

Myeloide Zellrekrutierung ins ZNS: Rolle von *Ikk2* und Etablierung einer nicht-myeloablativen Konditionierung

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

NADINE GLADOW

aus Berlin

2018

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter der Leitung von Prof. Dr. Josef Priller in der Zeit von Oktober 2011 bis Dezember 2013 im Labor für Molekulare Psychiatrie der Charité Berlin angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Josef Priller
2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Stephan Sigrist

Disputation am: 05.05.2022

*Meiner Familie
in Liebe und Dankbarkeit.*

Inhaltsverzeichnis

1	ZUSAMMENFASSUNG	1
2	ABSTRACT	3
3	EINLEITUNG	4
3.1	Angeborenes und adaptives Immunsystem	4
3.2	Das mononukleäre Phagozytensystem	4
3.2.1	Dendritische Zellen	6
3.2.2	Monozytenentwicklung und -differenzierung	6
3.2.3	Makrophagen	7
3.2.4	Granulozyten	7
3.2.5	Mikroglia	8
3.3	Myeloide Zellrekrutierung ins ZNS	9
3.3.1	Konditionierung des ZNS	10
3.3.2	Rolle von Knochenmark-abgeleiteten myeloiden Zellen in neurodegenerativen Erkrankungen	11
3.3.3	Fazialisnerv-Axotomie	11
3.3.4	CXCR3 und dessen Ligand CXCL10	12
3.4	Neurologische Erkrankungen	14
3.4.1	Bakterielle Meningitis	14
3.4.2	Multiple Sklerose	15
3.5	NF-B	18
3.5.1	Konditionaler Knockout von <i>Ikk2</i> – das Cre/loxP System	23
3.6	Aufgabenstellung	26
4	MATERIALIEN	27
4.1	Geräte und Verbrauchsmaterialien	27
4.2	Chemikalien und Lösungen	29
4.3	Marker	31
4.4	Reaktions-Kits	31
4.5	Peptide	31
4.6	Oligonukleotidprimer	31
4.7	Puffer, Lösungen und Medien	33
4.8	Antikörper	35
4.9	Mausstämme und Zelllinien	36
4.10	Anästhesie	37
4.11	Computerprogramme	37

5	METHODEN	38
5.1	Molekularbiologische Methoden	38
5.1.1	DNA-Extraktion für die Genotypisierung	38
5.1.2	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	38
5.1.3	Gelelektrophorese	39
5.1.4	RNA-Präparation aus Organen, DNase-Verdau und cDNA-Generierung	40
5.1.5	Quantitative Real-Time PCR	41
5.2	Zellbiologische Methoden	43
5.2.1	Organpräparation und Zellisolation	43
5.2.2	Präparation von Mikroglia, Makrophagen und Astrozyten	44
5.2.3	Retrovirale Transduktion von Knochenmarkzellen	45
5.2.4	Generierung von Knochenmarkchimären	46
5.2.5	Kerntranslokation der NF- κ B Untereinheit p65	46
5.3	Histologische Methoden	47
5.3.1	Organpräparation und Anfertigung von Kryoschnitten	47
5.3.2	Immunhistologische Gewebefärbung	48
5.4	Immunologische Methoden	52
5.4.1	Durchflusszytometrische Genotypisierung	52
5.4.2	Durchflusszytometrische Färbung und Messung	52
5.4.3	tRFP-Expression in LysMCre ^{tdRFP} Mäusen	53
5.4.4	Intrazelluläre Zytokinfärbung	53
5.4.5	Zellseparation mittels MACS	54
5.4.6	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	54
5.4.7	Cytometric Bead Array	54
5.5	Biochemische Methoden	55
5.5.1	Proteinextraktion und -quantifizierung nach Bradford	55
5.5.2	SDS-PAGE	55
5.6	Tiermodelle	56
5.6.1	IKK2 ^{mye} , IKK2 ^{mye/wt} , IKK2 ^{wt} und LysM ^{ko} Mäuse	57
5.6.2	LysMCre ^{tdRFP} Reportermaus (LysM ^{tdRFP})	57
5.6.3	CerTN L15 LysM ^{tdRFP} Reportermaus	58
5.6.4	C57BL/6 <i>2d2</i> tdRFP Maus	58
5.6.5	β -Actin EGFP Mäuse	59
5.6.6	CXCR3 Mäuse	59

5.7 Krankheitsmodelle und ihre tierexperimentellen Methoden	59
5.7.1 Experimentelle Autoimmunenzephalomyelitis	59
5.7.2 Fazialisnerv-Axotomie	61
5.7.3 Meningitis.....	61
5.8 Statistische Analyse	62
6 ERGEBNISSE	63
6.1 Rolle von NF-κB in myeloiden Zellen	63
6.1.1 Geno- und phänotypische Charakterisierung der IKK2 defizienten Mäuse.....	63
6.1.2 Cre-Rekombination im myeloiden und nicht-myeloiden Zellkompartiment	63
6.1.3 Reduzierte EAE-Inzidenz in IKK2 ^{mye} Mäusen.....	67
6.1.4 Wiederhergestellte Inzidenz in IKK2 ^{mye} Mäusen bei der passiven EAE	72
6.1.5 Einfluss der myeloiden NF- κ B Inaktivierung auf den neuronalen Zelltod und den intrathekalen Leukozyteneinstrom in Pam ₃ Cys-induzierter Meningitis.....	74
6.2 Etablierung einer nicht-myeloablativen Konditionierung zur Steuerung myeloider Zellen ins Gehirn	76
6.3 Rolle von CXCR3 bei der Migration von Knochenmark-abgeleiteten Zellen ins ZNS	90
7 DISKUSSION	94
7.1 Einfluss der IKK2 Deletion auf den klinischen Verlauf der EAE und Meningitis ..	96
7.2 Etablierung einer nicht-myeloablativen Konditionierung zur Steuerung myeloider Zellen ins Gehirn	100
7.3 Rolle von CXCR3 bei der Migration von Knochenmark-abgeleiteter Zellen ins ZNS	103
8 LITERATURVERZEICHNIS	106
9 ABBILDUNGSVERZEICHNIS	129
10 TABELLENVERZEICHNIS	131
11 LEBENS LAUF	132
12 ANHANG	134
13 DANKSAGUNG	147
14 EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	148

Abkürzungsverzeichnis

Aβ	Amyloid-beta	EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ANOVA	<i>analysis of variance</i>	EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
APC	Antigenpräsentierende Zelle	ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
bp	Basenpaare	FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
BSA	Bovines Serumalbumin	FKS	fötales Kälberserum
bzw.	beziehungsweise	FN	Fazialiskern
°C	Grad in Celsius	FNA	Fazialisnerv-Axotomie
ca.	circa	FP	<i>forward primer</i>
CB	Cerebellum	5-FU	5-Fluoruracil
CBA	<i>Cytometric Bead Array</i>	G	Gauge
CCR2	C-C Chemokinrezeptor 2	GFP	<i>green fluorescent protein</i>
cDC	<i>conventional dendritic cell</i>	Gy	Gray
cDNA	komplementäre DNA	h	Stunden
CDP	<i>common dendritic cell precursors</i>	HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
CFA	Komplettes Freund-Adjuvanz	HI	<i>head irradiation</i> ; Kopfbestrahlung
CMP	<i>common myeloid precursor</i>	HSC	hämatopoetische Stammzellen
Cre	<i>causes recombination</i>	Iba-1	<i>Ionized calcium binding adaptor molecule 1</i>
CSF	<i>cerebrospinal fluid</i> ; Liquor cerebrospinalis	IFN	Interferon
DAB	3,3'-Diaminobenzidin	IgG	Immunglobulin der Klasse G
DAPI	4', 6-Diamidino-2-Phenylindol	IKK	<i>IκB kinases</i>
dH₂O	destilliertes Wasser	IL	Interleukin
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>	Itgb3	Integrin beta-3
DNA	Desoxyribonukleinsäure	i.p.	intraperitoneal
DNase I	Deoxyribonuklease I	kg	Kilogramm
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat	KM	Knochenmark
Dtl.	Deutschland	KMT	Knochenmarktransplantation
EAE	Experimentelle Autoimmunenzephalomyelitis		

ko	<i>knockout</i>	RP	<i>reverse primer</i>
LoxP	<i>locus of crossing (X) over P1</i>	rpm	<i>rounds per minute</i>
LPS	Lipopolysaccharid	RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>
LysM	Lysozym M	RT	Raumtemperatur
MACS	<i>magnetic activated cell sorting</i>	s	Sekunden
MCP-1	<i>monocyte chemoattractant protein-1</i>	SEM	<i>standard error of the mean</i>
MDP	Makrophagen-dendritische Vorläuferzellen	SOD1	Superoxid-Dismutase 1
mg	Milligramm	TAE	Tris-Acetat-EDTA
min	Minuten	TBI	<i>total body irradiation,</i> Ganzkörperbestrahlung
MOG	Myelin-Oligodendrozyten- Glykoprotein	tdRFP	<i>tandem-dimer red fluorescent protein</i>
MS	Multiple Sklerose	tg	transgen
MW	Mittelwert	TGF-β	<i>transforming growth factor beta</i>
NEMO	<i>NF-κB essential modulator</i>	TipDC	TNF/iNOS-produzierende dendritische Zelle
NF-κB	<i>nuclear factor kappa-light- chain-enhancer of activated B- cells</i>	TLR	Toll-like Rezeptor
nm	Nanometer	TNF	Tumornektrosefaktor
OB	Bulbus olfactorius	TRAF	<i>TNF receptor associated factor</i>
PAMP	<i>pathogen-associated molecular patterns</i>	TUNEL	<i>TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling</i>
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>	Tx	Transplantation
PCM	<i>producer cell medium</i>	μg	Mikrogramm
PCR	Polymerasekettenreaktion	μl	Mikroliter
PDC	<i>plasmacytoid dendritic cells</i>	μm	Mikrometer
PFA	Paraformaldehyd	μM	Mikromolar
PRR	<i>pathogen recognition receptors</i>	USA	United States of America
PTX	Pertussis Toxin	V	Volt
qRT-PCR	quantitative Real-Time PCR	wt	wildtyp
RHD	Rel-Homologie-Domäne	ZNS	Zentralnervensystem

1 Zusammenfassung

Bei entzündlichen Erkrankungen des Zentralnervensystems (ZNS) spielt die Aktivierung von myeloiden Zellen und von zirkulierenden Leukozyten sowie deren Rekrutierung zum Entzündungsort eine entscheidende Rolle. Bei all diesen Inflammationsvorgängen stellt der NF- κ B Signalweg ein Schlüsselement dar.

Um die Rolle von NF- κ B in myeloiden Zellen bei entzündlichen ZNS-Erkrankungen zu untersuchen, wurden konditionale Knockout-Tiere für die I κ B Kinase 2, einem Element im NF- κ B Signalweg, unter der Kontrolle des LysM-Promotors (IKK2^{mye}) generiert. *In vitro* wurde eine spezifische Deletion von IKK2 in Monozyten, Makrophagen und Granulozyten auf mRNA- und Proteinebene detektiert. *In vivo* konnte die Expression des RFP-Reporterproteins in Monozyten, Makrophagen und Granulozyten von LysMCre^{tdRFP} Tieren bestätigt werden. Hingegen zeigten Mikroglia eine sehr geringe Rekombinationseffizienz *in vivo*.

Im experimentellen Autoimmunenzephalomyelitis (EAE)-Modell der Multiplen Sklerose führte die myeloid-spezifische IKK2-Deletion zu einer reduzierten Inzidenz und zu einem milderem Krankheitsverlauf. In Transferexperimenten, in denen *in vitro*-generierte MOG-spezifische Th17-Zellen zur wiederhergestellten EAE-Inzidenz in den IKK2^{mye} Mäusen führten, konnte der primäre Einfluss der myeloid-spezifischen IKK2-Deletion auf das T-Zell-Priming bestätigt werden. Im Gegensatz dazu konnte kein Unterschied im Krankheitsverlauf der experimentellen bakteriellen Meningitis, deren Induktion mit Pam₃CysSK₄ unabhängig von T-Lymphozyten verläuft, zwischen IKK2^{mye}- und Kontrolltieren gefunden werden.

Myeloide Zellen aus dem Knochenmark können unter inflammatorischen Bedingungen in das ZNS einwandern. Ansonsten ist jedoch eine Konditionierung, z.B. durch Bestrahlung oder Behandlung mit Chemotherapeutika wie Busulfan, erforderlich. Im Rahmen der vorliegenden Dissertation haben wir ein neues Modell einer nicht-myeloablativen Konditionierung etabliert, die eine Rekrutierung myeloider Zellen aus dem Knochenmark ins Gehirn ermöglicht. Die selektive kraniale Bestrahlung (HI) mit 11 Gy war mit einem geringeren Blutchimerismus assoziiert als die Ganzkörperbestrahlung (TBI), allerdings fand sich auch eine geringe Immunantwort des ZNS. Die mRNA Expression der Zytokine CCL2, CXCL10 und CCL5 war in HI Mäusen reduziert gegenüber TBI Mäusen, aber höher als in unbestrahlten Tieren. Im Gegensatz zur Behandlung mit Busulfan konnte zwei Wochen nach Fazialisnerv-Axotomie (FNA) eine Einwanderung von Donorzellen in den läsionierten Fazialiskern von HI Mäusen

detektiert werden. Trotz der Induktion von CXCL10 nach Bestrahlung ergaben sich keine Hinweise auf eine Rolle von CXCR3, dem Chemokinrezeptor von CXCL10, beim Rekrutierungsprozess von myeloiden Zellen ins ZNS.

