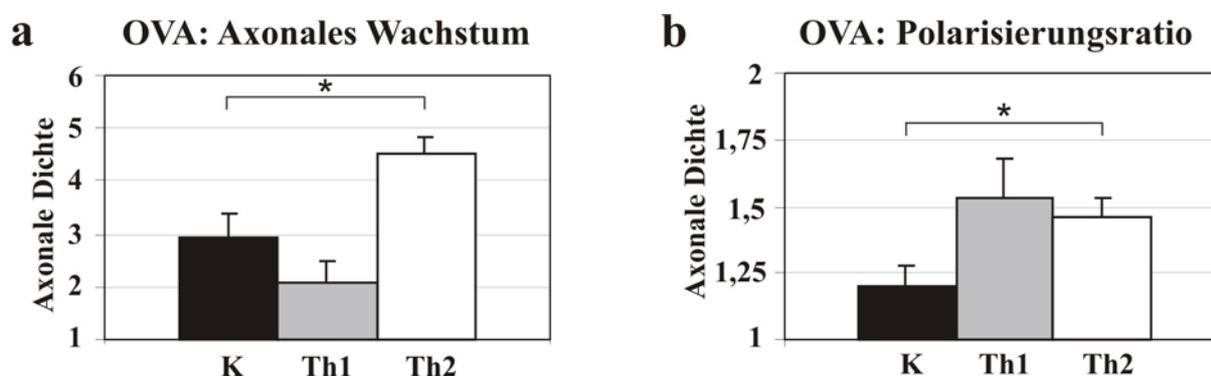


Abbildung 4.11: Einfluß OVA-spezifischer T-Zellen auf das axonale Wachstum entorhinaler Kortex-Explantate.

OVA-spezifische CD4⁺ Th1- und Th2-Zellen wurden mit organotypischen entorhinalen Gewebeschnitten 2 Tage alter BALB/c Mäuse in einer dreidimensionalen Kollagenmatrix kokultiviert. Als Kontrollen dienten EC-Explantate ohne T-Zellen. Nach einer Inkubationszeit von 2 Tagen wurde die Dichte der ausgewachsenen Axone nach festgelegten morphologischen Kriterien analysiert. Dazu wurden die Explantate in eine dem Zellaggregat zugewandte (proximale) und eine dem Zellaggregat abgewandte (distale) Hälfte unterteilt. Dargestellt ist zum einen die axonale Dichte der proximalen Explantathälfte als Maß für das axonale Wachstum. Zum anderen ist die Polarisierungsrate aus den Dichtewerten der proximalen und den Werten der distalen Explantathälfte angegeben.

(a) Axonales Wachstum, (b) Polarisierungsrate. K = Kontrolle, d.h. Kultivierung ohne T-Zellen, Th1 = Kokultivierung mit Th1-Zellen, Th2 = Kokultivierung mit Th2-Zellen. Mean \pm S.E.M., n = 18, * = p < 0,05.

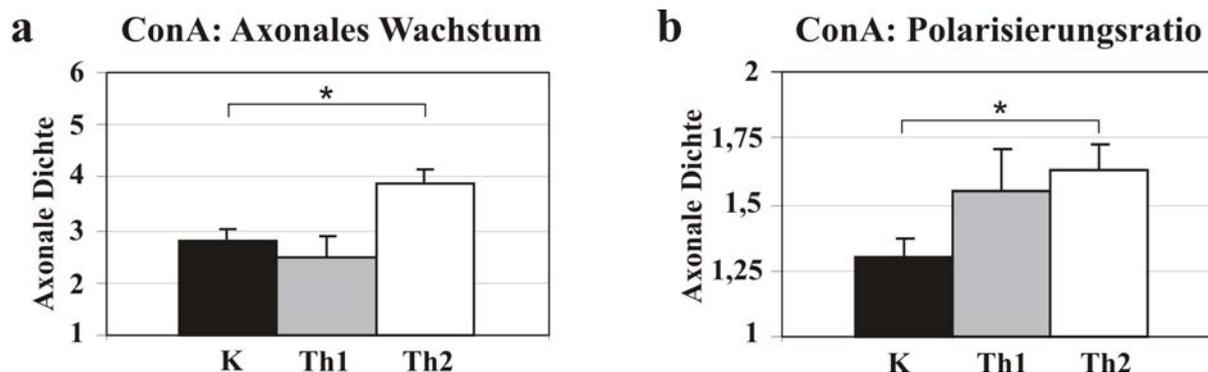


Abbildung 4.12: Einfluß unspezifisch mit ConA aktivierter T-Zellen auf das axonale Wachstum entorhinaler Kortex-Explantate.

Unspezifisch mit ConA aktivierte CD4⁺ Th1- und Th2-Zellen wurden mit organotypischen entorhinalen Gewebeschnitten 2 Tage alter B10.PL Mäuse in einer dreidimensionalen Kollagenmatrix kokultiviert. Als Kontrollen dienten EC-Explantate ohne T-Zellen. Nach einer Inkubationszeit von 2 Tagen wurde die Dichte der ausgewachsenen Axone nach festgelegten morphologischen Kriterien analysiert. Dazu wurden die Explantate in eine dem Zellaggregat zugewandte (proximale) und eine dem Zellaggregat abgewandte (distale) Hälfte unterteilt. Dargestellt ist zum einen die axonale Dichte der proximalen Explantathälfte als Maß für das axonale Wachstum. Zum anderen ist die Polarisierungsrate aus den Dichtewerten der proximalen und den Werten der distalen Explantathälfte angegeben.

(a) Axonales Wachstum, (b) Polarisierungsrate. K = Kontrolle, d.h. Kultivierung ohne T-Zellen, Th1 = Kokultivierung mit Th1-Zellen, Th2 = Kokultivierung mit Th2-Zellen. Mean \pm S.E.M., n = 16, * = p < 0,05.

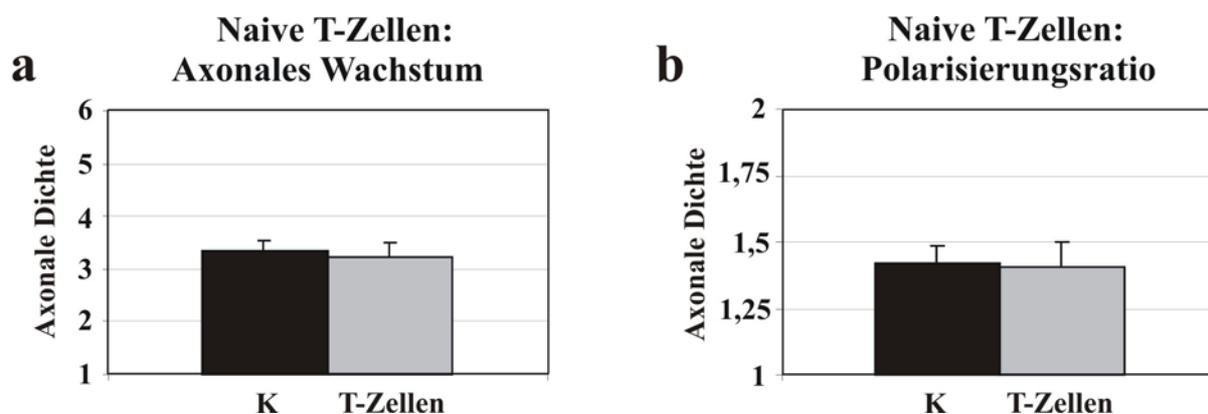


Abbildung 4.13: Einfluß naiver T-Zellen auf das axonale Wachstum entorhinaler Kortex-Explantate.

Naive CD4⁺ T-Zellen wurden mit organotypischen entorhinalen Gewebeschnitten 2 Tage alter B10.PL Mäuse in einer dreidimensionalen Kollagenmatrix kokultiviert. Als Kontrollen dienten EC-Explantate ohne T-Zellen. Nach einer Inkubationszeit von 2 Tagen wurde die Dichte der ausgewachsenen Axone nach festgelegten morphologischen Kriterien analysiert. Dazu wurden die Explantate in eine dem Zellaggregat zugewandte (proximale) und eine dem Zellaggregat abgewandte (distale) Hälfte unterteilt. Dargestellt ist zum einen die axonale Dichte der proximalen Explantathälfte als Maß für das axonale Wachstum. Zum anderen ist die Polarisierungsrate aus den Dichtewerten der proximalen und den Werten der distalen Explantathälfte angegeben.

(a) Axonales Wachstum, (b) Polarisierungsrate. K = Kontrolle, d.h. Kultivierung ohne T-Zellen, T-Zellen = Kokultivierung mit naiven T-Zellen. Mean \pm S.E.M., n = 24.

Abb. 4.12 zeigt das axonale Auswachsverhalten der EC-Schnitte unter dem Einfluß unspezifisch mit ConA aktivierter Th1- und Th2-Zellen. Auch in diesen Kokulturansätzen war eine signifikante Steigerung des axonalen Auswachsens um 38,6 % (Abb. 4.12a; $p < 0,05$) und eine signifikante Erhöhung der Polarisierungsratio von 1,3 auf 1,6 durch die Th2-Zellen im Vergleich zu den Kontrollen nachzuweisen (Abb. 4.12b; $p < 0,05$).

In Gegenwart naiver T-Zellen war weder eine Veränderung des axonalen Auswachsens entorhinaler Kortex-Explantate noch eine Verschiebung der Polarisierungsratio im Vergleich zu den Kontrollen festzustellen (Abb. 4.13)

4.2.2 Einfluß von rekombinanten Proteinen auf das axonale Wachstum entorhinaler Kortex-Explantate

Da in diesem Modell der Effekt löslicher Faktoren auf das axonale Wachstum entorhinaler Kortex-Explantate untersucht werden sollte, wurden auch rekombinante Proteine anstelle der T-Zellen in der Kollagen-Kokultur eingesetzt. Die Kokultivierungen wurden wie unter 3.2.4 beschrieben durchgeführt und die in die Kollagenmatrix eingewachsenen Axone wie in Punkt 3.2.7 erläutert in Bezug auf ihre Dichte ausgewertet. In den Abb. 4.14a und b ist die axonale Dichte der dem Protein-Kollagentropfen zugewandten Explantathälfte als Maß für das axonale Wachstum dargestellt. Die Abbildungen zeigen das Auswachsen von Kontroll-Explantaten, die ohne rekombinante Proteine kultiviert wurden, und das Wachstumsverhalten von EC-Explantaten unter dem Einfluß des jeweiligen Protein-Lösungsmittels (1 % BSA in PBS), die ebenfalls als Kontrollen dienen. Während in Abb. 4.14a das axonale Auswachsen der entorhinalen Schnittkulturen in Gegenwart von drei verschiedenen IFN- γ -Konzentrationen (100 pg/ml, 1 ng/ml, 10 ng/ml) dargestellt ist, zeigt Abb. 4.14b das Auswachsverhalten der EC-Explantate unter dem Einfluß von vier unterschiedlichen IL-4-Konzentrationen (100 pg/ml, 100 pg/ml, 1 ng/ml, 10 ng/ml). Weder die Kokultivierungen mit IFN- γ , dem Markerzytokin der Th1-Zellen, noch mit IL-4, dem Markerzytokin der Th2-Zellen, führten zu einer signifikanten Veränderung des axonalen Auswachsens im Vergleich zu den beiden Kontrollen.