2 Abstract

In inflammatory diseases, the activation of myeloid cells and circulating leukocytes as well as their recruitment to sites of inflammation plays a crucial role. A key regulator in these inflammatory processes is the nuclear factor NF- κ B. The activation of NF- κ B is mediated by a protein complex, which includes the I κ B kinase 2 (IKK2).

In order to investigate the role of NF- κ B activation in myeloid cells in inflammatory diseases, conditional knockout mice for *Ikk2* under the control of the LysM promoter (IKK2^{mye}) were generated. *In vitro* a specific depletion of IKK2 was detected in monocytes, macrophages and granulocytes on mRNA and protein level. *In vivo* the expression of the RFP reporter was confirmed in monocytes, macrophages and granulocytes of LysMCre^{tdRFP} animals. However, microglia showed poor *in vivo* recombination efficiency.

In the experimental autoimmune encephalitis (EAE) model of multiple sclerosis the myeloid-specific IKK2 deletion resulted in a significantly reduced incidence and a milder disease course. In transfer experiments *in vitro*-primed MOG-specific Th17 cells restored the EAE incidence to 100% in IKK2^{mye} mice. Thus, the primary influence of the myeloid-specific IKK2 deletion on T-cell priming was confirmed. In contrast, no differences in disease progression of experimental bacterial meningitis, whose induction by synthetic bacterial lipopeptide Pam₃CysSK₄ occurs independent of T lymphocytes, could be found between IKK2^{mye} and control mice.

Under inflammatory conditions myeloid cells from the bone marrow can migrate into the CNS. Otherwise, CNS preconditioning by irradiation or treatment with chemotherapeutic agents such as busulfan are required. Here, a non-myeloablative conditioning protocol for targeting myeloid cells from the bone marrow into the brain was established. Despite the same cranial irradiation dose of 11 Gy, selective head irradiation (HI) was associated with reduced blood chimerism as well as CNS immune response compared to whole body irradiation (TBI). The mRNA expression levels of CCL2, CXCL10, and CCL5 were increased in the brains of HI mice compared to untreated animals but reduced to TBI. In contrast to the treatment with busulfan, migration of donor cells into the lesioned facial nucleus of HI mice could be detected two weeks after facial nerve axotomy (FNA). Despite the induction of CXCL10 after irradiation, there was no evidence for a role of CXCR3, the chemokine receptor of CXCL10, in the recruitment process of myeloid cells into the CNS.

3 Einleitung

3.1 Angeborenes und adaptives Immunsystem

Das Immunsystem ist ein komplexes Netzwerk aus verschiedenen Organen, Zelltypen und chemischen Molekülen, das der Abwehr von Pathogenen dient. Dabei wird zwischen der angeborenen und der adaptiven Immunantwort unterschieden. Erstere wird von myeloiden Zellen vermittelt. Dazu gehören dendritische Zellen, Makrophagen und Granulozyten.^[1] Diese Immunzellen erkennen mit ihren Zelloberflächenrezeptoren, den sogenannten PRRs (*pathogen recognition receptors*), konservierte Moleküle auf Pathogenen, die als PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*) bezeichnet werden. Daraufhin kommt es zur Phagozytose, Antigenpräsentation oder Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine.^[2] Bei Voranschreiten der Infektion kommt es zur adaptiven Immunantwort, die durch B- und T-Zellen vermittelt wird. Diese Lymphozyten werden im Knochenmark aus hämatopoetischen Vorläuferzellen (HSCs) gebildet und reifen dort (B-Zellen) bzw. im Thymus (T-Zellen). In den sekundären lymphatischen Organen, wie den Lymphknoten und der Milz, finden die Antigenpräsentation und die darauf folgende Induktion der adaptiven Immunantwort statt.^[1,3] Im ZNS wird die Immunantwort dagegen größtenteils durch Mikroglia initiiert, die als ZNS-residente Makrophagen, wie auch andere Gewebemakrophagen, in der Lage sind zu phagozytieren, Antigene zu präsentieren und Entzündungsmediatoren zu sezernieren.^[4] Sie gehören genauso wie dendritische Zellen, Makrophagen und Monozyten zu den mononukleären Phagozyten.

3.2 Das mononukleäre Phagozytensystem

Während der Embryonalentwicklung werden Monozyten in der fetalen Leber aus HSCs gebildet und wandern über die Blutbahn ins ZNS ein. Im adulten Organismus entstehen die myeloiden Zellen dagegen im Knochenmark aus HSCs (Abbildung 1).^[5,6] Diese multipotenten Zellen sind negativ für die murinen Differenzierungsmarker CD19 (für B-Zellen), Ter-119 (erythroider Zellmarker), CD4 und CD8 (T-Lymphozytenmarker), zusammenfassend als Lineage negativ (Lin^-) bezeichnet, sowie positiv für Sca-1 und c-kit (CD117).^[7] HSCs differenzieren über myeloide Vorläuferzellen (CMPs) und Makrophagen-dendritische Vorläuferzellen (MDPs) zu Blutmonozyten oder dendritischen Vorläufern (CDPs). Granulozyten entstehen im Knochenmark aus den Granulozyten-Makrophagen Vorläuferzellen (GMPs), die sich aus CMPs differenzieren (Abbildung 1).^[8]

MDPs und CDPs sind phänotypisch überlappende Zellpopulationen im murinen Knochenmark. So exprimieren beide Vorläufer den Fraktalkinrezeptor (CX₃CR1), c-kit und CD115. Funktionell jedoch können CDPs nur zu cDCs (*conventional dendritic cells*) und PDCs (*plasmacytoid dendritic cells*) differenzieren. Ihr Potential zur Differenzierung in Monozyten und Makrophagen, wie es MDPs aufweisen, haben sie verloren (Abbildung 1).^[5,7,9-11]

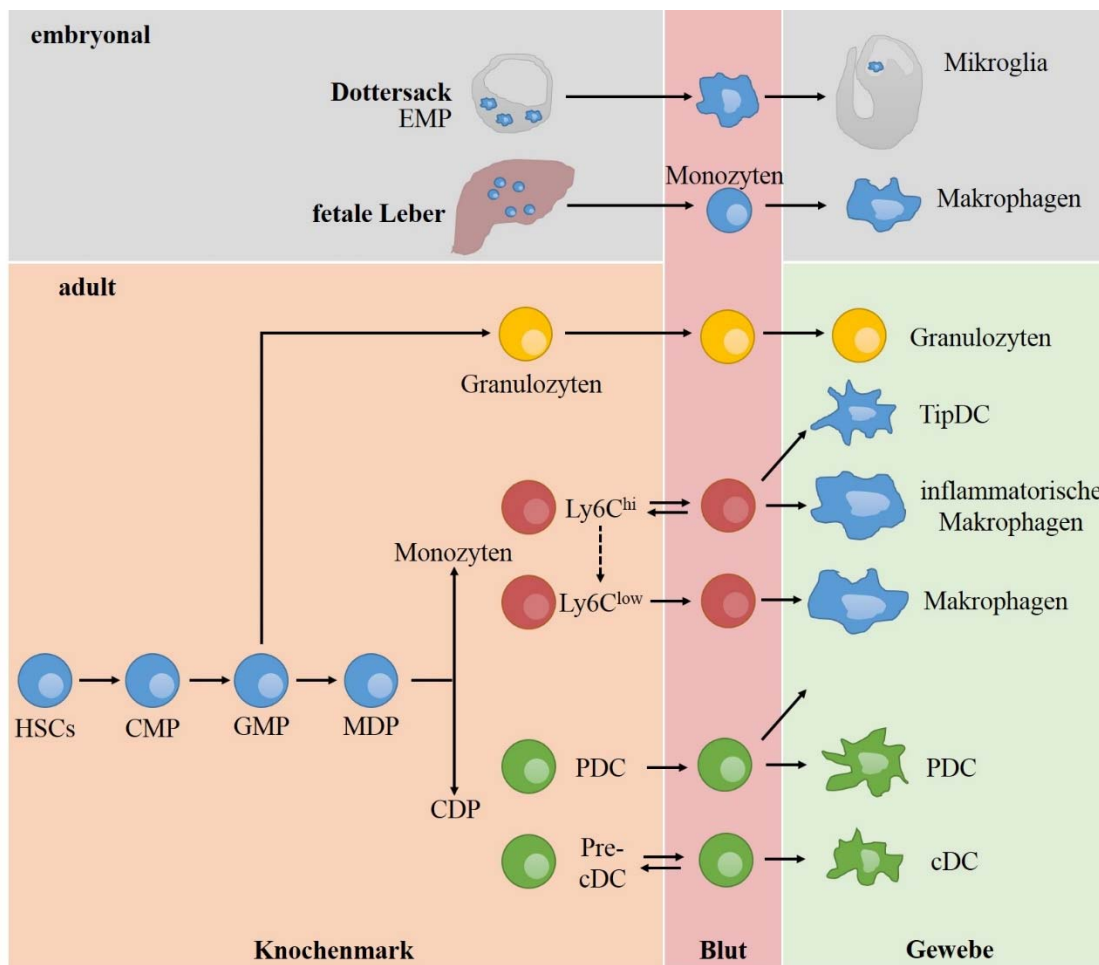


Abbildung 1 Myeloide Zelldifferenzierung. Mikroglia/ZNS-Makrophagen entstehen aus EMPs im murinen Dottersack (vor E8) und besiedeln das Gehirnmesenchym. Monozyten werden aus HSCs in der fetalen Leber bzw. im adulten Knochenmark gebildet. HSCs entwickeln sich dabei über mehrere Vorläufer zu Granulozyten, dendritische Zellen und Monozyten. Bei murinen Monozyten unterscheidet man residente Ly6C^{low}- und inflammatorische Ly6C^{hi}-Monozyten, die im Gewebe zu Makrophagen oder dendritischen Zellen differenzieren. Der direkte Vorläufer der ZNS-Makrophagen/Mikroglia im adulten Knochenmark ist derzeit noch nicht identifiziert. cDC: konventionelle dendritische Zelle, CDP: dendritischer Zellvorläufer, CMP: myeloide Vorläufer, EMP: erythromyeloider Vorläufer, GMP: Granulozyten/Makrophagen Vorläufer, MDP: Makrophagen/dendritischer Vorläufer, PDC: plasmazytoide dendritische Zelle, TipDC: TNF/iNOS-produzierende dendritische Zelle. (Abbildung erstellt nach aktuellem Forschungsstand)^[5-7,10,12,13]

3.2.1 Dendritische Zellen

Dendritische Zellen entwickeln sich, wie bereits erwähnt, aus myeloiden Vorläufern, die mit denen der Makrophagen teilweise überlappen (Abbildung 1). Sie sind für die Prozessierung und Präsentation von Antigenen verantwortlich. Morphologisch, funktionell und anhand ihrer Oberflächenmarker unterscheidet man PDCs, die Interferon- α als Immunantwort auf mikrobielle Infektionen produzieren, von den im Blut zirkulierenden Pre-cDCs. Diese Pre-cDCs stellen die Vorläufer der cDCs im lymphatischen Gewebe dar. cDCs sind nicht in der Lage ins Knochenmark zurück zu migrieren.^[14]

3.2.2 Monozytenentwicklung und -differenzierung

Murine Blutmonozyten exprimieren CD115, CD11b and F4/80.^[15] Im peripheren Blut der Maus unterscheidet man zwei Monozytenpopulationen, die sich im Knochenmark aus MDPs differenzieren. Anhand der Expression ihrer Oberflächenmoleküle lassen sich residente (CD11b⁺CX₃CR1^{hi}CCR2⁻CD62L⁺Gr1⁻Ly6C^{low}) von inflammatorischen Monozyten (CD11b⁺CX₃CR1^{low}CCR2⁺CD62L⁺Gr1⁺Ly6C^{hi}) abgrenzen (Abbildung 1).^[10,15,16] Hinsichtlich ihrer Adhäsionsmoleküle und Chemokinrezeptoren zeigen sich vergleichbare Expressionsmuster zu den humanen Monozytensubpopulationen (CD14^{hi}CD16⁻CCR2⁺CX₃CR1^{low} und CD14^{low}CD16⁻CCR2⁻CX₃CR1^{hi}).^[5,15,17] Chemokine und ihre Rezeptoren spielen eine entscheidende Rolle beim Rekrutierungsprozess. So konnte gezeigt werden, dass bei einer Infektion der Chemokinrezeptor CCR2, welcher u.a. CCL2/MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*) bindet, für die Mobilisierung von inflammatorischen Ly6C^{hi}-Monozyten aus dem Knochenmark zum Entzündungsort erforderlich ist.^[18-22] Auch für die Differenzierung der Ly6C^{hi}-Monozyten in inflammatorische Makrophagen oder TNF/iNOS-produzierende dendritische Zellen (TipDCs) im Gewebe sind Zytokine verantwortlich.^[15,21] Unter nicht-pathologischen Bedingungen migrieren Ly6C^{hi}-Monozyten ins Knochenmark und können dort zu Ly6C^{low}-Monozyten differenzieren (Abbildung 1).^[16,23,24] Ly6C^{low}-Monozyten patrouillieren im Lumen der Blutgefäße, indem sie mit dem vaskulären Endothelium assoziieren. Dieser Vorgang wird von Selektinen, wie P-Selektin, und Integrinen, wie LFA-1 und VLA-4, welche an ICAM-1 und VCAM-1 binden, gesteuert.^[25,26] Zudem ersetzen sie Makrophagen und DCs im peripheren Gewebe, wie der Haut, dem Verdauungstrakt und der Lunge.^[11,15,27-30] Unter inflammatorischen Bedingungen lösen Ly6C^{low}-Monozyten eine transiente Immunantwort aus. Dabei differenzieren sie zu Makrophagen und sezernieren