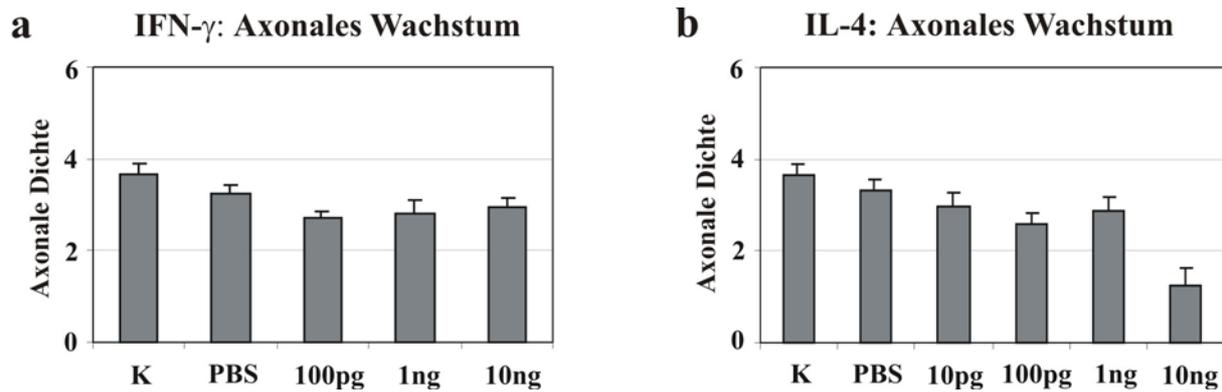


Abbildung 4.14: Einfluß rekombinanter Proteine auf das axonale Wachstum entorhinaler Kortex-Explantate.

Die rekombinanten Proteine IFN- γ und IL-4 wurden mit organotypischen entorhinalen Gewebeschnitten 2 Tage alter B10.PL Mäuse in einer dreidimensionalen Kollagenmatrix kokultiviert. Die Zugabe von IFN- γ in den Konzentrationen 100 pg/ml, 1 ng/ml und 10 ng/ml oder IL-4 in den Konzentrationen 10 pg/ml, 100 pg/ml, 1 ng/ml und 10 ng/ml erfolgte in die Kollagenmatrix. Als Kontrollen dienten EC-Explantate ohne Proteine sowie EC-Explantate, die mit dem jeweiligen Protein-Lösungsmittel kokultiviert wurden. Nach einer Inkubationszeit von 2 Tagen wurde die Dichte der ausgewachsenen Axone nach festgelegten morphologischen Kriterien analysiert. Dargestellt ist die axonale Dichte der proximalen Explantathälfte.

(a) IFN- γ , (b) IL-4. K = Kontrolle, d.h. Kultivierung ohne Proteine, PBS = Kokultivierung mit dem Protein-Lösungsmittel. Mean \pm S.E.M., n = 24.

Außerdem wurde der Einfluß der rekombinanten Proteine IL-10 (10 pg/ml, 100 pg/ml, 1 ng/ml, 10 ng/ml), NGF (10 pg/ml, 100 pg/ml, 1 ng/ml, 10 ng/ml), NT-3 (2 pg/ml, 20 pg/ml, 200 pg/ml, 10 ng/ml) und NT-4 (1 pg/ml, 10 pg/ml, 100 pg/ml, 10 ng/ml) auf das Auswachsverhalten der entorhinalen Kortex-Explantate untersucht. Auch in diesen Kokulturanätzen war keine Beeinflussung des axonalen Wachstums im Vergleich zu den Kontrollen nachzuweisen.

Zusätzlich zu diesen Experimenten, bei denen die rekombinanten Proteine anstelle der T-Zellen in die dreidimensionale Kollagenmatrix eingebracht wurden, erfolgte in einem weiteren Kokulturanatz die Zugabe von IFN- γ oder IL-4 in einer Konzentration von 50 ng/ml direkt in das Inkubationsmedium. Die Kontroll-Schnitte wurden in Inkubationsmedium mit dem entsprechenden Protein-Lösungsmittel kultiviert. Abb. 4.15 zeigt, daß beide rekombinanten Proteine auch in diesen Ansätzen keinen signifikanten Einfluß auf das Auswachsverhalten der entorhinalen Kortex-Explantate im Vergleich zur Kontrolle ausübten.

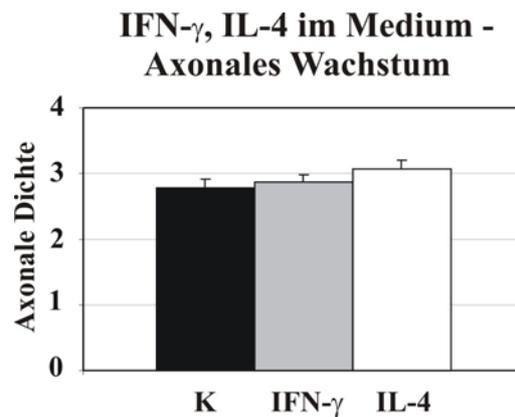


Abbildung 4.15: Einfluß rekombinanter Proteine auf das axonale Wachstum entorhinaler Kortex-Explantate.

Die rekombinanten Proteine IFN- γ und IL-4 wurden mit organotypischen entorhinalen Gewebeschnitten 2 Tage alter B10.PL Mäuse in einer dreidimensionalen Kollagenmatrix kokultiviert. Die Zugabe von IFN- γ oder IL-4 in der Konzentration 50 ng/ml erfolgte in das Inkubationsmedium. Als Kontrollen dienten EC-Explantate ohne Proteine. Nach einer Inkubationszeit von 2 Tagen wurde die Dichte der ausgewachsenen Axone nach festgelegten morphologischen Kriterien analysiert. Dargestellt ist die axonale Dichte der proximalen Explantathälfte.

K = Kontrolle, d.h. Kultivierung ohne Proteine, IFN- γ = Kokultivierung mit IFN- γ , IL-4 = Kokultivierung mit IL-4. Mean \pm S.E.M., n = 56.

4.2.3 Einfluß von T-Zellkulturüberständen auf das axonale Wachstum entorhinaler Kortex-Explantate

Zusätzlich zu diesen Versuchen wurden Th1- und Th2-Zellkulturüberstände MBP-spezifischer CD4⁺ T-Zellen mit entorhinalen Kortex-Explantaten kokultiviert, um die Effekte sezernierter T-Zell-Faktoren auf das axonale Wachstum zu analysieren. Als Kontrollen wurden EC-Explantate ohne Zugabe von Zellkulturüberständen inkubiert. Die Kokultivierungen sowie die semiquantitative Dichteausswertung der in die Kollagenmatrix eingewachsenen Axone erfolgten wie unter 3.2.5 und 3.2.7 beschrieben. Abb. 4.16 verdeutlicht, daß weder die Kokultivierungen mit Th1-Überstand noch mit Th2-Überstand zu einer signifikanten Veränderung des axonalen Auswachsens im Vergleich zur Kontrolle führten.

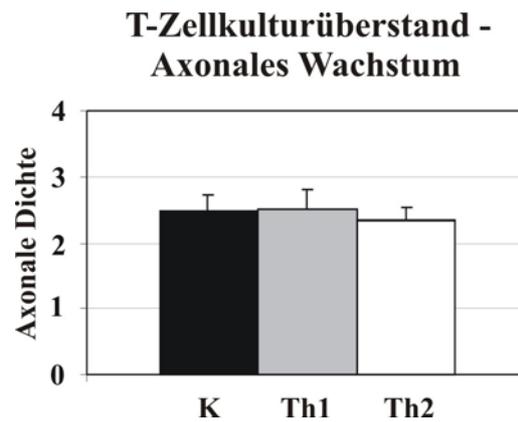


Abbildung 4.16: Einfluß von T-Zellkulturüberständen auf das axonale Wachstum entorhinaler Kortex-Explantate.

Die Zellkulturüberstände MBP-spezifischer CD4⁺ Th1- und Th2-Zellen wurden mit organotypischen entorhinalen Gewebeschnitten 2 Tage alter B10.PL Mäuse in einer dreidimensionalen Kollagenmatrix kokultiviert. Die Zugabe der Überstände erfolgte in die Kollagenmatrix. Als Kontrollen dienten EC-Explantate ohne Überstände. Nach einer Inkubationszeit von 2 Tagen wurde die Dichte der ausgewachsenen Axone nach festgelegten morphologischen Kriterien analysiert. Dargestellt ist die axonale Dichte der proximalen Explantathälfte.

K = Kontrolle, d.h. Kultivierung ohne Überstände, Th1 = Kokultivierung mit Th1-Überständen, Th2 = Kokultivierung mit Th2-Überständen. Mean ± S.E.M., n = 17.

4.2.4 Einfluß neutralisierender Antikörper auf das axonale Wachstum entorhinaler Kortex-Explantate

Mit Hilfe neutralisierender Antikörper sollten die beobachteten Effekte der Th1- und Th2-Zellen auf das axonale Wachstum entorhinaler Kortex-Explantate blockiert und somit beteiligte Faktoren näher untersucht bzw. charakterisiert werden. Der Schwerpunkt lag dabei auf der Analyse der durch Th2-Zellen induzierten Stimulation des axonalen Wachstums. Dafür wurden MBP-spezifische oder mit ConA unspezifisch stimulierte CD4⁺ Th1- und Th2-Zellen mit EC-Explantaten wie unter 3.2.3 und 3.2.6 erläutert kokultiviert und spezifisch inhibierende Antikörper oder unspezifische Kontroll-Antikörper (Isotypkontrollen) bzw. das entsprechende Lösungsmittel zugegeben. Nach 2 Inkubationstagen wurde die Dichte der in die Kollagenmatrix eingewachsenen Axone wie unter 3.2.7 beschrieben ermittelt und mit den Kontrollen verglichen. Führt die Zugabe der spezifischen Antikörper zu einer Herabsetzung oder sogar Aufhebung der zuvor in den Kollagen-Kokulturen beobachteten Effekte, konnte davon ausgegangen werden, daß der jeweilige inhibierte Faktor eine Rolle bei diesen Vorgängen spielt.

Für die Auswertung wurde jeweils die axonale Dichte der dem Zellaggregat zugewandten Explantathälfte ermittelt und als Maß für das axonale Wachstum herangezogen.