Zytokine, die die Rekrutierung und Aktivierung von anderen Effektorzellen, wie Ly6C^{hi}-Monozyten, Granulozyten und T-Zellen, bewirken.^[25,26]

3.2.3 Makrophagen

Aus Monozyten differenzierte Makrophagen zeichnen sich durch ihre Fähigkeit zur Phagozytose, Antigenpräsentation und der Interaktion mit Lymphozyten aus. Dieser als Polarisation bezeichnete Prozess ermöglicht den Makrophagen die angeborene Immunantwort zu steuern. Dabei unterscheidet man zwischen der M1- und M2-Polarisation, wobei Zytokine die Entwicklung dieser Phänotypen steuern.^[31,32] So wirken die von Th1-Lymphozyten freigesetzten Zytokine IFN- γ , GM-CSF sowie LPS auf die Makrophagen-Polarisation in Richtung M1-Phänotyp, während IL-4, IL-10, IL-13 und CCL2 die M2-Polarisation begünstigen.^[31,33-35] CCL2 wird unter neurodegenerativen und -inflammatorischen Bedingungen induziert.^[34] Auch funktionell unterscheiden sich diese beiden Makrophagensubpopulationen. M1-Makrophagen sezernieren die pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 β , IL-6, IL-23 und TNF α . Sie rekrutieren Th1-Zellen durch die Freisetzung der Chemokine CXCL9 und CXCL10, und weisen zudem eine bessere Antigenpräsentation auf. M2-Makrophagen sezerniert dagegen das anti-inflammatorische Zytokin IL-10, treiben die Th2-Immunantwort voran und weisen eine erhöhte Phagozytoseaktivität auf.^[33,36-38]

3.2.4 Granulozyten

Granulozyten sind genauso wie Makrophagen phagozytierende Zellen, die sich im Knochenmark aus HSCs entwickeln (Abbildung 1). Die zytoplasmatischen Granula und der segmentierte Zellkern verleihen ihnen eine spezifische Morphologie. Man unterscheidet zwischen Eosinophilen, Basophilen und Neutrophilen.^[1] Letztere sind die am häufigsten im Körper vorkommenden Granulozytensubpopulation und eine der ersten Immunzellen, die chemotaktisch zum Inflammationsort migrieren. Sie stellen professionelle Phagozyten dar und sezernieren Zytokine, die zur Rekrutierung und Aktivierung von anderen Immunzellen, wie Monozyten und Makrophagen beitragen.^[39,40] Basophile und Eosinophile stellen dagegen eher Antigenpräsentierende Zellen (APCs) dar, die bei Parasiteninfektionen und Allergien eine wichtige Rolle spielen.^[1,41,42]

3.2.5 Mikroglia

Funktion

Adulte Mikroglia sind sehr dynamische Zellen, die kontinuierlich ihre Umgebung erforschen und so direkt auf pathologische Veränderungen im Gehirn reagieren können.^[43] Veränderung in der ZNS-Homöostase führen zur Mikrogliosis. Dieser Prozess ist durch Veränderung der Mikroglia-Morphologie, Antigenexpression auf der Zelloberfläche, Proliferation und Modulation in der Interaktion mit anderen Immunzellen charakterisiert.^[44] So sezernieren die aktivierten Mikroglia eine Reihe von Chemokinen (u.a. CCL2, CCL5) und Zytokinen (u.a. IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , IL-6 und IL-10), die eine Rekrutierung anderer Immunzellen aus dem Blut ins ZNS auslösen.^[45] Zudem besitzen aktivierte Mikroglia neuroprotektive Eigenschaften, beispielsweise durch die Synthese neuroprotektiver Faktoren und durch die Förderung regenerativer Prozesse mit Hilfe der Phagozytose von Zelltrümmern.^[46,47] Im Gegensatz dazu produzieren sie eine Vielzahl potentiell schädlicher Faktoren, u.a. freie Sauerstoffradikale, Stickstoffverbindungen, proteolytische Enzyme, Komplementfaktoren und diverse Zytokine, die die Pathogenese verschiedener neurologischer Erkrankungen beeinflussen.^[4,48,49] So stehen Mikroglia im Verdacht die Neuroinflammation und damit die neuronale Schädigung bei der Amyotrophen Lateralsklerose zu verstärken.^[50,51] Auch bei der bakteriellen Meningitis und der Multiplen Sklerose konnte eine neurotoxische Wirkung der aktivierten Mikroglia im ZNS nachgewiesen werden.^[52,53]

Neben ihrer Funktion als Immunzellen kommt den Mikroglia eine besondere Rolle bei der neuronalen Proliferation und Differenzierung sowie bei der Entstehung synaptischer Verknüpfungen zu.^[54-57] Bei all diesen Funktionen spielt der auf Mikroglia exprimierte Fraktalkinrezeptor (CX₃CR1) eine zentrale Rolle.^[58-60] Dessen einzig bekannter Ligand CX₃CL1 findet sich im adulten ZNS auf Neuronen.^[61]

Verteilung, Morphologie und Differenzierungsmarker

Mikroglia sind im gesunden adulten ZNS heterogen verteilt, wobei sie eine Dichte zwischen 5% im Corpus callosum und 12% in der Substantia nigra aufweisen.^[62] Anhand ihrer Morphologie und mit Hilfe von Antikörpern lassen sich Mikroglia von anderen myeloiden Zellen im ZNS unterscheiden. Hierbei sind nur die für die vorliegende Arbeit relevanten mikroglialen Marker erwähnt. So exprimieren Makrophagen und Mikroglia Iba-1 (*ionized calcium binding adapter molecule 1*), Neutrophile jedoch nicht. Monozyten/Makrophagen

werden als CD11b⁺CD45^{hi}-Zellen charakterisiert, Mikroglia als CD11b⁺CD45^{dim}.^[63,64] Zudem exprimieren Mikroglia den Mikroglia/Makrophagenmarker F4/80 und CX₃CR1, welcher ebenfalls auf den myeloiden Vorläuferzellen zu finden ist.^[58,65-67]

Vorläuferzellen

Mikroglia entstehen während der frühen Embryonalentwicklung (vor Tag 8 der Embryonalentwicklung, E8) aus erythromyeloiden Vorläuferzellen (EMP) im murinen Dottersack.^[13,65,68,69] Über Blutgefäße wandern diese Zellen vom Dottersack ins Gehirnmesenchym ein, wo sie während der Embryonalentwicklung und der perinatalen Phase ein hohes Proliferationspotenzial zeigen (Abbildung 1).^[68] Bei der Mikrogliaentwicklung spielen die myeloid-spezifischen Transkriptionsfaktoren Pu.1 und Irf8 eine entscheidende Rolle.^[13,50] Im Vergleich zu anderen Gewebemakrophagen verläuft sie jedoch MYB-unabhängig. MYB ist für die Entwicklung von HSCs und HSC-abgeleiteten Zellen notwendig.^[70] Damit stellen Mikroglia ontogenetisch eine eigenständige Makrophagenpopulation dar.

Während Makrophagen und dendritische Zellen kontinuierlich von myeloiden Vorläuferzellen, die ausdifferenzieren, ersetzt werden (Abbildung 1), verhindert die Blut-Hirn-Schranke unter physiologischen Bedingungen den Ersatz der residenten Mikroglia im ZNS durch myeloide Vorläufer. In adulten parabiotischen Mäusen konnte ebenfalls keine Einwanderung myeloider Zellen ins ZNS detektiert werden. Daraus ergibt sich, dass hämatopoetische Vorläufer und zirkulierende Monozyten nicht signifikant zur adulten Mikroglia-Homöostase beitragen.^[13,65,70-72] Damit stellen Mikroglia, im Gegensatz zu anderen Gewebemakrophagen, langlebige Zellen im ZNS mit der Fähigkeit zur Selbsterneuerung dar.

3.3 Myeloide Zellrekrutierung ins ZNS

Unter inflammatorischen Bedingungen können Monozyten oder andere Knochenmarkvorläuferzellen in das Gehirn einwandern.^[65,69,73-76] Beers et al. konnten so zeigen, dass in PU.1 Knockout (KO) Mäusen, die keine embryonalen Mikroglia aufweisen, Knochenmark-abgeleitete Zellen postnatal ins ZNS einwandern. Sie differenzieren dort zu Zellen, die morphologisch und funktionell Mikroglia ähneln.^[50] Zudem wurden in den Gehirnen von myeloablativ bestrahlten Tieren Zellen entdeckt, die dem transplantierten Knochenmark

der Spendertiere entstammen.^[77-81] Aufgrund ihrer Fähigkeit ins ZNS einzuwandern, kommt diesen Knochenmark-abgeleiteten Zellen ein mögliches therapeutisches Potenzial zu.

3.3.1 Konditionierung des ZNS

Für die myeloide Zellrekrutierung ins ZNS ist dessen Konditionierung, zum Beispiel in Form einer myeloablativen Behandlung, erforderlich. Dabei haben sich in den letzten Jahren die Bestrahlung und die Behandlung mit Chemotherapeutika wie Busulfan, etabliert.

Priller et al. zeigten, dass die myeloablativ Ganzkörperbestrahlung (*total body irradiation*, TBI) die Migration von Knochenmark-abgeleiteten Zellen ins ZNS bewirkt.^[82] Im Gegensatz dazu erfolgt keine Einwanderung myeloider Zellen ins Gehirn, wenn das ZNS vor der Bestrahlung geschützt wird.^[83,84] Bei der myeloablativen Ganzkörperbestrahlung wird im ZNS eine Inflammation ausgelöst, die mit der Freisetzung pro-inflammatorischer Chemokine und Zytokine einhergeht. Zudem wird die Funktion der Blut-Hirn-Schranke bestrahlungsbedingt temporär beeinträchtigt.^[85,86] Durch die Zerstörung des hämatopoetischen Systems ist diese Konditionierung ohne anschließende Rekonstitution mit Knochenmarkzellen letal. In parabiotischen Mäusen konnte gezeigt werden, dass die Bestrahlung als alleinige Konditionierung für die Einwanderung Knochenmark-abgeleiteter Zellen ins ZNS nicht ausreicht.^[72] Die Transplantation einer ausreichenden Anzahl von Knochenmarkzellen in die Blutzirkulation der bestrahlten Tiere stellt somit eine weitere Bedingung für die myeloide Zellrekrutierung ins ZNS dar.^[60,82,84]

Busulfan wird seit Jahren als Alternative zur Ganzkörperbestrahlung diskutiert. Dieses Chemotherapeutikum zerstört endogene Mikroglia und wird in der humanen klinischen Behandlung von Chronisch Myeloischer Leukämie und zur Konditionierungsbehandlung vor Stammzelltransplantationen erfolgreich eingesetzt.^[87,88] Lampron et al. zeigten, dass sowohl Busulfan als auch die Ganzkörperbestrahlung für die Induktion eines stabilen peripheren Blutchimerismus ausreichend sind.^[89] Zudem konnte in einigen Studien eine Einwanderung Donor-abgeleiteter Zellen nach Knochenmarktransplantation ins ZNS von Busulfan-behandelten Tieren detektiert werden, wenngleich diese viel geringer als bei der Ganzkörperbestrahlung ist.^[60,83,90,91] Diese Einwanderung ist dabei sehr stabil. So konnten auch mehrere Wochen und Monate nach der Transplantation in den Gehirnen myeloablativ bestrahlter Empfängertiere, genauso wie in Busulfan-behandelten Rezipienten, Donorzellen gefunden werden.^[60,83,91,92]

In TBI-Chimärenstudien zeigte sich, dass im Durchschnitt nur etwa 5-10% der myeloiden Zellen im Gehirn Knochenmark-abgeleitet sind.^[80,93] Unter pathologischen Prozessen, wie etwa der Motoneuron-Degeneration nach einer Fazialisnerv-Axotomie (FNA), erfolgt dagegen eine verstärkte Rekrutierung Knochenmark-abgeleiteter Zellen ins ZNS und zwar bevorzugt an den Ort einer Inflammation.^[82,94,95] Im Mausmodellen der zerebralen Ischämie, der bakterieller Meningitis und der neuronalen Degenerationen wurde so die Rekrutierung von myeloiden Zellen aus dem Knochenmark ins Gehirn nachgewiesen.^[82,84,96]

3.3.2 Rolle von Knochenmark-abgeleiteten myeloiden Zellen in neurodegenerativen Erkrankungen

Die Rekrutierung von Knochenmark-abgeleiteten mononukleären Phagozyten unter den oben genannten Konditionierungsbedingungen wurde bereits in Modellen verschiedener neurodegenerativer Erkrankungen untersucht. Dabei zeigten die ins ZNS eingewanderten myeloiden Zellen abweichende Funktionen gegenüber den im Gehirn residenten Mikroglia.^[97] In einem transgenen Mausmodell der Alzheimer-Krankheit (APP/PS1, *amyloid precursor protein/presenilin 1*), welche durch eine zerebrale Akkumulation von Amyloid-beta (A β) gekennzeichnet ist, wurde eine Rekrutierung peripherer Immunzellen aus dem Blut detektiert. Diese Ly6C^{low}CCR2-exprimierenden Zellen spielen bei der Eliminierung von A β in APP/PS1 Tieren eine entscheidende Rolle.^[98-101] Im Gegensatz dazu produzieren die residenten Mikroglia im transgenen APP/PS1 Mausmodell zwar proinflammatorische Zytokine und reaktive Sauerstoffspezies, zeigen aber eine verminderte Phagozytoseaktivität gegenüber A β -Plaques.^[101,102] Auch bei Rückenmarkverletzungen wurde gezeigt, dass Ly6C⁺CCR2⁺-Monozyten zum Läsionsort rekrutiert werden und zur funktionellen Wiederherstellung beitragen.^[103] Bei all diesen Rekrutierungsprozessen spielt der Chemokinrezeptor CCR2 eine entscheidende Rolle. So konnte in CCR2-defizienten Mäusen eine signifikant reduzierte Rekrutierung von myeloiden Zellen in verschiedenen Krankheitsmodellen gefunden werden.^[18,21,22,104] Dabei zeigte sich in CCR2-defizienten transgenen Mäusen für die Alzheimer Krankheit ein beschleunigter Krankheitsverlauf sowie eine zunehmende zerebrale A β -Ablagerung.^[105]

Auch die ebenfalls auf Monozyten exprimierten Chemokinrezeptoren CCR5 und CX₃CR1 spielen eine entscheidende Rolle bei der CCR2-vermittelten Rekrutierung aus dem Knochenmark.^[15,20,106-108]

Der Mechanismus, der der Einwanderung Knochenmark-abgeleiteter Makrophagen ins Gehirn zu Grunde liegt, ist noch nicht ausreichend geklärt. Jedoch konnte u.a. bei der EAE gezeigt werden, dass nur Lin⁻c-kit⁺Sca-1⁺ multipotente Vorläuferzellen aus dem Knochenmark eine langfristige Einwanderung myeloider Zellen in das ZNS ermöglichen.^[71,77]

3.3.3 Fazialisnerv-Axotomie

Bei der von Blinzinger und Kreuzberg 1968 beschriebenen FNA handelt es sich um ein Läsionsmodell, bei dem der Nervus facialis außerhalb des Gehirns durchtrennt wird, ohne dass die Blut-Hirn-Schranke hierdurch beeinträchtigt wird.^[109,110] Es kommt zum axonalen Verlust der Motoneurone im Fazialiskern und zu einer Aktivierung von Mikroglia um die degenerierenden Motoneurone^[4,109], ersichtlich durch morphologische Veränderungen sowie die Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen wie ICAM-1.^[111-114] Innerhalb von sieben Tagen nach Axotomie ist eine Zunahme an Mikroglia im läsierten Fazialiskern um das vier- bis sechsfache detektierbar. Ursächlich hierfür ist eine lokale Proliferation der Mikroglia.^[109,113] Es kommt zum neuronalen Zelltod im Bereich des läsierten Fazialiskern und zur Rekrutierung von Leukozyten aus dem peripheren Blut innerhalb von zwei Wochen nach FNA.^[115-117] Im weiteren Verlauf kommt es zur Bildung von Gliaknötchen um die Neuronen und zur Phagozytose des neuronalen Debris, was zur verbesserten Regeneration eines Großteils der betroffenen Neuronen beiträgt.^[118,119] Die aktivierten Mikroglia werden von Astrozyten verdrängt, die die Oberfläche der Neuronen mit feinen Zellausläufern umschlingen.^[120]

3.3.4 CXCR3 und dessen Ligand CXCL10

Bei Chemokinen handelt es sich um chemotaktische Zytokine, die bei der Erzeugung von Immun- und Entzündungsreaktionen eine entscheidende Rolle spielen.^[121-123] Sie steuern die Migration von Lymphozyten und anderen Immunzellen durch die Aktivierung spezifischer Sieben-Transmembran, G-Protein-gekoppelter Zelloberflächenrezeptoren (GPCR), die auf spezifischen Zellen exprimiert werden.^[124]

Bei verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen wurde eine hohe Expression des Chemokins CXCL10, welches auch als IP-10 (*interferon-inducible protein of 10 kDa*) bezeichnet wird, beschrieben.^[125,126] Es steuert die Infiltration von CXCR3-exprimierenden Lymphozyten in das entzündete Gewebe.^[127] Darüber hinaus wurde eine CXCR3-Expression auch auf NK- und dendritischen Zellen^[124,127] sowie auf residente Zellen des ZNS, u.a. auf

Neuronen^[126,128], Astrozyten und Mikroglia^[129-132], sowohl im humanen als auch murinen Gewebe, beschrieben.^[124,130,131,133] Deren Expressionslevel sind jedoch viel geringer als auf peripheren T-Lymphozyten.^[124]

Neben CXCL10 stellen auch CXCL9/MIG und CXCL11/I-TAC Liganden von CXCR3 dar.^[127,134] Die Induktion aller drei CXCR3 Liganden wird dabei von IFN- γ vermittelt, wie Versuche mit IFN- γ -defizienten T-Zellen zeigten.^[134,135]

Janatpour et al. (2001) konnten eine Expression von CXCR3 auf murinen zirkulierenden CD14⁺ Blutmonozyten zeigen, wobei dies jedoch nur bei einem kleinen Prozentsatz (< 2%) der Fall war^[124,136], ähnlich wie in gesunden humanen Individuen. Bei Patienten mit rheumatoider Arthritis und chronischer Inflammation konnte eine Zunahme an CXCR3⁺ Monozyten im peripheren Blut festgestellt werden.^[136,137]

Eine pathogenetische Rolle von CXCR3 und seinem Liganden CXCL10 wurde mehrfach im EAE-Modell beschrieben. So konnte eine Korrelation zwischen CXCL10-Expression und klinischem Verlauf der murinen EAE beschrieben werden.^[138-140] Klein et al. konnten zeigen, dass CXCL10-defiziente Mäuse eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber EAE-Induktion haben, einhergehend mit einer gesteigerten Leukozytenrekrutierung ins ZNS.^[141] Dagegen konnte in Knockout-Mäusen für CXCR3 kein Einfluss auf die Leukozytenmigration in der EAE beobachtet werden. Jedoch zeigten die T-Zellen dieser Tiere eine modulierte IFN- γ Produktion einhergehend mit einem schweren Verlauf der EAE-Erkrankung.^[124,142]

CXCL10 wird auch nach Läsion des entorhinalen Kortex induziert.^[143] Während es in Wildtyp-Tieren drei Tage nach Läsion zur Rekrutierung von Mikroglia in den Bereich der axonalen Degeneration kam, zeigten CXCR3^{-/-} Mäuse eine beeinträchtigte Rekrutierung dieser Zellen.^[144] Darüber hinaus konnte, anders als bei Wildtyp-Mäusen, kein Verlust von denervierten distalen Dendriten im Bereich der axonalen Degeneration nach entorhinaler Läsion in CXCR3 Knockout-Tieren gefunden werden.^[144]

Im FNA-Modell konnten Rappert et al. keinen Unterschied zwischen Wildtyp- und CXCR3^{-/-} Mäusen hinsichtlich der Mikroglia-proliferation finden^[144]. CXCR3 scheint für die Mikroglia-rekrutierung, jedoch nicht für die Proliferation bedeutungsvoll zu sein.

Schließlich wurde auch das hauptsächlich in der Peripherie exprimierte Chemokin CCL21 als Ligand für CXCR3 beschrieben, der in der Lage ist, Chemotaxis in humanen Mikroglia zu induzieren.^[132,145,146]

3.4 Neurologische Erkrankungen

3.4.1 Bakterielle Meningitis

Die Meningitis stellte eine der schwerwiegendsten Infektionserkrankungen des Menschen dar. Dabei handelt es sich um eine Entzündung der Meningen, die sowohl durch bakterielle, als auch durch virale Erreger und Pilze ausgelöst werden kann.^[147,148] Pneumokokken (*Streptococcus pneumoniae*) stellen die häufigsten Erreger der Meningitis bei Erwachsenen dar.^[148,149] Die Steptokokken-Meningitis ist durch eine besonders ungünstige Prognose gekennzeichnet. So liegt die Mortalität, trotz Einsatz antibiotischer Therapien, bei bis zu 30%.^[149-152] Die Folgeschäden bei überlebenden Patienten reichen von Entwicklungsverzögerungen, epileptischen Anfällen und Hörverlust bis hin zu kognitiven Defiziten.^[153-156]

Die durch Tröpfcheninfektion übertragenen Meningitis-Erreger breiten sich hämatogen aus.^[157] Dabei überwinden sie die Blut-Hirn-Schranke und vermehren sich anschließend nahezu ungehindert im Subarachnoidalraum.^[158-160] Innerhalb weniger Stunden nach dem Eindringen der Bakterien in den Liquorraum wird eine konstitutive Immunantwort ausgelöst, bei der Immunzellen wie Makrophagen mit ihren PRRs (vorallem TLR2, TLR4 und TLR9) die bakteriellen Bestandteile erkennen.^[161] Im Verlauf der Immunreaktion werden Granulozyten und Monozyten chemotaktisch aus dem Blut in die Cerebrospinalflüssigkeit (CSF) rekrutiert. Es kommt zum massiven Anstieg der Leukozytenzahl im Liquor^[157,162] und zur Aktivierung lokaler Mikroglia.^[4] Zur Diagnosestellung der bakteriellen Meningitis wird daher eine Lumbalpunktion durchgeführt.^[150,163] Vor allem die Pleozytose von Neutrophilen und die Isolation der Bakterien aus dem CSF gelten dabei als klinisches Merkmal.

Sowohl im Tiermodell als auch in *post mortem*-Gewebeschnitten von Meningitis-Patienten sind apoptotische neuronale Zellen, vor allem im hippocampalen Bereich des Gyrus dentatus, nachweisbar.^[53,164,165] Bei Überlebenden der Erkrankung resultieren diese in einer hippocampalen Atrophie, welche ursächlich für die zurückbleibenden neurologischen Schäden ist.^[53,166]

Wie bereits beschrieben, weisen Forschungsergebnisse darauf hin, dass die Erkennung der Pneumokokken über TLR4, TLR9 und vor allem über TLR2 erfolgt. In TLR2-Knockout Mäusen ist die Entzündungsreaktion auf Pneumokokkenmeningitis vollständig unterdrückt, was die zentrale Rolle dieses Rezeptors bei der Pathogenese der Pneumokokkenmeningitis unterstreicht^[167] Die Applikation von Pam₃CysSK₄, einem TLR2-Agonisten, führt nach 24h zu einer Pleozytose sowie Zunahme apoptotischer Neuronen im Gyrus dentatus.^[168] Damit

ermöglicht dieses Modell durch selektive Stimulation von TLR2-Rezeptoren die klinischen Aspekte der akuten bakteriellen Meningitis zu replizieren.

3.4.2 Multiple Sklerose

Bei der Multiple Sklerose (MS) handelt es sich um eine chronisch-entzündliche Erkrankung des ZNS, die mit Demyelinisierung und Zerstörung von Axonen sowie Neuronen einhergeht.^[169] Sie stellt eine der häufigsten nicht-traumatischen Ursachen für neurologische Defekte bei jungen Erwachsenen dar.^[170]

Histologisch ist die MS durch disseminierte Läsionen in der weißen Substanz zusammen mit der Infiltration von Entzündungszellen ins ZNS gekennzeichnet. Die Pathogenese der MS beginnt dabei mit der Aktivierung autoreaktiver CD4⁺ T-Zellen durch APCs im peripheren Blut und den Lymphknoten. Da auch im gesunden Menschen autoreaktive T-Zellen nachweisbar sind, ist der Auslöser dieser antigenspezifischen T-Zellaktivierung noch unbekannt.^[171] Die antigenspezifische T-Zellaktivierung führt zur vermehrten Expression von Adhäsionsmolekülen, u.a. ICAM-1 und VCAM-1, mit deren Hilfe sich die T-Zellen ans Endothel der Blut-Hirn-Schranke anlagern.^[172] Anschließend migrieren diese autoreaktiven CD4⁺ T-Zellen zwischen oder auch durch die Endothelzellen in den perivaskulären Raum, erkennen dort spezifische Antigene aus der Myelinscheide auf APCs und lösen eine gegen das Myelin gerichtete Entzündungsreaktion aus.^[173-175] In deren Folge werden weitere Immunzellen, darunter B-Lymphozyten, die Myelin-reaktive Antikörper sezernieren, Makrophagen und ZNS-residente Mikroglia rekrutiert.^[94,176] Letztendlich kommt es zur antikörpervermittelten Demyelinisierung, Oligodendrozytenschädigung, reaktiven Astrogliose und Axondegeneration.^[177,178] Durch die Entzündungsprozesse ist die Erregungsweiterleitung an den beschädigten Arealen der Myelinscheide gestört, was sich pathophysiologisch in den neurologischen Ausfallerscheinungen eines Schubes widerspiegelt. An die Schübe schließt sich eine Phase an, in der Oligodendrozyten die freiliegenden Nervenfasern remyelinisieren.^[179] Durch diesen Regenerationsmechanismus verlaufen die ersten MS-Schübe meist inapparent. Man vermutet, dass erst ab einer bestimmten Schwelle der Läsionslast die MS durch ihre diagnostizierbaren neurologischen Defizite klinisch in Erscheinung tritt.^[180]