In den nachfolgenden Diagrammen sind die Kontroll-Explantate, die ohne T-Zellen inkubiert wurden, sowie die Kokulturen mit Th1- und Th2-Zellen dargestellt. Verglichen wurden dabei immer die Ergebnisse des spezifisch blockierenden Antikörpers mit den Ergebnissen des entsprechenden unspezifischen Antikörpers bzw. des Lösungsmittels. Für eine möglichst einfache Darstellung wurden die Dichtewerte der Isotyp/Lösungsmittel-Kontrollen gleich 100 % gesetzt und die Werte aus den Blockierungsansätzen jeweils als prozentualer Anteil davon angegeben.

Da die ELISA-Analyse der T-Lymphozyten gezeigt hat, daß Th2-Zellen am Tag 5 bzw. 6 nach ihrer Restimulation signifikant höhere Level der Neurotrophen Faktoren NGF, NT-3 und NT-4 sezernierten und diese bereits als neuronale Wachstumsfaktoren bekannt sind, wurde als erstes der Effekt funktionsblockierender Antikörper gegen diese Neurotrophine bzw. eine gleichzeitige Blockierung aller drei Faktoren untersucht. Die Abb. 4.17a bis d zeigen sowohl bei den Kontroll-Explantaten als auch bei den Kokultivierungen mit Th1- bzw. Th2-Zellen eine deutliche Reduktion des axonalen Wachstums durch die spezifisch blockierenden Antikörper im Vergleich zu den unspezifischen Kontroll-Antikörpern. Bei Zugabe des spezifischen anti NT-3-Antikörpers war eine signifikante Inhibition des axonalen Auswachsens auf 78,5 % bei den Kontrollen, auf 70,8 % bei den Th1-Kokulturen und auf 71,3 % bei den Th2-Kokulturen zu beobachten (Abb. 4.17a; $p < 0,05$). Der spezifische anti NT-4-Antikörper reduzierte das axonale Wachstum der EC-Explantate signifikant auf 66,7 % bei den Kontrollen ($p < 0,05$), auf 60,1 % bei den Th1-Kokulturen ($p < 0,005$) und auf 61,1 % bei den Th2-Kokulturen (Abb. 4.17b; $p < 0,005$). Der Zusatz des spezifischen anti NGF-Antikörpers bewirkte eine signifikante Reduktion des axonalen Auswachsens auf 61,8 % bei den Kontrollen, auf 58,8 % bei den Th1-Kokulturen und auf 69,6 % bei den Th2-Kokulturen (Abb. 4.17c; $p < 0,005$). Die gleichzeitige Blockierung von NT-3, NT-4 und NGF zeigte ebenfalls eine signifikante Inhibition des axonalen Wachstums und führte sogar zu einem leichten synergistischen Effekt im Vergleich zu den Einzelblockierungen. Das axonale Auswachsen wurde hier bei den Kontroll-Explantaten auf 81,8 % , bei den Th1-Kokulturen auf 61,1 % und bei den Th2-Kokulturen auf 45,2 % reduziert (Abb. 4.17d; $p < 0,005$). Da in allen Blockierungsansätzen eine deutliche Inhibition des axonalen Wachstums der EC-Explantate zu erkennen war, konnte davon ausgegangen werden, daß die Neurotrophine NGF, NT-3 und NT-4 eine Rolle bei diesen Auswachsvorgängen spielen und auch an der Th2-induzierten Stimulation des axonalen Wachstums beteiligt sind.

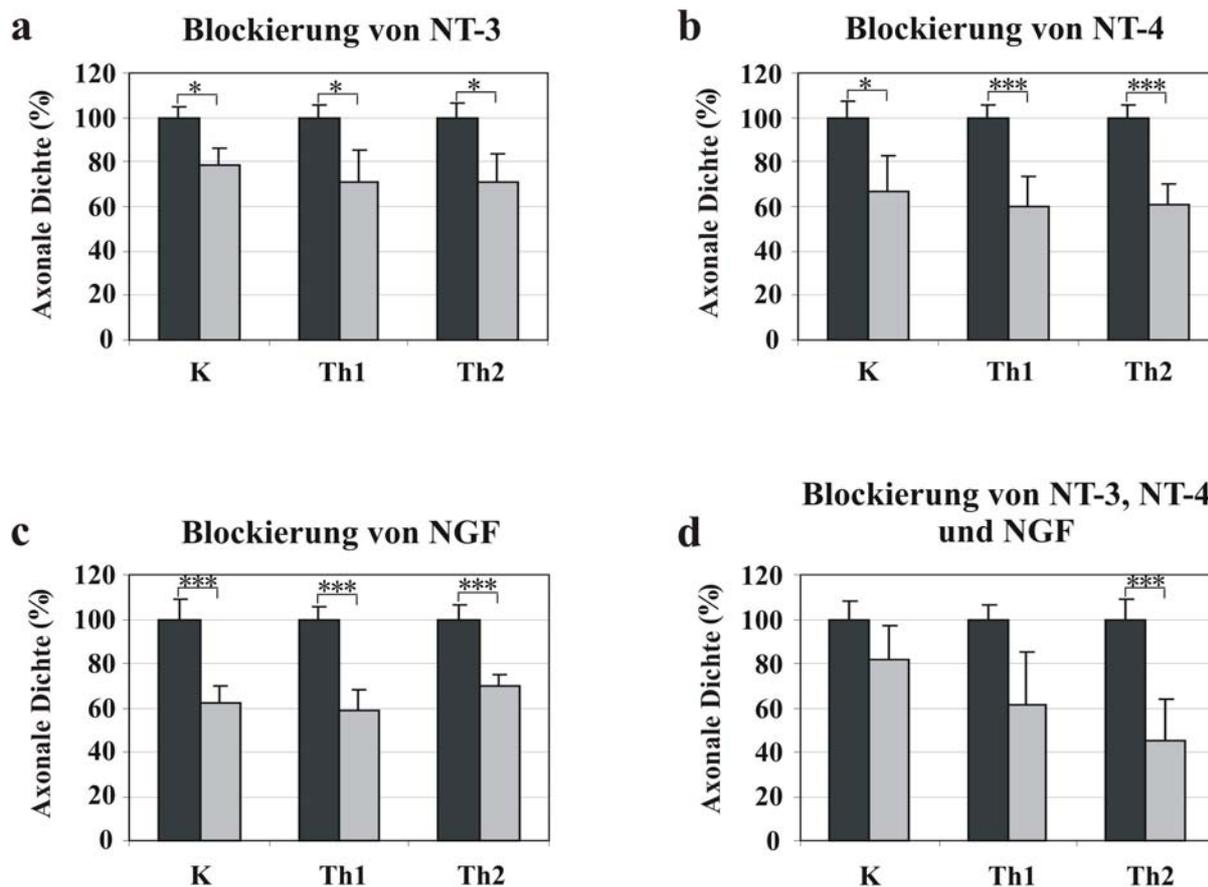


Abbildung 4.17: Einfluß neutralisierender Antikörper auf das axonale Wachstum entorhinaler Kortex-Explantate.

MBP-spezifische CD4⁺ Th1- und Th2-Zellen wurden mit organotypischen entorhinalen Gewebeschnitten 2 Tage alter B10.PL Mäuse in einer dreidimensionalen Kollagenmatrix kokultiviert. Als Kontrollen dienten EC-Explantate ohne T-Zellen. Zusätzlich erfolgte die Zugabe spezifisch blockierender Antikörper gegen NT-3, NT-4 und NGF sowie unspezifischer Kontroll-Antikörper in die Kollagenmatrix. Nach einer Inkubationszeit von 2 Tagen wurde die Dichte der ausgewachsenen Axone nach festgelegten morphologischen Kriterien analysiert. In die Auswertung ging jeweils die axonale Dichte der proximalen Explantathälfte ein. Dabei wurden die Dichtewerte der Isotypkontrollen gleich 100 % gesetzt und die Werte aus den spezifischen Blockierungsansätzen jeweils als prozentualer Anteil davon angegeben.

(a) Blockierung von NT-3, (b) Blockierung von NT-4, (c) Blockierung von NGF, (d) gleichzeitige Blockierung von NT-3, NT-4 und NGF. ■ = unspezifischer Kontroll-Antikörper, □ = spezifisch blockierender Antikörper. K = Kontrolle, d.h. Kultivierung ohne T-Zellen, Th1 = Kokultivierung mit Th1-Zellen, Th2 = Kokultivierung mit Th2-Zellen. Mean ± S.E.M., n = 12, * = p < 0,05, *** = p < 0,005.

Ausgehend von dieser Tatsache und dem Wissen, daß Neurotrophe Faktoren ihre Wirkungen über Neurotrophin-Rezeptoren der Tyrosin-Kinase (Trk)-Familie sowie p75 vermitteln, erfolgte zusätzlich eine Blockade der Neurotrophin-Rezeptoren in den Kollagen-Kokulturen. Dadurch sollte überprüft werden, ob das axonale Wachstum sowie die Th2-induzierte Stimulation des axonalen Auswachsens über diese Neurotrophin-Rezeptoren reguliert werden. Außerdem ermöglicht die Blockade der Neurotrophin-Rezeptoren eine genauere Aussage über die Beteiligung der Neurotrophin-Faktoren an axonalen Auswachsungsvorgängen.

Für diese Blockierungsexperimente wurde K252a, ein nicht-selektiver Inhibitor der Tyrosin-Kinase-Aktivität, verwendet. Durch die Zugabe niedriger Konzentrationen (10 μmol) konnte jedoch eine spezifische Blockierung der Neurotrophin-Rezeptoren TrkA, TrkB und TrkC erreicht werden. Abb. 4.18 zeigt sowohl bei den Kontroll-Explantaten als auch bei den Kokultivierungen mit Th1- bzw. Th2-Zellen eine vollständige Eliminierung des axonalen Wachstums ($p < 0,005$). Dies ist ein deutlicher Hinweis, daß die Neurotrophin-Rezeptoren eine wichtige Rolle bei den zuvor beobachteten axonalen Auswuchsvorgängen spielen, d.h. maßgeblich am axonalen Wachstum, insbesondere an der Th2-induzierten Stimulation des axonalen Auswachsens beteiligt sind.

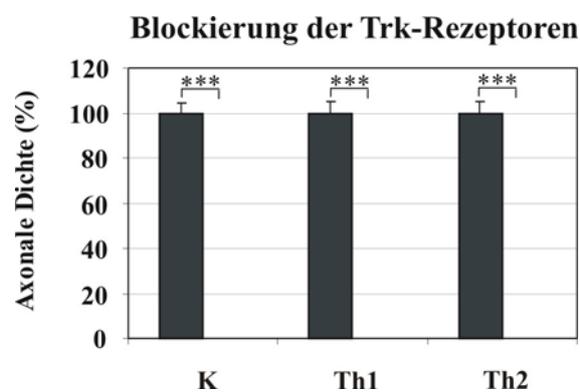


Abbildung 4.18: Einfluß neutralisierender Antikörper auf das axonale Wachstum entorhinaler Kortex-Explantate.