Bei der MS unterscheidet man drei klinische Verlaufsformen: Die schubförmige MS (*relapsing remitting MS*, RRMS) stellt dabei die größte und häufigste Gruppe von Patienten dar. Das durchschnittliche Erkrankungsalter liegt hierbei zwischen 20 und 30 Jahren, wobei Frauen etwa

doppelt so häufig betroffen sind wie Männer.^[181,182] Erste Symptome reichen von Sehstörungen, allgemeiner Schwäche (Fatigue), Sensibilitätsstörungen, kognitiven Einschränkungen, Schmerzen, Blasen- und Mastdarmlstörungen, bis hin zu Depressionen.^[183-185] Nach etwa 10 Jahren Krankheitsdauer kommt es bei etwa 50% der Patienten mit RRMS zum Übergang in eine chronische Form, die man als Sekundär-Progrediente MS (SPMS) bezeichnet. Von dieser abzugrenzen ist die Primär-Progrediente MS (PPMS). Diese dritte Form der MS ist ebenfalls chronisch, manifestiert sich klinisch jedoch durch aufsteigende Lähmungserscheinungen. Schübe sind bei der PPMS nicht mehr abgrenzbar. Nach heutigem Kenntnisstand steht bei den beiden chronischen Formen der MS nicht mehr der Entzündungsprozess im Vordergrund, sondern sekundär-neurodegenerative Veränderungen.^[174,186,187]

Zur Verringerung der Schubhäufigkeit bei der RRMS werden sogenannte “immunmodulatorische Substanzen”, wie Interferon- β (IFN- β) und Glatirameracetat, als Basistherapie eingesetzt.^[188,189] Die Wirkung von IFN- β beruht dabei u.a. auf der Induktion von anti-inflammatorischem Interleukin-10 (IL-10) sowie neurotropher Faktoren, und der Hemmung der T-Zellmigration über die Blut-Hirn-Schranke.^[190] Glatirameracetat ähnelt in seiner Struktur dem in der Myelinscheide des ZNS vorkommendem Myelin-basischem Protein (MBP). Sein therapeutischer Effekt beruht u.a. auf einer modifizierten T-Zelldifferenzierung und einer immunmodulatorischen Wirkung auf APCs und Mikroglia.^[191-194]

Im akuten Schub wird u.a. Methylprednisolon oder alternativ eine Plasmapherese eingesetzt, um ein schnelles Abklingen der Symptome zu erreichen.^[195-197]

Für die sogenannte “Eskalationstherapie” stehen immunmodulatorische und immunsuppressive Substanzen zur Verfügung, die das Eindringen von Immunzellen ins ZNS reduzieren. So hindert Fingolimod, eine Substanz die als Sphingosin-1-Phosphat-Analogon wirkt, die T-Zellen an der Extravasion aus den Lymphknoten.^[198,199] Natalizumab, ein monoklonaler Antikörper, blockiert dagegen VLA-4 ($\alpha 4$ -Integrin), wodurch die Adhäsion der Lymphozyten an das Endothel des Blutgefäße im ZNS verhindert wird.^[173,192,200]

Die bei der Behandlung von MS eingesetzten immunsuppressiven Substanzen, wie Mitoxantron, Azathioprin und Cyclophosphamid, wirken dagegen zytostatisch. Sie verringern die Anzahl der Lymphozyten und reduzieren damit sekundär die Entzündungslast. Der Einsatz dieser Zytostatika ist durch ihre Kardiotoxizität und der Erhöhung des Leukämierisikos limitiert.^[201]

Experimentelle Autoimmunenzephalomyelitis

Grundlage der EAE ist die Immunisierung von Versuchstieren mit Bestandteilen der Myelinscheide von Axonen zusammen mit pro-inflammatorischen Adjuvantien, wie Complete Freund's Adjuvans (CFA), mit dem Ziel autoreaktive T-Zellen zu generieren.^[202,203]

Durch den Einsatz einzelner Proteine der Myelinscheide oder davon abgeleiteter Peptide können in verschiedenen Tiermodellen unterschiedliche Aspekte der MS moduliert werden. In SJL Mäusen kann ein schubförmiger Verlauf der EAE durch den Einsatz von Proteolipid-Protein (PLP) induziert werden.^[204] Ein monophasischer Verlauf der EAE kann dagegen durch Verwendung von MBP bei Lewis-Ratten erzeugt werden.^[205] Dies ähnelt einem akuten Schub.^[206] Limitierend bei der EAE ist jedoch, dass es histologisch bei diesen Tiermodellen lediglich zur Einwanderung von Lymphozyten in das Rückenmark kommt, was zur Bildung von Ödemen führt, die sich klinisch als Lähmungserscheinungen manifestieren, jedoch keine Gewebeerstörung hervorgerufen wird.^[207] Anders verhält es sich bei der Immunisierung von C56BL/6 Mäusen mit Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein-Peptid 35-55 (MOG₃₅₋₅₅), welches von APCs phagozytiert wird und anschließend in den Lymphknoten oder der Milz zur Interaktion mit T-Lymphozyten führt.^[208] Die T-Zellen verlassen daraufhin die peripheren lymphatischen Organe, wandern über die Blut-Hirn-Schranke ins ZNS ein, wo sie Chemokine und Wachstumsfaktoren sezernieren. Hierdurch werden zunächst Monozyten (Ly6C^{hi}) aus dem Knochenmark zum Inflammationsort rekrutiert, die zu Makrophagen differenzieren und die Demyelinisierung in Gang setzen.^[209] Es kommt zur Zerstörung von Axonen und damit zu einem chronischen Krankheitsverlauf.^[208] Histologisch ähnelt dieses Tiermodell damit der humanen MS mehr, zumal es hierbei zur Einwanderung von T-Zellen und aktivierten Makrophagen ins Rückenmark kommt. Diese eingewanderten Immunzellen zerstören die Myelinscheide und die in ihnen verlaufenden Axone, wodurch es bei den Tieren klinisch zu einer aufsteigenden Lähmung, beginnend von der Schwanzspitze bis hin zur Parese der Hinter- und Vorderbeine kommt.^[210,211] Beim Modell der MOG₃₅₋₅₅ EAE wird das Autoantigen im Gemisch mit CFA, welches abgetötete *Mycobacterium-tuberculosis* Partikel enthält, appliziert. Dies trägt zu einer Stimulation der angeborenen Immunantwort und zu einer effektiven Präsentation des Autoantigens bei.^[212,213] Die simultane Injektion von Pertussistoxin (PTX) verstärkt die Reaktion u.a. durch Erleichterung der Extravasation von Immunzellen über die Blut-Hirn-Schranke.^[213]

Neben dieser aktiven Immunisierung mit Myelinproteinen (aktive EAE), kann die EAE auch durch den adoptiven Transfer enzephalitogener T-Zellen induziert werden (passive EAE),

wodurch die Aktivierung der T-Zellen im peripheren lymphatischen Gewebe umgangen wird.^[213] Dabei zeigte sich, dass nicht wie lange Zeit angenommen Th1-Zellen die entscheidende Rolle bei der Pathogenese der EAE spielen, sondern Th17-Zellen. So konnte in IFN- γ Knockout-Mäusen nach Immunisierung mit MBP kein protektiver Effekt gegenüber EAE, sondern sogar ein schwererer klinischer Verlauf, nachgewiesen werden.^[214] Dagegen zeigte sich keine EAE-Induktion in IL-23-defizienten Mäusen, bei denen keine IL-17-Produktion nachweisbar ist. Der adoptive Transfer von Th17-Zellen führte zu einem schwereren Krankheitsverlauf in diesen Tieren.^[215] Darüber hinaus wurde gezeigt, dass Th17-Lymphozyten *in vitro* in der Lage sind das ZNS-Endothel zu durchwandern. Sie lassen sich *post mortem* auch in humanen MS-Läsionen nachweisen.^[216]

Neuere Forschungsergebnisse geben Hinweise darauf, dass Makrophagen eine duale Rolle bei der Pathogenese der MS spielen. So sind sie nicht nur an der Degeneration von Axonen und der Ausbildung von Läsionen beteiligt, sondern produzieren auch neurotrophe Faktoren und anti-inflammatorische Moleküle. Zusätzlich sind sie an der Beseitigung des Myelins beteiligt.^[217,218] Die EAE stellt insgesamt ein nützliches Tiermodell zur Erforschung der Rolle von Makrophagen bei der MS dar, jedoch ist es nicht in der Lage die volle Komplexität und Heterogenität der humanen Pathologie, vor allem in Bezug auf den Langzeitverlauf der Erkrankung, abzubilden.

3.5 NF- κ B

Bei entzündlichen ZNS-Erkrankungen spielt, wie bereits erwähnt, die Aktivierung von myeloiden Zellen im ZNS und von peripheren Leukozyten sowie deren Rekrutierung zum Entzündungsort eine entscheidende Rolle. Der Transkriptionsfaktor NF- κ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells*) stellt bei all diesen Inflammationsvorgängen ein Schüsselement dar, da er von allen Immunzellen exprimiert wird und Einfluss auf die Differenzierung, Proliferation und das Überleben von Immunzellen hat.^[219,220]

In Säugetieren wurden fünf Mitglieder der NF- κ B Familie gefunden: c-Rel, p65 (RelA), RelB, p105/p50 (NF- κ B1) und p100/p52 (NF- κ B2).^[221-223] Ihnen gemeinsam ist eine ca. 300 Aminosäuren umfassende Sequenz, die als Rel-Homologie-Domäne (RHD) bezeichnet wird. Diese enthält die nukleäre Lokalisierungssequenz (NLS), welche für die Translokation vom Zytoplasma in den Zellkern verantwortlich ist (Abbildung 2). Darüber hinaus vermittelt die

RHD die Interaktion mit inhibitorischen κ B Proteinen (I κ B), ist für die Dimerisierung mit anderen NF- κ B Proteinen verantwortlich und vermittelt die sequenzspezifische DNA-Bindung.^[222] Während c-Rel, RelA und RelB als Transkriptionsaktivatoren fungieren, fehlt diese für die Initiation der Transkription notwendige Transaktivierungsdomäne (TAD) am C-Terminus der p50- und p52 Proteine.^[223] Homodimere von p50 bzw. p52 agieren daher als transkriptionelle Repressoren.^[224]

In unstimulierten Zellen interagieren NF- κ B Dimere mit I κ B Proteinen, die als gemeinsames strukturelles Motiv fünf bis acht *ankyrin repeats* aufweisen (Abbildung 2). Dabei binden die I κ B Proteine über ihre *ankyrin repeats* an die RHD der NF- κ B Proteine, maskieren dadurch die NLS und verhindern so die Translokation in den Nukleus.^[222] In Säugetierzellen sind acht Mitglieder der I κ B Familie bekannt: I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ , I κ B γ , I κ B η , Bcl-3 sowie die NF- κ B Vorläufer p105 und p100.^[225,226] Erst nach Prozessierung der Proteine p50 und p52 aus den Vorläufern p105 und p100 werden diese zu potentiellen Transkriptionsfaktoren (Abbildung 2).^[227]

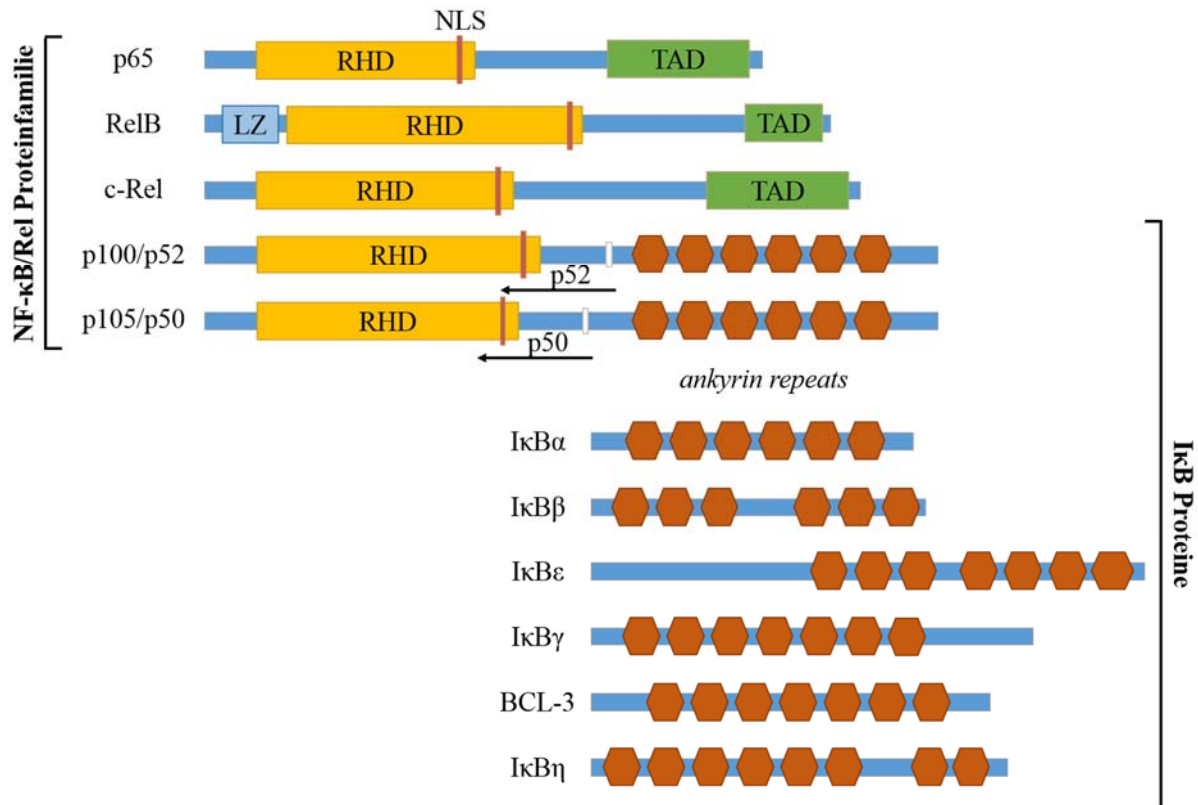


Abbildung 2 Schematische Darstellung der NF-κB- und IκB Proteinfamilie. In Säugetieren besitzen die IκB Proteine *ankyrin repeats*, mit denen sie an die Rel-Homologie-Domäne (RHD) am N-Terminus der NF-κB Proteine binden und deren Translokation in den Nukleus, durch Blockierung der nukleären Lokalisierungssequenz (NLS), verhindern. Die Proteine p50 und p52 weisen im Vergleich zu den anderen Mitgliedern der NF-κB Proteinfamilie keine Transaktivierungsdomäne (TAD) am C-Terminus auf. Beide Proteinfamilien überschneiden sich bei den Vorläufern p105 und p100, die zusätzlich zur RHD *ankyrin repeats* aufweisen und die an den markierten Stellen zu p50 bzw. p52 proteolytisch prozessiert werden. LZ: Leucin-Zipper (Abbildung erstellt nach Hayden und Ghosh, 2012 sowie Yamauchi et al., 2010) ^[226,228]

NF-κB kann durch eine Vielzahl verschiedener Stimuli, zum Beispiel Zytokine, Mitogene, zellulärer Stress und bakterielle Lipopolysaccharide (LPS), aktiviert werden.^[229] Dabei unterscheidet man zwischen dem kanonischen und dem nicht-kanonischen Signalweg.

Das Prinzip der NF-κB Aktivierung beruht stets auf einer induzierten proteolytischen Degradation von IκB Proteinen. Diese wird von einem IκB Kinasekomplex (IKK), der aus den katalytischen Kinaseuntereinheiten IKKα (IKK1) und IKKβ (IKK2) sowie der regulatorisch wirkenden Untereinheit NEMO (*NF-κB essential modulator*, IKKγ) besteht, reguliert.^[221,223,230] Beim kanonischen Signalweg stellen neben den proinflammatorischen Zytokinen, wie TNF-α und IL-1β, auch bakterielle und virale Moleküle (PAMPs) aktivierende Stimuli dar. Diese binden an Vertreter der TNF-Rezeptor (TNFR) bzw. Toll-like-Rezeptor-Interleukin-1 Familie (TLR/IL-1R).^[231] Die intrazelluläre Signalweiterleitung erfolgt dabei über Adapterproteine der

TRAF Proteinfamilie (*TNF-receptor associated factor*), wobei TRAF-6 für die IL-1 vermittelte IKK-Aktivierung verantwortlich ist, während TRAF-2 (oder in deren Abwesenheit TRAF-5) für die TNF- α -induzierte Signalübertragung essentiell ist. Über die Interaktion und Ubiquitinierung von RIP (*receptor-interacting protein*) kommt es zur Aktivierung von TAK1 (*transforming growth factor- β -activated kinase 1*). TAK1 wiederum phosphoryliert IKK2 im I κ B Kinasekomplex. In deren Folge kommt es zur IKK2-vermittelten Phosphorylierung von I κ B Proteinen an ihren Serinen 32 und 36. Dies resultiert in der Rekrutierung einer Ubiquitin E3 Ligase, die Lysinreste in I κ Bs ubiquitiniert und sie damit für die Degradation durch 26S Proteosomen markiert. Die dabei freiwerdenden NF- κ B Dimere können nun in den Kern translozieren. Hier binden sie spezifisch an κ B-*sites* in Promotoren bestimmter Gene und aktivieren bzw. inhibieren deren Transkription (Abbildung 3).^[221,232-234]

Abhängig vom Stimulus und dem jeweiligen Zelltyp kann NF- κ B unterschiedliche zelluläre Reaktionen auslösen. Die Zielgene von NF- κ B umfassen dabei u.a. die folgenden Zytokine, Chemokine und Zelladhäsionsmoleküle: GM-CSF, IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , IL6, IL-8, RANTES, VCAM-1, E-Selektin, ICAM-1.^[229]

Beim nicht-kanonischen Signalweg wird der IKK-Komplex dagegen durch andere Vertreter der TNF-Zytokinfamilie, zum Beispiel Lymphotoxin- β , CD40 und BAFF (*B-cell activating factor*), sowie der TRAF-Familie aktiviert. Zudem kommt es hier zur IKK1-vermittelten Phosphorylierung von p100, in deren Folge p52/RelB Dimere in den Nukleus translozieren.^[227,228,230]

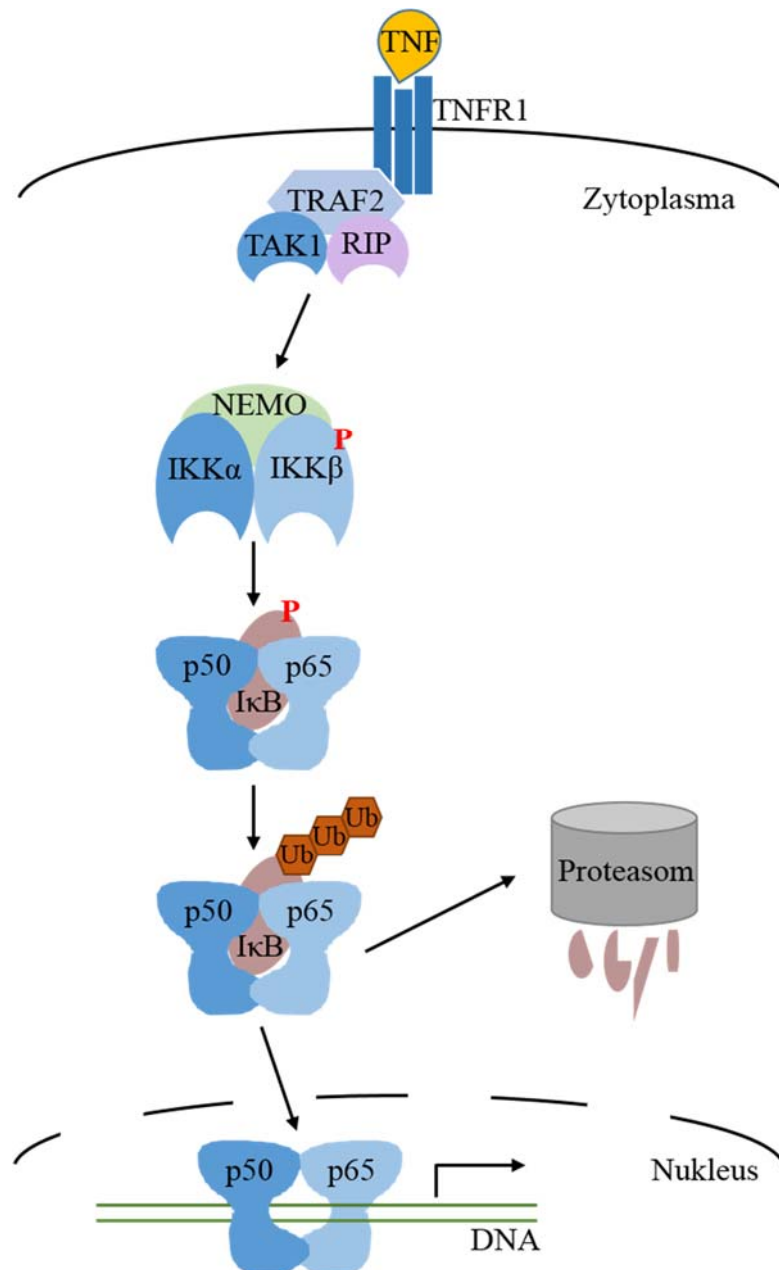


Abbildung 3 Vereinfachtes Schema zur Aktivierung von NF-κB durch den kanonischen Signalweg am Beispiel von TNF. Der Tumornekrosefaktor (TNF) bindet an den TNF-Rezeptor 1 (TNFR1), wodurch es über TRAF2, RIP und TAK1 zur Aktivierung des IKK-Komplexes kommt. Die IKKβ-vermittelte Phosphorylierung und Ubiquitinierung von IκB führt zu deren Proteolyse. Die freiwerdenden p50/p65 Heterodimere translozieren in den Nucleus und aktivieren bzw. inhibieren die Transkription von NF-κB Zielgenen. (Abbildung erstellt nach Oeckinghaus et al. 2011)^[232]

Bei der Aktivierung von NF-κB durch den kanonischen Signalweg stellt IKK2 im IκB Kinasekomplex ein Schlüsselement dar. Damit ist es für die Forschung ein wichtiges Zielprotein zur Untersuchung und Modulation NF-κB-abhängiger Immunantworten.

In Mäusen wurde gezeigt, dass die Deletion von IKK2 zu einer apoptotischen Leberdegeneration führt und im Alter von E13,5 embryonal lethal ist.^[235] Gleiches gilt für die Deletion von NEMO in Mäusen.^[236] Im Gegensatz dazu starben IKK1-defiziente Mäuse bei der Geburt. Sie zeigen zudem morphogenetische Defekte, was die unterschiedliche Rolle von IKK1 und IKK2 bei der Aktivierung des NF- κ B Signalweges verdeutlicht.^[237] Der Knockout von RelA/p65 führt zur massiven Apoptose der murinen Hepatozyten und in deren Folge zum Tod (E15). Durch Deletionen von *Tnf* oder *Tnfr1* Genen konnten diese Leberschäden jedoch umgangen werden.^[238-240] Diese Ergebnisse zeigen die Sensibilität der sich entwickelnden Leber gegenüber TNF-induziertem Zelltod bei Verlust der Genfunktion von Vertretern der NF- κ B Familie.

Im Gegensatz dazu zeigen p50-defiziente Mäuse keine Entwicklungsdefekte.^[241] p50 scheint damit für die Induktion anti-apoptotischer Gene nicht notwendig zu sein. Jedoch konnten in diesen Tieren multifokale Defekte hinsichtlich ihrer Immunantworten gefunden werden. So fehlt den B-Lymphozyten in den p50-defizienten Tieren u.a. die Fähigkeit zur Proliferation als Reaktion auf LPS. Außerdem zeigen sie veränderte Immunantworten gegenüber Infektionen.^[241] Dies verdeutlicht die Relevanz des p50/p65 Heterodimers im TLR-Signalweg.

Aufgrund der embryonalen Letalität von IKK2-Deletionsmutanten müssen konditionale Knockout-Tiere verwendet werden, um die *Ikk2*-Genfunktion und die Rolle von NF- κ B in myeloiden Zellen adulter Tiere zu untersuchen.

3.5.1 Konditionaler Knockout von *Ikk2* – das Cre/loxP System

Mit Hilfe des Cre/loxP Systems, welches erstmals von Sternberg et al. 1981 beschrieben wurde, kann eine gewebe- oder zellspezifische Deletion eines Gens untersucht werden.^[242] Es besteht dabei aus zwei Elementen: den loxP-sites (*locus of crossing (X) over P1*), palindromischen DNA-Sequenzen, die das zu untersuchende Gen flankieren, sowie einer Cre-Rekombinase (*causes recombination*). Die Cre-vermittelte Rekombination ist dabei abhängig von der Orientierung der loxP-sites. So können neben Deletionen auch Insertionen, Translokationen und Inversionen an spezifischen Stellen der DNA erfolgen.

Für die spezifische Deletion von Genen in myeloiden Zellen wurden LysMCre Mäuse, die erstmals von Clausen et al. generiert wurden, verwendet.^[243] Bei diesen Mäusen wurde eine Cre-Rekombinase in den Locus des Lysozym M (LysM)-Gens kloniert (Abbildung 4). Die resultierenden LysMCre Mäuse weisen keinen LysM-abhängigen Phänotyp auf.^[244,245] Clausen

et al. konnten mit Hilfe homozygoter LacZ-Reportermause zudem zeigen, dass eine Deletionseffizienz von 83-98% in ausdifferenzierten Makrophagen, von fast 100% in Granulozyten und von 16% in dendritischen CD11c⁺ Milzzellen in diesen Mäusen erreicht werden kann. In B- und T-Zellen sowie isolierter DNA aus dem Schwanz der Tiere, wurde dagegen keine Cre-vermittelte Deletion festgestellt.^[243] Ähnliche Resultate wurden auch in einer LysM-EGFP Reportermaus gefunden.^[244]

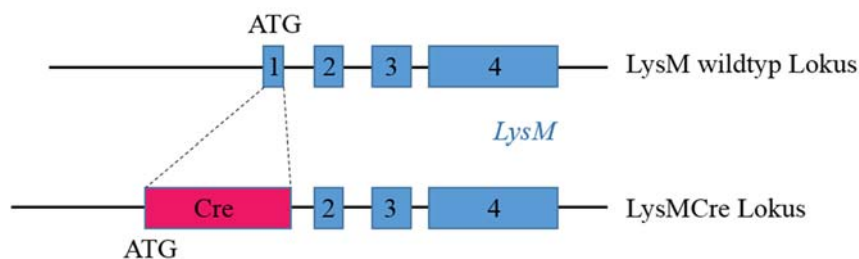


Abbildung 4 Schematische Darstellung der Klonierung der Cre-Rekombinase in den LysM-Lokus. Der murine LysM wildtyp Locus enthält vier Exons. Die Cre-Rekombinase wurde ins erste Exon des *LysM* Gens direkt hinter das Transkriptionsstartkodon (ATG) kloniert.