Unspezifisch mit ConA aktivierte CD4⁺ Th1- und Th2-Zellen wurden mit organotypischen entorhinalen Gewebeschnitten 2 Tage alter B10.PL Mäuse in einer dreidimensionalen Kollagenmatrix kokultiviert. Als Kontrollen dienten EC-Explantate ohne T-Zellen. Zusätzlich erfolgte die Zugabe des Tyrosin-Kinase-Inhibitors K252a und des entsprechenden Lösungsmittels in die Kollagenmatrix. Nach einer Inkubationszeit von 2 Tagen wurde die Dichte der ausgewachsenen Axone nach festgelegten morphologischen Kriterien analysiert. In die Auswertung ging jeweils die axonale Dichte der proximalen Explantathälfte ein. Dabei wurden die Dichtewerte der Lösungsmittelkontrollen gleich 100 % gesetzt und die Werte aus den spezifischen Blockierungsansätzen jeweils als prozentualer Anteil davon angegeben.

■ = Lösungsmittel, □ = K252a. K = Kontrolle, d.h. Kultivierung ohne T-Zellen, Th1 = Kokultivierung mit Th1-Zellen, Th2 = Kokultivierung mit Th2-Zellen. Mean \pm S.E.M., n = 12, *** = $p < 0,005$.

4.2.5 Zusammenhang zwischen axonaler Dichte und axonaler Länge entorhinaler Kortex-Explantate

Zur Beurteilung des axonalen Wachstums der EC-Explantate in den verschiedenen Kollagen-Kokulturansätzen wurde bisher immer nur die axonale Dichte als Auswertkriterium herangezogen. Neben der Analyse der axonalen Dichte wurden die in die dreidimensionale Kollagenmatrix eingewachsenen Axone aber auch in Bezug auf ihre Länge ausgewertet. Die Längenauswertung der Axone erfolgte wie unter 3.2.7 beschrieben, indem die 10 längsten sichtbaren Neuriten in jeder der vier Explantatregionen gemessen wurden.

Daraus errechnete sich für jede Explantatregion ein Mittelwert und dieser Wert konnte dem jeweiligen zuvor bestimmten axonalen Dichtegrad dieser Region zugeordnet werden. Die gemessene Länge der Axone wurde in μm angegeben und ist in Bezug auf die axonalen Dichtegrade 1, 2 und 3 in Abb. 4.19 dargestellt. Für den Grad 1 der axonalen Dichte wurde eine durchschnittliche Länge der Neuriten von $10,4 \mu\text{m}$ ermittelt. Durchschnittlich $13,6 \mu\text{m}$ lang waren die Axone im Dichtegrad 2 und für den Grad 3 ergab sich ein durchschnittlicher Längenwert von $17,9 \mu\text{m}$. Die Unterschiede in den Neuritenlängen waren zwischen den Dichtegraden 1 und 2, 1 und 3 sowie zwischen 2 und 3 jeweils signifikant ($p < 0,05$). In dem Diagramm ist zu erkennen, daß eine größere axonale Dichte auch mit einem stärkeren Längenwachstum der Axone korreliert.

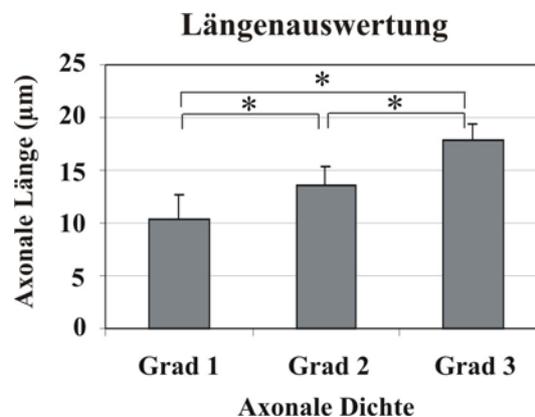


Abbildung 4.19: Zusammenhang zwischen axonaler Dichte und axonaler Länge entorhinaler Kortex-Explantate.

Die Bestimmung der axonalen Länge erfolgte mittels eines Rasterokulars mit definierter Längeneinteilung. Dabei wurden die 10 längsten sichtbaren Neuriten in jeder Explantatregion gemessen und dem zuvor bestimmten axonalen Dichtegrad dieser Region zugeordnet. Dargestellt ist die Länge der Axone in μm in Bezug auf die axonalen Dichtegrade 1, 2 und 3.

Mean \pm S.E.M., n = 65, * = $p < 0,05$.

4.3 Membran-Kokulturen

Da in den Kollagen-Kokulturen keine immunhistochemische Analyse der organotypischen entorhinalen Kortex-Explantate möglich war und außerdem kollagenfreie Kokulturüberstände für eine ELISA-Analyse gewonnen werden sollten, erfolgte der Einsatz eines weiteren Kokulturmodells. Auch in diesem Modell wurden Th1- und Th2-Zellen mit organotypischen entorhino-hippokampalen Gewebeschnitten kokultiviert, wobei jedoch die T-Zellen durch eine Membran von den Explantaten getrennt waren. Da somit kein direkter Zell-Zell-Kontakt zwischen ihnen bestand, konnte der Einfluß sezernierter T-Zell-Faktoren auf primär geschädigtes Hirngewebe untersucht werden.

4.3.1 Analyse der Neurotrophin-Expression

Die Kokultivierung der MBP-spezifischen CD4⁺ Th1- und Th2-Zellen mit den organotypischen Gewebeschnitten erfolgte wie unter 3.3.3 ausführlich beschrieben. Nach einer Inkubationszeit von 3 Tagen wurden die Kokulturmedien für die ELISA-Analyse abgenommen. Die Ergebnisse der Neurotrophin- bzw. Neurotrophin-Rezeptor-Blockierungen deuten darauf hin, daß axonales Auswachsen, insbesondere die Th2-induzierte Stimulation des axonalen Wachstums Neurotrophin-vermittelt sind. Es ist bisher jedoch nicht eindeutig klar, ob es sich dabei um einen direkten Effekt der Th2-Neurotrophine oder um eine indirekte Modulation der astrozytären Neurotrophin-Sekretion handelt. Deshalb wurde zunächst analysiert, ob es bei der Kokultivierung von Explantaten mit T-Zellen überhaupt zu einer Veränderung der Neurotrophinlevel im Kokulturmedium kommt. Dafür wurden die Konzentrationen der Neurotrophin Faktoren NGF, NT-3 und NT-4 mittels ELISA bestimmt. Die Abb. 4.20a bis c zeigen jeweils die Neurotrophinmengen, die von den Th1- bzw. Th2-Zellen und vom Explantat allein sezerniert wurden. Es ist zu erkennen, daß die Th2-Zellen im Vergleich zu den Th1-Zellen signifikant höhere Konzentrationen an NT-3, NT-4 sowie NGF produzierten ($p < 0,05$). Während die Th2-Zellen dabei maximale Werte von 45 pg/ml für NT-3, 10 pg/ml für NT-4 und 30 pg/ml für NGF erreichten, lagen die von den Th1-Zellen sezernierten Mengen bei NT-3 nur knapp über der Nachweisgrenze von 4,7 pg/ml und bei NT-4 sowie NGF sogar unter der jeweiligen Nachweisgrenze von 4,7 pg/ml bzw. 7,8 pg/ml. Die Explantate allein sezernierten wiederum mit Konzentrationen von 90 pg/ml NT-3, 50 pg/ml NT-4 sowie 65 pg/ml NGF signifikant größere Neurotrophinmengen als beide T-Zell-Subpopulationen ($p < 0,05$). Im Vergleich dazu sind die Neurotrophinkonzentrationen dargestellt, die in den Kokulturen der Th1- oder Th2-Lymphozyten mit den Explantaten gemessen wurden. Weder die Kokultivierungen mit Th1-Zellen noch mit Th2-Zellen führten zu einer signifikanten Veränderung der Neurotrophinlevel im Unterstand. Die hier ermittelten Konzentrationen an NT-3, NT-4 und NGF entsprachen ungefähr den Mengen, die von den Explantaten allein sezerniert wurden (105 pg/ml NT-3, 45 bis 55 pg/ml NT-4 und 40 bis 60 pg/ml NGF).

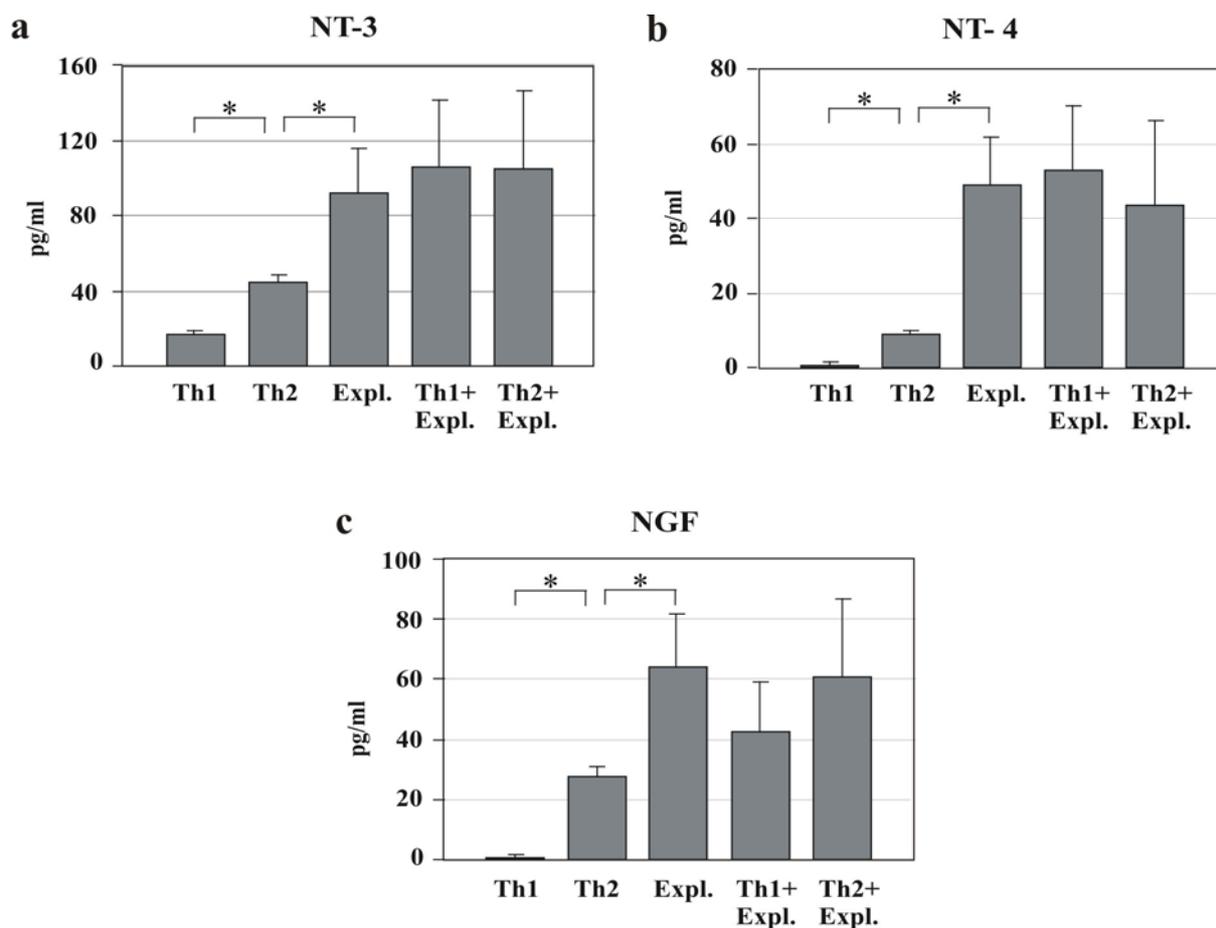


Abbildung 4.20: Einfluß von T-Zellen auf die Neurotrophin-Expression entorhino-hippokampaler Explantate.