Um die Rolle von IKK2 in unterschiedlichen Geweben zu untersuchen wurden die von Pasparakis et al. generierten *Ikk2*^{fl/fl} Mäuse, welche gefloxt (von loxP-sites flankierte) Exons 6 und 7 im *Ikk2* Allele tragen, verwendet (Abbildung 5).^[246] Diese Mäuse weisen eine normale postnatale Entwicklung sowie *Ikk2*-Expression auf.^[246] Die Kreuzung dieser Tiere mit ubiquitären Cre-Deletionsmäusen resultierte in Nachkommen mit deletierten *Ikk2*-Allelen in allen Zellen. Aufgrund der Degeneration der Leber sterben die Nachkommen dieser Tiere *in utero*.^[247,248] Um die Rolle von NF-κB bei inflammatorischen Erkrankungen zu untersuchen, haben sich daher konditionale Knockout-Tiere von *Ikk2* etabliert. Dazu wurden LysMCre Mäuse mit IKK2^{fl/fl} Tieren verpaart, wobei die Cre-Rekombination an den loxP-sites zur Deletion von Exon 6 und 7 des *Ikk2*-Allels führt und damit ein *Ikk2*-Nullallel in myeloiden Zellen generiert wird (Abbildung 5).

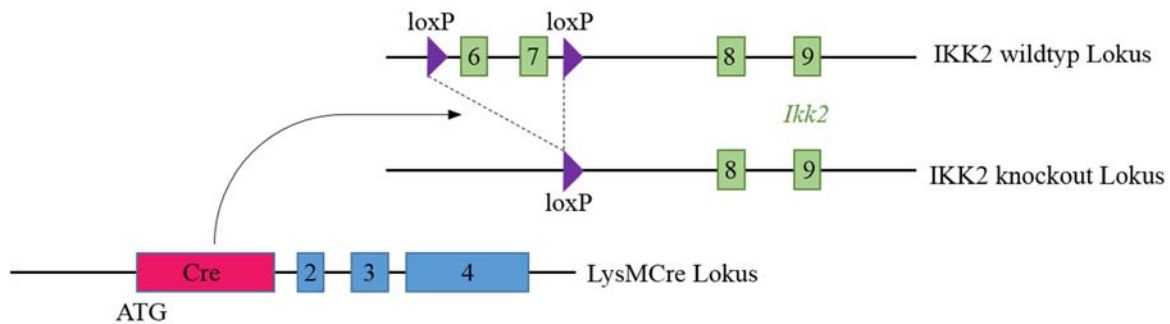


Abbildung 5 Schematische Darstellung der Generierung von myeloid-spezifischen IKK2 Knockout-Mäusen (IKK2^{mye}). Exon 6 und 7 des endogenen IKK2 wildtyp Lokus werden von loxP-sites flankiert. Die Cre-Rekombination an diesen loxP-sites führt zur Deletion der Exons 6 und 7 und verursacht *Ikk2*-Nullallele.

Bei Verpaarung von *Ikk2*^{fl/fl} Mäusen mit K14-Cre Tieren, die Cre spezifisch in Keratinozyten exprimieren, konnte eine vollständige Deletion von IKK2 in der Epidermis gefunden werden. Die Tiere entwickelten eine schwere entzündliche Erkrankung der Haut, verursacht durch eine TNF-vermittelte, T-Zell unabhängige Immunantwort.^[246] C19-Cre *Ikk2*^{fl/fl} Mäusen, welche eine B-Zell spezifische Ablation von IKK2 aufweisen, fehlen reifen B-Zellen, was die Relevanz der IKK2-vermittelten Aktivierung von NF-κB bei deren Erhaltung verdeutlicht.^[249] Auch für die Generierung und das Überleben reifer T-Zellen ist die IKK2-induzierbare NF-κB Aktivierung verantwortlich. So konnten Schmidt-Supprian et al. zeigen, dass durch IKK2-Deletion in CD4-Cre *Ikk2*^{fl/fl} Mäusen die Entwicklung von regulatorischen und *memory* T-Zellen verhindert wird.^[250]

LysM-Cre X *Ikk2*^{fl/fl} Mäuse, die eine myeloid-spezifische Deletion von IKK2 aufweisen (IKK2^{mye}), zeigen erhöhte Mengen an IL-1β im Plasma, welches von Makrophagen und Neutrophilen sezerniert wird. Bei LPS-induziertem endotoxischen Schock weisen diese Tiere eine erhöhte Mortalitätsrate auf.^[251] Die enorme Bedeutung von myeloid-spezifischem IKK2 bei Inflammationsprozessen und der Tumorentstehung wurde durch Studien an Knochenmark-abgeleiteten Makrophagen aus IKK2^{mye} Mäusen verdeutlicht. Diese zeigten nach LPS-Stimulation eine erhöhte Apoptose.^[252,253]

3.6 Aufgabenstellung

Bei entzündlichen Erkrankungen des ZNS spielt die Aktivierung von myeloiden Zellen und zirkulierenden Leukozyten sowie deren Rekrutierung zum Entzündungsort eine entscheidende Rolle. Bei all diesen Inflammationsvorgängen stellt der NF- κ B Signalweg ein Schlüsselement dar. Daher sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit **1)** die Rolle von NF- κ B in myeloischen Zellen bei entzündlichen Erkrankungen des ZNS am Beispiel der EAE untersucht werden. Dazu wurden konditionale Knockout-Tiere für die I κ B Kinase IKK2, einem Element im NF- κ B Signalweg, unter der Kontrolle des LysM Promotors (IKK2^{mye}) verwendet.

Neben der Modulation von κ B-abhängigen Immunantworten birgt die stabile Einwanderung myeloider Zellen ins adulte ZNS ebenfalls ein hohes therapeutisches Potenzial zur Behandlung von ZNS-Erkrankungen. Unter nicht-pathologischen Bedingungen ist der Zugang zum ZNS durch die Blut-Hirn-Schranke jedoch limitiert. Publierte Daten verdeutlichen die Notwendigkeit einer Konditionierung, zum Beispiel in Form einer myeloablativen Behandlung, für die myeloide Zellrekrutierung ins ZNS.^[72,84] Im Rahmen der vorliegenden Dissertation sollte daher **2)** ein nicht-myeloablatives Modell zur Rekrutierung myeloider Zellen ins ZNS etabliert werden. Dabei stellen die selektive Kopfbestrahlung sowie die Behandlung mit dem Chemotherapeutikum Busulfan vielversprechende Alternativen zur Ganzkörperbestrahlung dar.^[254,255]

Publierte Daten geben Hinweise darauf, dass die Bestrahlung des ZNS die Regulation von Genen induziert, darunter Zytokine und Chemokine, die die Migration von Knochenmarkzellen ins ZNS steuern. So wurde u.a. eine Hochregulation der Genexpression von CXCL10 nach Bestrahlung im Gehirn publiziert.^[60,84] Daher sollte **3)** die Rolle des CXCL10-Rezeptors, CXCR3, beim Rekrutierungsprozess von myeloiden Zellen ins ZNS näher untersucht werden. Da keine CXCR3-Knockout Tiere, die ubiquitär GFP exprimieren, kommerziell zur Verfügung standen, wurden Knochenmarkzellen aus CXCR3-Knockout Tieren retroviral GFP markiert und diese dann für Transferexperimente verwendet. Die gleiche Methode wurde für die CXCR3-Wildtyp-Kontrolltiere angewandt.

4 Materialien

4.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
Autoklavierband	Roth, Karlsruhe (Dtl.)
Bakterieninkubator Minitron	Infors AG, Bottmingen (Schweiz)
Bestrahlungsgerät Gammacell® 40	Best Theratronics, Ottawa (Kanada)
BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg (Dtl.)
Bunsenbrenner Gasprofi 2	WLD-TEC, Göttingen (Dtl.)
CCD Kamera	Finger Lakes Instrumentation, New York (USA)
CO ₂ Inkubator MCO-18AIC (UV)	Sanyo, München (Dtl.)
Dampfsterilisator/Autoklav	H&P Labortechnik, Oberschleißheim (Dtl.)
Deckgläschen	Roth, Karlsruhe (Dtl.); Marienfeld, Lauda-Königshofen (Dtl.)
Durchflusszytometer	
FACSCalibur™	BD Biosciences, Heidelberg (Dtl.)
FACSCanto™ II	BD Biosciences, Heidelberg (Dtl.)
LSR II	BD Biosciences, Heidelberg (Dtl.)
MACSQuant	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach (Dtl.)
Einmalkanülen: 24G, 30G	B. Braun, Melsungen (Dtl.)
Elektrophoresekammer (Sub-Cell® GT)	BioRad, München (Dtl.)
ELISA-Photometer	Dynex Technologies, Denkendorf (Dtl.)
Filter: 0,2 µm, 0,45 µm	GE Healthcare, Solingen (Dtl.)
Glasware	Schott Duran, Wertheim/Main (Dtl.)
Homogenisierer	Roth, Karlsruhe (Dtl.)
Infarotlampe	Rossmann, Burgwedel (Dtl.)
Insulinspritzen (BD MicroFine)	BD Biosciences, Heidelberg (Dtl.)
LightCycler® 2.0	Roche, Mannheim (Dtl.)
MACS	
AutoMACS	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach (Dtl.)
gentleMACS™ C tubes	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach (Dtl.)
gentleMACS™ Dissociator	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach (Dtl.)
MACSmix™ Tube Rotator	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach (Dtl.)
MACS MS und LS Säulen	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach (Dtl.)
MiniMACS™	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach (Dtl.)
Magnetrührer VMS-A	VWR, Darmstadt (Dtl.)
Mikroskop	
Konfokalmikroskop Leica DM2500	Leica, Wetzlar (Dtl.)
Licht- und Fluoreszenzmikroskop Leica DMRA2	Leica, Wetzlar (Dtl.)
Lichtmikroskop Olympus CKX41	Olympus, Hamburg (Dtl.)
Stereomikroskop Leica Zoom 2000	Leica, Wetzlar (Dtl.)
Mikrowelle MW 736	Clatronic, Kempen (Dtl.)
Mini Trans-Blot® Elektrophoresekammer	BioRAD, München (Dtl.)

Bezeichnung	Hersteller
Netzgerät Power Pac 200	BioRAD, München (Dtl.)
Objektträger	Dako, Kalifornien (USA)
Objektträger SuperFrost® ULTRA plus	R. Langenbrinck, Emmendingen (Dtl.)
PCR Mastercycler Gradient	Eppendorf, Hamburg (Dtl.)
pH-Meter (pH100)	VWR, Darmstadt (Dtl.)
Pipetten und –spitzen	
Combitips Plus	Eppendorf, Hamburg (Dtl.)
Einkanalpipetten	Eppendorf, Hamburg (Dtl.); Gilson, Limburg-Offheim (Dtl.)
Mehrkanalpipette	Eppendorf, Hamburg (Dtl.)
Multistep-Pipette	Eppendorf, Hamburg (Dtl.)
Pasteur-Pipette	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt (Dtl.)
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nürnberg (Dtl.); Sorenson BioScience, Utah (USA)
Serologische Pipetten: 2ml, 5ml, 10ml, 25ml	BD Biosciences, Heidelberg (Dtl.)
Pipettierhelfer accu-jet® pro	Brand, Wertheim (Dtl.)
Pistille für Homogenisierer	Roth, Karlsruhe (Dtl.)
Polyvinylidenfluorid (PVDF)- Membran	Roth, Karlsruhe (Dtl.)
Präparierbesteck	FST, Heidelberg (Dtl.)
Reaktionsgefäße/-platten	
Einfrierröhrchen (Cryotubes)	Thermo Scientific, Massachusetts (USA)
FACS Röhrchen: 5ml, 10ml, 50ml	BD Biosciences, Heidelberg, (Dtl.)
PCR-Tubes: 1,5ml, 2ml	Biozym, Hessisch Oldenburg (Dtl.); Eppendorf, Hamburg (Dtl.)
Petrischalen	Nunc, Wiesbaden (Dtl.)
Polypropylen-Röhrchen: 15ml	BD Biosciences, Heidelberg (Dtl.)
Safe-Lock Eppis: 0,5ml, 1,5ml	Eppendorf, Hamburg (Dtl.)
Vacutainer	BD Biosciences, Heidelberg (Dtl.)
Zellkulturflaschen: 75cm ²	BD Biosciences, Heidelberg (Dtl.)
Zellkulturplatten: 6-, 12-, 24-, 96-well	BD Biosciences, Heidelberg (Dtl.)
Restrainer	LabArt, Waldbüttelbrunn (Dtl.)
Scanner und Bildgerät Typhoon 8600	Amersham Biotec, Kalifornien (USA)
Schüttler K50-500	Incutec, Mössingen (Dtl.)
Spritzen: 1ml, 5ml, 30ml	BD Biosciences, Heidelberg, (Dtl.)
Sterilwerkbank Biowizard	Kojair, Vilppula (Finnland)
Vertikaler Schüttler SM-30	Edmund Bühler Lab Tec, Hechingen (Dtl.)
Vortexer MS2 Minishaker	IKA, Staufen (Dtl.)
Waage (Analytical Balances LC 620 S)	Sartorius, Göttingen (Dtl.)
Zählkammer Neubauer Improved	Laboroptik, Bad Homburg (Dtl.)
Zellsiebe: 40 µm, 70µm	BD Biosciences, Heidelberg (Dtl.)
Zentrifugen	
Biofuge pico	Heraeus, Hanau (Dtl.)
Universal 32	Hettich, Oberhausen (Dtl.)