MBP-spezifische CD4⁺ Th1- und Th2-Zellen wurden mit organotypischen entorhino-hippokampalen Gewebeschnitten 2 Tage alter B10.PL Mäuse kokultiviert, wobei die T-Zellen durch eine semipermeable Filtermembran von den Explantaten getrennt waren. Als Kontrollen dienten Explantate ohne T-Zellen. Nach einer Inkubationszeit von 6 Tagen wurden die Kokulturmedien hinsichtlich ihrer Neurotrophin-Expression mittels ELISA untersucht. Dargestellt sind die gemessenen Neurotrophinkonzentrationen in pg/ml.

(a) NT-3, **(b)** NT-4, **(c)** NGF. Th1 = Th1-Zellen allein, Th2 = Th2-Zellen allein, Expl. = Explantat allein, Th1 + Expl. = Kokultivierung mit Th1-Zellen, Th2 + Expl. = Kokultivierung mit Th2-Zellen. Mean \pm S.E.M., n = 5, * = p < 0,05.

4.3.2 Analyse der Neurotrophin-Rezeptor-Expression

Zusätzlich zu der Neurotrophin-Sekretion im Kokulturmedium wurde auch die Neurotrophin-Rezeptor-Expression an den Hirnschnitten immunhistochemisch untersucht. Es sollte herausgefunden werden, welche Zellen die entsprechenden Neurotrophin-Rezeptoren exprimieren und ob sich die Neurotrophin-Rezeptor-Expression unter dem Einfluß von T-Zellen oder rekombinanten Proteinen verändert.

Dafür wurden MBP-spezifische CD4⁺ Th1- bzw. Th2-Zellen oder rekombinante Proteine mit organotypischen entorhino-hippokampalen Gewebeschnitten wie unter 3.3.3 und 3.3.4 beschrieben kokultiviert.

Nach einer Inkubationszeit von 3 Tagen konnten alle Explantate fixiert und am Kryostaten geschnitten werden (siehe 3.3.5). Anschließend erfolgte eine immunhistochemische Analyse der Kontroll-Explantate, die ohne T-Zellen oder rekombinante Proteine kultiviert wurden. An diesen Schnitten wurde überprüft, welche Zellen die Neurotrophin-Rezeptoren TrkA, TrkB, TrkC und p75NTR exprimieren. Hierfür wurden Neurone (Neurofilament), Astrozyten (GFAP) und Mikroglia (GFS-IB4) mit einem für sie spezifischen und der eindeutigen Identifizierung dienenden Marker gefärbt. Anschließend erfolgten die Doppelfärbungen mit den Markern für die Neurotrophin-Rezeptoren. Auf den Fotos 4.21 ist zu erkennen, daß die Neurotrophin-Rezeptoren TrkA, TrkB, TrkC und p75 hauptsächlich auf Neuronen lokalisiert waren. Im Vergleich dazu ist die Anzahl der Neurotrophin-Rezeptor-exprimierenden Astrozyten und Mikroglia stark begrenzt. Auf diesem Wege konnte gezeigt werden, daß neuronale Zellen eine charakteristische Empfänglichkeit für Neurotrophine besitzen und demzufolge auch mit axonalem Wachstum auf sie reagieren können.

Als nächstes wurde untersucht, ob es bei der Kokultivierung von Hirnschnitten mit T-Lymphozyten zu einer Beeinflussung dieser Neurotrophin-Empfänglichkeit neuronaler Zellen, d.h. zu einer Veränderung der Neurotrophin-Rezeptor-Expression kommt. Dafür wurden die Neurotrophin-Rezeptoren TrkA, TrkB, TrkC und p75 in allen Kokultur-Explantaten gefärbt. Die Ergebnisse dieser Einzelfärbungen sind in den Abb. 4.22 und den Diagrammen 4.23 zusammengefaßt. Auf den Fotos 4.22a bis l sind die Neurotrophin-Rezeptor-Expressionen der Th1- und der Th2-Kokultur-Explantate im Vergleich zu den Kontroll-Explantaten dargestellt, wobei jeweils ein Ausschnitt des entorhinalen Kortex abgebildet ist. Bei den Färbungen der TrkA-, TrkB- und TrkC-Rezeptoren zeigten die Explantate, die mit Th2-Zellen kokultiviert wurden, eine deutlich stärkere Fluoreszenzintensität als die Th1-Kokulturen und die Kontrollen (Abb. 4.22a bis i). Bei der p75NTR-Färbung konnte ein deutlich stärkeres Fluoreszenzsignal sowohl bei den Th1- als auch bei den Th2-Kokultur-Explantaten im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden (Abb. 4.22j bis l). Anhand dieser Fotos wurde nun mit Hilfe der Metamorph-Software die Größe der Fläche ermittelt, die eine über dem zuvor an einem Kontroll-Explantat festgelegten Schwellenwert liegende Fluoreszenzintensität aufwies. In den Diagrammen 4.23a bis d ist jeweils der prozentuale Anteil der Rezeptor-positiven Fläche an der Gesamtbildfläche, die bei allen Fotos gleich groß war, dargestellt. Somit konnten indirekt über die Größe der gefärbten Fläche die Fluoreszenzintensitäten der Th1- bzw. Th2-Kokulturen mit den Kontrollen verglichen werden.

Neurotrophin-Rezeptor-Expression auf Neuronen

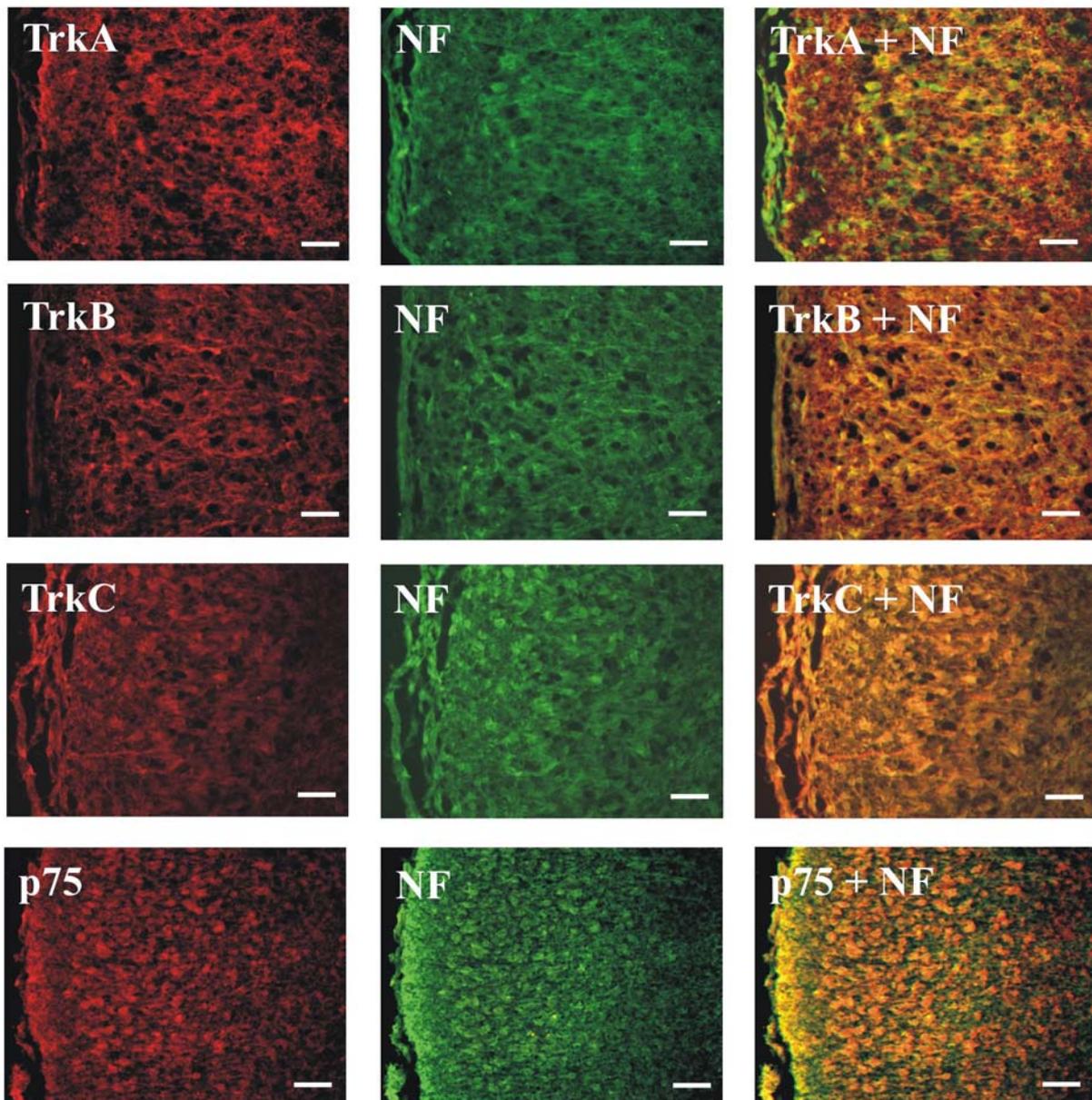


Abbildung 4.21: Immunhistochemische Doppelfärbung von Neuronen und Neurotrophin-Rezeptoren an entorhino-hippokampalen Explantaten.

Die Bilder zeigen horizontale Kryostatschnitte der organotypischen entorhino-hippokampalen Gewebekulturen 2 Tage alter B10.PL Mäuse 6 Tage nach ihrer Präparation. Die Neurone wurden mit einem spezifischen Antikörper gegen Neurofilament markiert und anschließend mit den Markern für die Neurotrophin-Rezeptoren TrkA (a), TrkB (b), TrkC (c) sowie p75NTR (d) doppelt gefärbt. Dargestellt ist jeweils ein Ausschnitt des entorhinalen Kortex. Der Balken entspricht einer Länge von 100 µm.

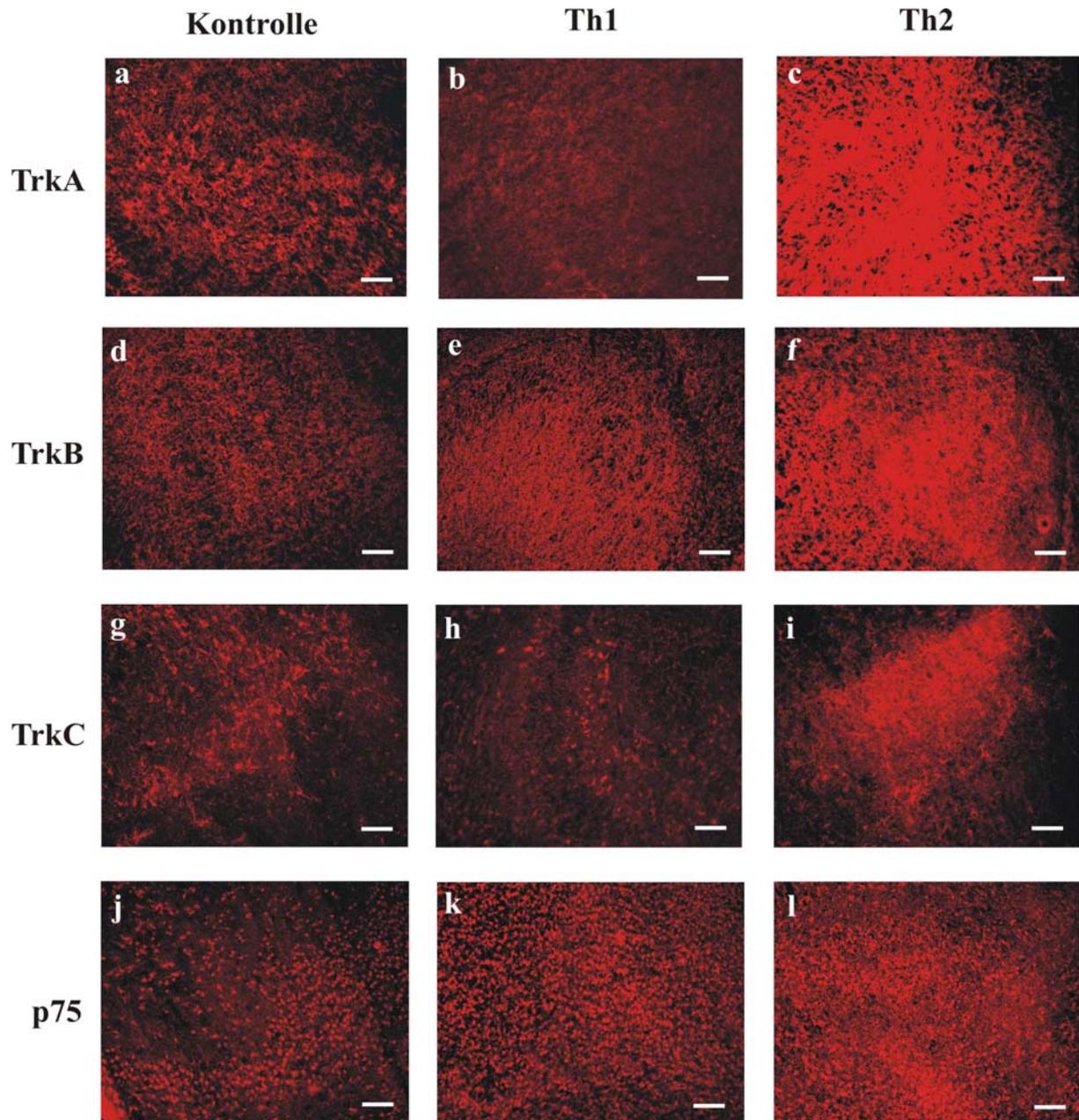


Abbildung 4.22: Immunhistochemische Färbung von Neurotrophin-Rezeptoren an entorhino-hippokampalen Explantaten nach Kokultivierung mit T-Zellen.

Die Bilder zeigen horizontale Kryostatschnitte der organotypischen entorhino-hippokampalen Gewebekulturen 2 Tage alter B10.PL Mäuse 6 Tage nach ihrer Präparation und Kokultivierung mit MBP-spezifischen CD4⁺ Th1- oder Th2-Zellen. Die Neurotrophin-Rezeptoren wurden mit spezifischen Antikörpern gegen TrkA (**a, b, c**), TrkB (**d, e, f**), TrkC (**g, h, i**) sowie p75NTR (**j, k, l**) markiert. Die Bilder zeigen die Färbungen der Th1 (**b, e, h, k**)- und Th2 (**c, f, i, l**)-Kokultur-Explantate im Vergleich zu den Kontroll-Explantaten (**a, d, g, j**). Dargestellt ist jeweils ein Ausschnitt des entorhinalen Kortex. Der Balken entspricht einer Länge von 100 μm .

Die Abb. 4.23a zeigt, daß die Th2-Zellen eine signifikante Hochregulation der TrkA-Rezeptoren im Vergleich zur Kontrolle und zu den Th1-Zellen bewirkten ($p < 0,01$). Ebenso war bei den Th2-Kokulturen eine signifikante Hochregulation der TrkB-Rezeptoren im Vergleich zur Kontrolle zu beobachten (Abb. 4.23b; $p < 0,01$). Auch die TrkC-Rezeptoren wurden unter dem Einfluß von Th2-Zellen signifikant stärker exprimiert als bei den Th1-Kokulturen und den Kontrollen (Abb. 4.23c; $p < 0,05$). Abb. 4.23d zeigt, daß die p75-Rezeptoren sowohl von den Th1- als auch von den Th2-Zellen im Vergleich zur Kontrolle signifikant hochreguliert wurden ($p < 0,005$).

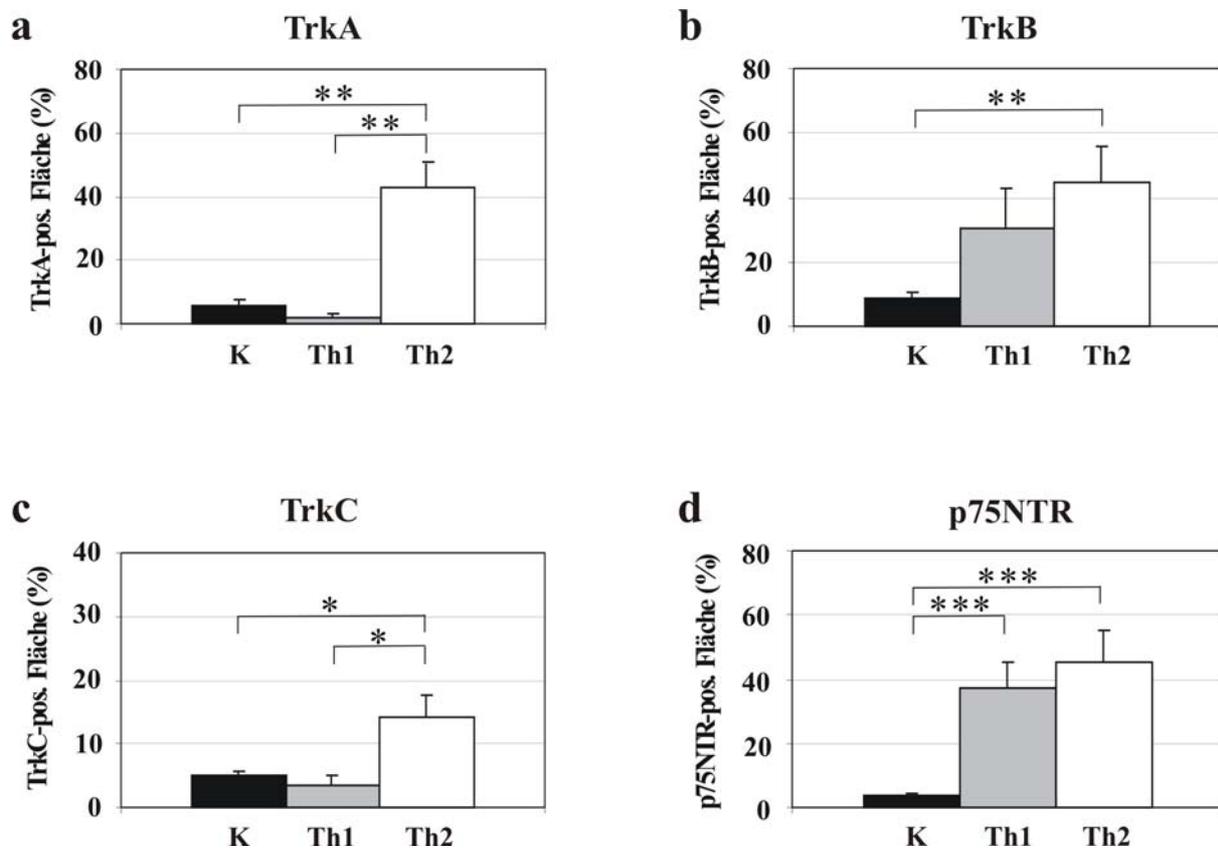


Abbildung 4.23: Einfluß von T-Zellen auf die Neurotrophin-Rezeptor-Expression entorhino-hippokampaler Explantate.

MBP-spezifische CD4⁺ Th1- und Th2-Zellen wurden mit organotypischen entorhino-hippokampalen Gewebeschnitten 2 Tage alter B10.PL Mäuse kokultiviert, wobei die T-Zellen durch eine semipermeable Filtermembran von den Explantaten getrennt waren. Als Kontrollen dienten Explantate ohne T-Zellen. Nach einer Inkubationszeit von 6 Tagen wurden die Explantate hinsichtlich ihrer Neurotrophin-Rezeptor-Expression immunhistochemisch untersucht. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Rezeptor-positiven Fläche an der Gesamtbildfläche.

(a) TrkA, (b) TrkB, (c) TrkC, (d) p75NTR. K = Kontrolle, d.h. Kultivierung ohne T-Zellen, Th1 = Kokultivierung mit Th1-Zellen, Th2 = Kokultivierung mit Th2-Zellen. Mean \pm S.E.M., n = 6, * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,005$.

Zusätzlich erfolgte der Einsatz rekombinanter Proteine in den Membran Kokulturen, um den Einfluß löslicher T-Zell-Faktoren auf die Neurotrophin-Rezeptor-Expression zu untersuchen. Anstelle der Th1- und Th2-Zellen wurden deren Markerzytokine IFN- γ (50 ng/ml) und IL-4 (50 ng/ml) mit den organotypischen entorhino-hippokampalen Gewebeschnitten kokultiviert und anschließend die Neurotrophin-Rezeptoren TrkA, TrkB, TrkC und p75 immunhistochemisch analysiert. Die Ergebnisse dieser Rezeptor-Färbungen sind in den Abb. 4.24 und den Diagrammen 4.25 dargestellt. Die Fotos 4.24a bis l zeigen die Neurotrophin-Rezeptor-Expressionen der Explantate, die mit IFN- γ oder IL-4 kokultiviert wurden, im Vergleich zu den Kontroll-Explantaten, die mit dem Protein-Lösungsmittel (1 % BSA in PBS) inkubiert wurden. Auch hier ist jeweils ein Ausschnitt des entorhinalen Kortex dargestellt. Bei allen Rezeptoren ist zu erkennen, daß weder die Kokultivierungen mit IFN- γ noch mit IL-4 eine Veränderung der Fluoreszenzintensität im Vergleich zur Kontrolle bewirkten. In den Diagrammen 4.25a bis d ist für jeden Rezeptor wieder der prozentuale Anteil der Rezeptor-positiven Fläche an der Gesamtbildfläche angegeben, um die Fluoreszenzintensitäten der Kokulturen mit den Kontrollen zu vergleichen. Die Diagramme zeigen, daß beide rekombinanten Proteine zwar einen tendenziellen, aber nicht statistisch signifikanten Einfluß auf die Neurotrophin-Rezeptor-Expressionen ausübten.

Weiterhin wurden die Effekte der rekombinanten Proteine IL-10 (50 ng/ml), IL-13 (50 ng/ml) und NGF (50 ng/ml) auf die entorhino-hippokampalen Schnittkulturen untersucht. Auch in diesen Kokulturansätzen war keine signifikante Beeinflussung der Neurotrophin-Empfänglichkeit im Vergleich zu den Kontrollen nachzuweisen.

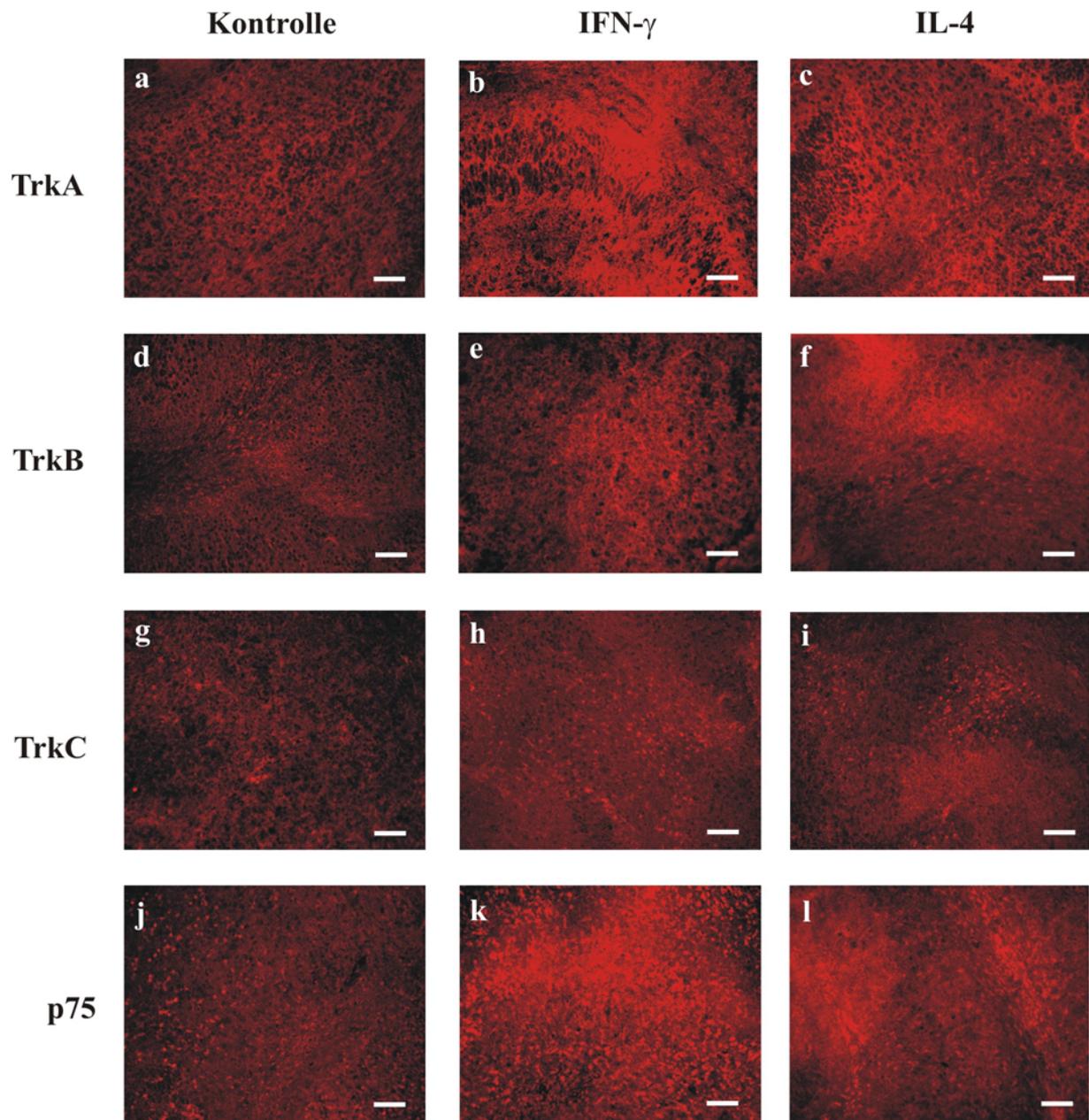


Abbildung 4.24: Immunhistochemische Färbung von Neurotrophin-Rezeptoren an entorhino-hippokampalen Explantaten nach Kokultivierung mit rekombinanten Proteinen.

Die Bilder zeigen horizontale Kryostatschnitte der organotypischen entorhino-hippokampalen Gewebekulturen 2 Tage alter B10.PL Mäuse 6 Tage nach ihrer Präparation und Kokultivierung mit IFN- γ oder IL-4. Die Neurotrophin-Rezeptoren wurden mit spezifischen Antikörpern gegen TrkA (a, b, c), TrkB (d, e, f), TrkC (g, h, i) sowie p75NTR (j, k, l) markiert. Die Bilder zeigen die Färbungen der IFN- γ (b, e, h, k)- und IL-4 (c, f, i, l)-Kokultur-Explantate im Vergleich zu den Kontroll-Explantaten (a, d, g, j). Dargestellt ist jeweils ein Ausschnitt des entorhinalen Kortex. Der Balken entspricht einer Länge von 100 μ m.

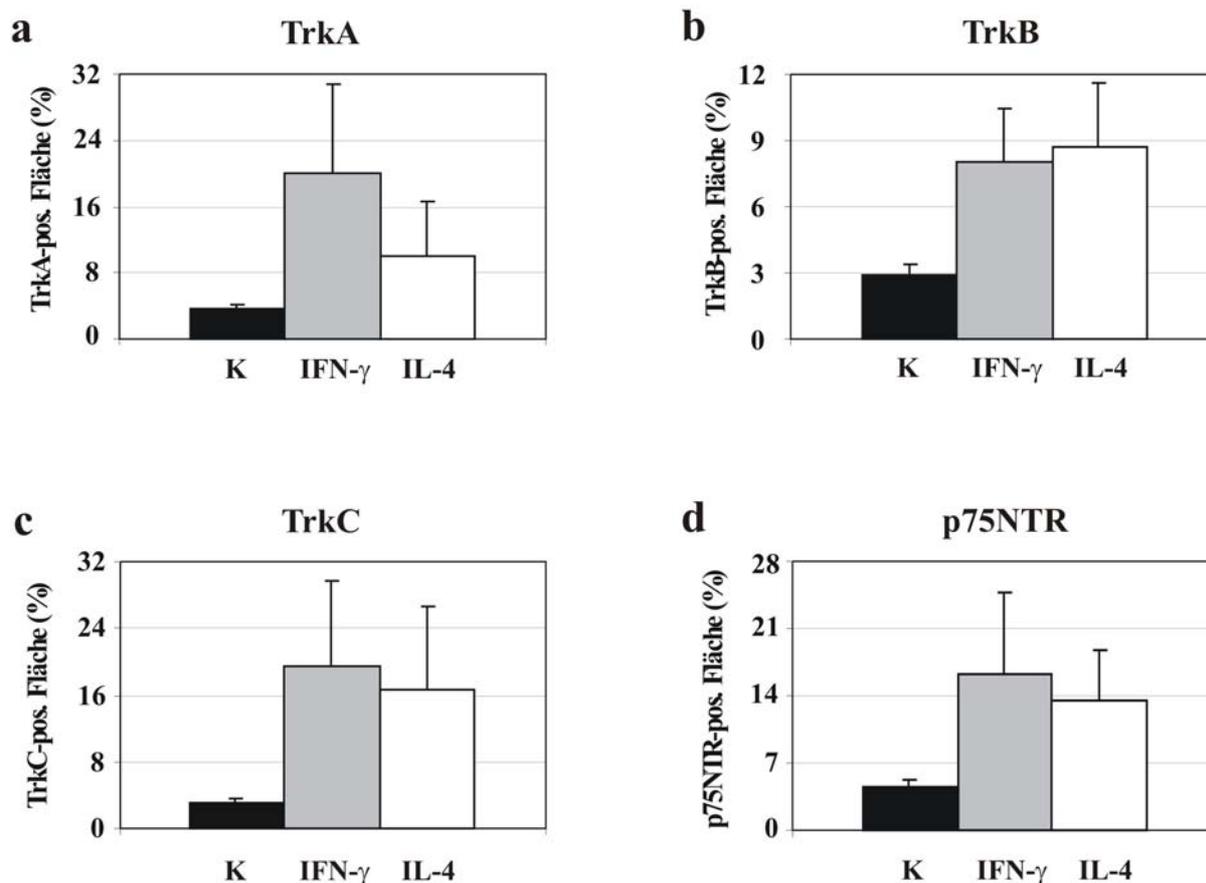


Abbildung 4.25: Einfluß von rekombinanten Proteinen auf die Neurotrophin-Rezeptor-Expression entorhino-hippokampaler Explantate.

IFN- γ und IL-4 (50 ng/ml) wurden mit organotypischen entorhino-hippokampalen Gewebeschnitten 2 Tage alter B10.PL Mäuse kokultiviert, wobei die Proteine durch eine semipermeable Filtermembran von den Explantaten getrennt waren. Als Kontrollen dienten Explantate, die mit dem jeweiligen Protein-Lösungsmittel kokultiviert wurden. Nach einer Inkubationszeit von 6 Tagen wurden die Explantate hinsichtlich ihrer Neurotrophin-Rezeptor-Expression immunhistochemisch untersucht. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Rezeptor-positiven Fläche an der Gesamtbildfläche.

(a) TrkA, (b) TrkB, (c) TrkC, (d) p75NTR. K = Kontrolle, d.h. Kultivierung mit dem Proteinlösungsmittel, IFN- γ = Kokultivierung mit IFN- γ , IL-4 = Kokultivierung mit IL-4. Mean \pm S.E.M., n = 8.

4.4 Entorhinale Kortex-Läsion und T-Zellinjektion

Im letzten Teil der Arbeit wurde überprüft, ob sich die T-Zell-vermittelte Stimulation des axonalen Wachstums auch *in vivo* reproduzieren läßt. Hierzu wurden Untersuchungen am Modell der entorhinalen Kortex-Läsion (ECL) durchgeführt.

Direkt im Anschluß an die Durchtrennung des Tractus perforans, der Hauptprojektion des entorhinalen Kortex zum Hippokampus, wurden den Kontrolltieren 5 μ l PBS und den Testtieren je 1×10^4 Th1- oder Th2- Zellen in 5 μ l PBS in die Läsionsstelle injiziert. Nach einer Überlebenszeit von 14 Tagen konnten die Gehirne fixiert, entnommen und am Kryostaten geschnitten werden (siehe 3.4.2).

Anschließend wurde das axonale Auswachsen nach der ECL immunhistochemisch mit Hilfe eines Antikörpers gegen GAP43 untersucht. GAP43 ist ein Membranprotein, welches vor allem von sich entwickelnden und regenerierenden Neuronen exprimiert wird und somit eine wichtige Rolle bei axonalen Auswachsvorgängen und der Ausbildung neuer synaptischer Verbindungen spielt. Die Analyse dieser GAP43-Expression diente deshalb als Marker für axonales Wachstum nach der ECL.

In den Abb. 4.26 und 4.27 sind die Ergebnisse dieser Versuche zusammengefaßt. Auf den Fotos 4.26a bis f sind die Körnerzellen des Gyrus dentatus und die sich daran anschließende Molekularschicht, welche sich in eine innere und eine äußere Schicht gliedert, dargestellt. Die GAP43-Färbung erstreckt sich dabei über die innere Molekularschicht, in welcher die Assoziations- und Kommissurenfasern terminieren und dort auf die proximalen Körnerzellendriten treffen. Die Fotos zeigen die neuronalen GAP43-Expressionen der mit PBS behandelten Kontrolltiere (Abb. 4.26a und b) und die der Testtiere, denen entweder Th1- oder Th2-Zellen injiziert wurden (Abb. 4.26c bis f). Dabei ist die Läsionsseite jeweils der kontralateralen Seite gegenübergestellt. Es ist zu erkennen, daß die mit Th2-Zellen behandelten Mäuse in beiden Hirnhälften eine deutlich stärkere Fluoreszenzintensität als die mit Th1-Zellen behandelten Mäuse und die Kontrollen aufwiesen.

Anhand dieser Fotos konnte mit Hilfe der Metamorph-Software die Intensität der GAP43-positiven Neurone innerhalb einer vorher festgelegten Region mit konstanter Größe ermittelt und in Graustufen angegeben werden. Die Analyse des axonalen Wachstums erfolgte anschließend über einen Vergleich dieser Fluoreszenzintensitäten. In dem Diagramm 4.27 sind jeweils die Intensitäten der Läsionsseite und die der kontralateralen Hirnhälfte dargestellt, wobei die Kontrolltiere mit den Th1- und Th2-Zellen behandelten Tieren verglichen wurden. Die Abbildung zeigt, daß die injizierten Th2-Zellen auf der Läsionsseite eine signifikante Hochregulation der neuronalen GAP43-Expression im Vergleich zur Kontrolle und zu den Th1-Zellen bewirkten ($p < 0,05$). Somit konnte gezeigt werden, daß Th2-Zellen auch *in vivo* axonales Wachstum stimulieren.

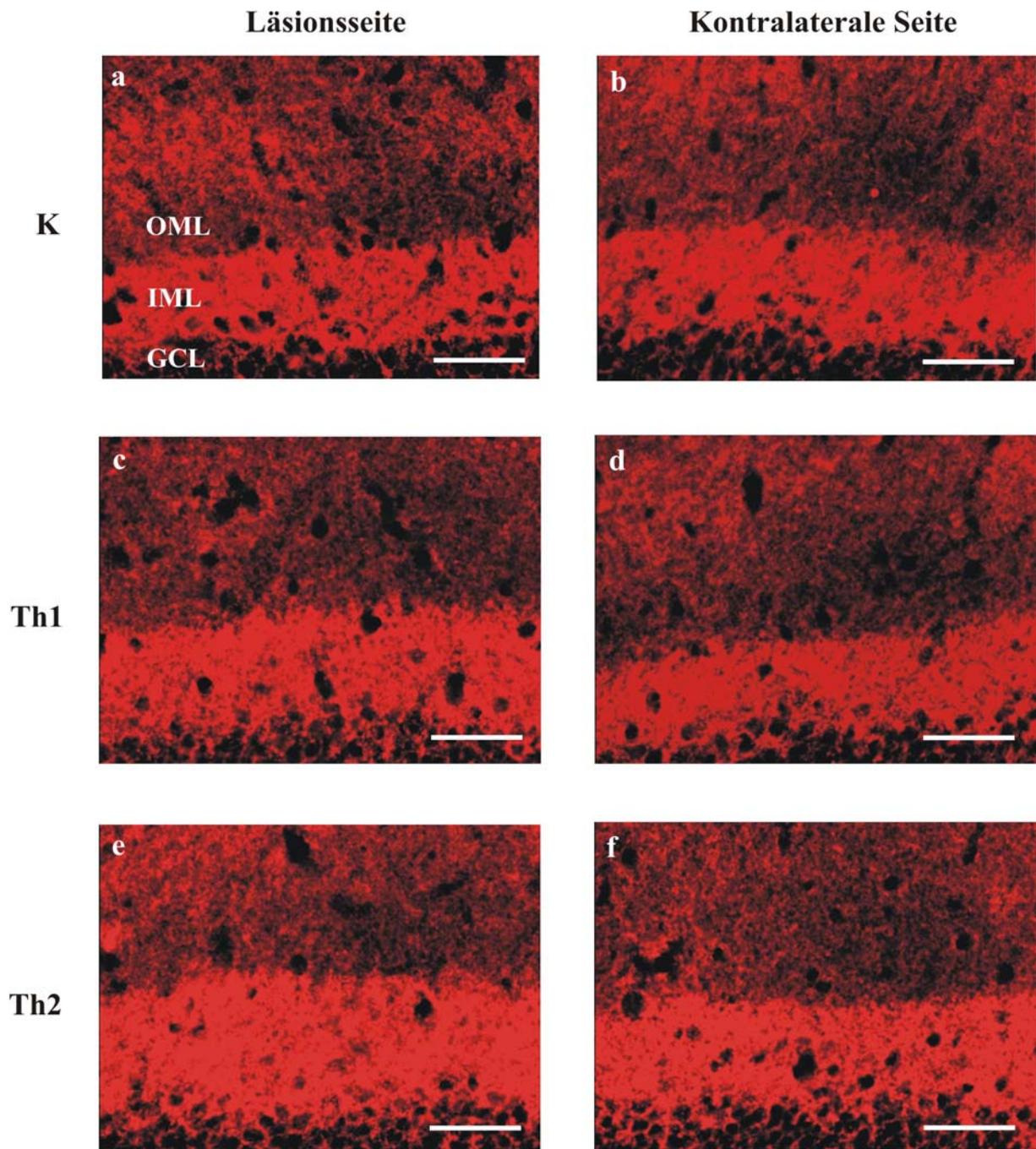


Abbildung 4.26: Immunhistochemische Färbung von axonalem Wachstum nach einer ECL und T-Zellinjektion.

Die Bilder zeigen horizontale Kryostatschnitte durch die Gehirne adulter B10.PL Mäuse in Höhe des Hippokampus 14 Tage nach einer ECL. Den Tieren wurden unspezifisch mit ConA aktivierte CD4⁺ Th1- oder Th2-Zellen oder PBS als Kontrolle in die Läsionsstelle injiziert. Das axonale Wachstum wurde mit einem spezifischen Antikörper gegen GAP43 markiert. Die Bilder zeigen die Färbungen der mit Th1 (**c, d**)- und Th2 (**e, f**)-Zellen behandelten Tiere im Vergleich zu den mit PBS (**a, b**) behandelten Kontrolltieren, wobei die Läsionsseite (**a, c, e**) jeweils der kontralateralen Seite (**b, d, f**) gegenübergestellt ist. Dargestellt sind die Körnerzellen des Gyrus dentatus und die sich anschließende innere und äußere Molekularschicht. Die GAP43-Färbung erstreckt sich dabei über die innere Molekularschicht. Der Balken entspricht einer Länge von 50 µm.

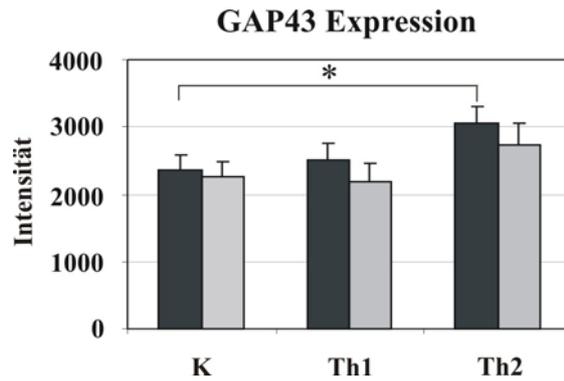


Abbildung 4.27: Einfluß von T-Zellen auf das axonale Wachstum nach einer ECL.

Direkt im Anschluß an die ECL erfolgte die Injektion von 5 µl PBS oder 1×10^4 unspezifisch mit ConA aktivierten CD4⁺ Th1- oder Th2- Zellen in 5 µl PBS in die Läsionsstelle. 14 Tage nach Läsion wurden die Gehirne hinsichtlich ihrer GAP43-Expression immunhistochemisch untersucht. Dargestellt sind jeweils die Intensitäten der Läsionsseite und die der kontralateralen Seite, wobei die Kontrolltiere mit den Th1- und Th2-Zellen behandelten Tieren verglichen wurden.

■ = Läsionsseite, □ = Kontralaterale Seite. Mean ± S.E.M., n = 10, * = p < 0,05.