Bezeichnung	Hersteller
Universal 320	Hettich, Oberhausen (Dtl.)
Zentrifuge 5804R	Eppendorf, Hamburg (Dtl.)

4.2 Chemikalien und Lösungen

Bezeichnung	Vertrieb
Agarose NEEO Ultra	Roth, Karlsruhe (Dtl.)
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (Dtl.)
Ampuwa, Plastipur (steriles H ₂ O)	Fresenius Kabi, Bad Homburg (Dtl.)
Anti-PE microbeads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach (Dtl.)
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (Dtl.)
Bromphenolblau	New England Biolabs, Frankfurt/Main (Dtl.)
Collagenase	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (Dtl.)
Complete Freund's Adjuvanz (CFA)	Difco, Michigan (USA)
Cotrim (250 mg/5ml)	Ratiopharm, Ulm (Dtl.)
Deoxyribonuclease I (DNase I)	Roche, Mannheim (Dtl.)
D-Glucose	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (Dtl.)
4', 6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (Dtl.)
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Roth, Karlsruhe (Dtl.)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (Dtl.)
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (Dtl.)
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (Dtl.)
dNTP Mix (10mM)	Promega, Mannheim (Dtl.)
Dulbecco's MEM (DMEM)	Biochrom AG, Berlin (Dtl.)
Eosinlösung	Roth, Karlsruhe (Dtl.)
Essigsäure	Merck, Darmstadt (Dtl.)
Ethanol	J.T. Baker, Deventer (NL)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth, Karlsruhe (Dtl.)
FluorSave™	Merck, Darmstadt (Dtl.)
5-Fluoruracil	Hexal, Holzkirchen (Dtl.)
Fötale Kälberserum (FKS)	Biochrom AG, Berlin (Dtl.)
GelRed™	Biotium, Kalifornien (USA)
Glutaraldehyd	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (Dtl.)
Glycerin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (Dtl.)
4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure (HEPES)	Roth, Karlsruhe (Dtl.)
Hämatoxylin nach Mayer	Roth, Karlsruhe (Dtl.)
<i>Hank's Balanced Salt Solution</i> (HBSS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (Dtl.)
Heparin	Roche, Mannheim (Dtl.)
Histoacryl	B. Braun, Melsungen (Dtl.)
Histopaque®-1083	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (Dtl.)
Isofluran	Abbott, Baar (Schweiz)
Isopropanol	Roth, Karlsruhe (Dtl.)
Ketamin 10%	WDT eG, Garbsen (Dtl.)
Kresylviolett	Merck Millipore, Schwalbach (Dtl.)
L-Glutamin, 200mM	Biochrom AG, Berlin (Dtl.)
Lipopolysaccharid (LPS) von <i>E. coli</i>	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (Dtl.)

Bezeichnung	Vertrieb
Lithiumcarbonat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (Dtl.)
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (Dtl.)
2-Methylbutan	Roth, Karlsruhe (Dtl.)
M-MLV Puffer	Promega, Mannheim (Dtl.)
M-MLV Reverse Transkriptase	Promega, Mannheim (Dtl.)
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Ra	Difco, Michigan (USA)
Natriumazid (NaN ₃)	Roth, Karlsruhe (Dtl.)
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (Dtl.)
Natriumchlorid (0,9%)	Roche, Mannheim (Dtl.)
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Roth, Karlsruhe (Dtl.)
Natriumhydroxid-Plätzchen	Roth, Karlsruhe (Dtl.)
Normal donkey serum	Biozol, Eching (Dtl.)
Normal goat serum	Biozol, Eching (Dtl.)
Pam ₃ CysSK ₄	EMC Microcollections, Tübingen (Dtl.)
Paraformaldehyd (PFA)	Roth, Karlsruhe (Dtl.)
Penicillin/Streptomycin 10.000 U/ml	Biochrom AG, Berlin (Dtl.)
Percoll	GE Healthcare, Solingen (Dtl.)
Perm/Wash Puffer	BD Biosciences, Heidelberg (Dtl.)
Pertussis Toxin (PTX)	List Biological Laboratories, Kalifornien (USA)
Pharm Lyse Puffer	BD Biosciences, Heidelberg (Dtl.)
Phosphatgepufferte Kochsalzlösung	Life Technologies, Darmstadt (Dtl.); Sigma-Aldrich, Taufkirchen (Dtl.)
Polybrene	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (Dtl.)
Ponceau S	AppliChem, Darmstadt (Dtl.)
Random Primers	Promega, Mannheim (Dtl.)
Rapamycin	BioVision, Kalifornien (USA)
Roti [®] -Histokitt	Roth, Karlsruhe (Dtl.)
Roti [®] -Histol	Roth, Karlsruhe (Dtl.)
Rotiphorese [®] Gel 30	Roth, Karlsruhe (Dtl.)
Roti Quant Bradford Reagent	Roth, Karlsruhe (Dtl.)
RPMI 1640 Zellkulturmedium	Biochrom, Berlin (Dtl.)
RQ1 DNase	Promega, Mannheim (Dtl.)
RQ1 DNase stop solution	Promega, Mannheim (Dtl.)
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	Roth, Karlsruhe (Dtl.)
Spezialdiätfutter SDS VRF1	Charles River, Wilmington (USA)
Sucrose	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (Dtl.)
SuperBlock T20	Pierce, Bonn (Dtl.)
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Roth, Karlsruhe (Dtl.)
<i>Tissue-Tek O.C.T.™ Compound</i>	Sakura Finetek, Staufen (Dtl.)
Tris-hydrochlorid (Tris HCl)	Roth, Karlsruhe (Dtl.)
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (Dtl.)
Trypsin-EDTA	Biochrom, Berlin (Dtl.)
Türks Lösung	Merck, Darmstadt (Dtl.)
Whatman Papier	NeoLab, Heidelberg (Dtl.)
Western Lightning Plus	Perkin Elmer, Rodgau (Dtl.)
Electrochemiluminescence	
Xylazin 2%	Bayer AG, Leverkusen (Dtl.)

Bezeichnung	Vertrieb
Zytokine	
Interleukin-23, murines (IL-23)	R&D Systems, Wiesbaden (Dtl.)
Interleukin-3, murines (IL-3)	BD Biosciences, Heidelberg (Dtl.)
Interleukin-6, humanes (IL-6)	BD Biosciences, Heidelberg (Dtl.); R&D Systems, Wiesbaden (Dtl.)
rSCF (rat stem cell factor)	AbD Serotec, Oxfordshire (GB)
Transforming growth factor beta, humanes (TGF- β)	R&D Systems, Wiesbaden (Dtl.)

4.3 Marker

Bezeichnung	Vertrieb
50bp DNA Marker	New England Biolabs, Fankfurt/Main (Dtl.)
100bp Marker	New England Biolabs, Fankfurt/Main (Dtl.)

4.4 Reaktions-Kits

Bezeichnung	Vertrieb
ApopTag® Fluorescein In Situ Apoptosis Detection Kit	Merck Millipore, Schwalbach (Dtl.)
CD4 ⁺ CD62L ⁺ T Cell Isolation Kit II (mouse)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach (Dtl.)
CD11b MicroBeads (mouse/human)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach (Dtl.)
Cytometric Bead Array (CBA) Kit: Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine	BD Biosciences, Heidelberg (Dtl.)
LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I Kit	Roche, Mannheim (Dtl.)
Mouse IL-1 β /IL-1F2 Quantikine ELISA Kit	R&D Systems, Wiesbaden (Dtl.)
REExtract-N-Amp™ Tissue PCR Kit	Sigma-Aldrich, Steinheim (Dtl.)
RNeasy Plus Mini Kit	QIAGEN, Hilden (Dtl.)
SIGMAFAST™ DAB tablets	Sigma-Aldrich, Steinheim (Dtl.)
VECTASTAIN® ABC Kit	Vector Laboratories, Burlingame (USA)

4.5 Peptide

Für die EAE-Versuche wurde das MOG₃₅₋₅₅ (MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK) Peptid von Activotec (Cambridge, Großbritannien) verwendet.

4.6 Oligonukleotidprimer

Alle Oligonukleotidprimer wurden mit dem Programm „Primer 3“ designt und von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Dtl.) bezogen.

Genotypisierungsprimer

Bezeichnung	Sequenz
NLSCre-FP	5'- CCC AAG AAG AAG AGG AAG GTG TCC -3'
Cre8-RP	5'- CCC AGA AAT GCC AGA TAA CG -3'
HL15	5'- AAG ACC GCG AAG AGT TTG TCC -3'
HL54	5'- TAA GCC TGC CCA GAA GAC TCC -3'
HL152	5'- AAG GGA GCT GCA GTG GAG TA -3'
LysM-FP	5'- CCA TTA TTT CAC AGC AGC ATT GC -3
LysM-RP	5'- GCT GAC TCC ATA GTA GCC AG -3'
Ikk2-FP	5'- CCT ATT CCA AGA AGG CCA CAC CTC C -3'
Ikk2-RP	5'- GAC TAG CCT GCA AGA GAC AAT ACG -3'
CXCR3-WT-FP	5'- AGA ATC ATC CTG GTC TGA GAC AA -3'
CXCR3-WT-RP	5'- AAG ATA GGG CAT GGC AGC TA -3'
CXCR3-KO-FP	5'- CAA GAT GGA TTG CAC GCA G -3'
CXCR3-KO-RP	5'- CAT CCT GAT CGA CAA GAC -3'

Quantitative RT-PCR Primer

Bezeichnung	Sequenz
Itgb3 FP	5'- AAA ACG CCG TGA ATT GTA CC -3'
Itgb3 RP	5'- GAG TAG CAA GGC CAA TGA GC -3'
CCL2 FP	5'- TCT GGG CCT GCT GTT CAC -3'
CCL2 RP	5'- GTC TGG ACC CAT TCC TTC CTT C -3'
	5'- TTG GGA TCA TCT TGC TGG TG -3'
CCL21 FP	5'- GCT ATA GGA AGC AAG AAC C -3'
CCL21 RP	5'- GGA GGC CCT TTC CTT TCT TTC C -3'
CCL5 FP	5'- TGC CCA CGT CAA GGA GTA TTT -3'
CCL5 RP	5'- TCT CTG GGT TGG CAC ACA CTT -3'
CD40 FP	5'- GAC TCA GGC GAA TTC TCA GC -3'
CD40 RP	5'- CCC TCC TTC TTA ACC CGA AG -3'
CXCL4 FP	5'- CTT CTG GGC CTG TTG TTT CT -3'
CXCL4 RP	5'- CCC AGA GGA GAT GGT CTT CA -3'
CXCL10 FP	5'- TGC TGG GTC TGA GTG GGA CT -3'
CXCL10 RP	5'- CCC TAT GGC CCT CAT TCT CAC -3'
E-Selektin FP	5'- AGC TAC CCA TGG AAC ACG AC -3'
E-Selektin RP	5'- CGT TAT CCC AGA TGC CAG AT -3'
GAPDH FP	5'- AGA TTG TCA GCA ATG CAT CCT GC -3'
GAPDH RP	5'- CCT TCT TGA TGT CAT CAT ACT TGG -3'
ICAM-1 FP	5'-GAG AGT GGA CCC AAC TGG AA -3'
ICAM-1 RP	5'- GCC ACA GTT CTC AAA GCA CA -3'
IL-1 β FP	5'- CAG GCA GGC AGT ATC ACT CA -3'
IL-1 β RP	5'- AGG TGC TCA TGT CCT CAT CC -3'
IL-10 FP	5'- CTT GCA CTA CCA AAG CCA CA -3'
IL-10 RP	5'- TAA GAG CAG GCA GCA TAG CA -3'
P-Selektin FP	5'- TCC TGC TAC CCA GGC TTC TA -3'
P-Selektin RP	5'- GGC TGC AGT TCA TGA GAA CA -3'
TNF-alpha FP	5'- CATC TTC TCA AAA TTC GAG TGA CAA -3'
	5'- TCT TCT CAT TCC TGC TTG TGG -3'

Bezeichnung	Sequenz
TNF-alpha RP	5'- TGG GAG TAG ACA AGG TAC AAC CC -3' 5'- AGG GTC TGG GCC ATA GAA CT -3'
VCAM-1 FP	5'- ACA GAC AGT CCC CTC AAT GG -3'
VCAM-1 RP	5'- GTC ACA GCG CAC AGG TAA GA -3'

4.7 Puffer, Lösungen und Medien

Die Lösungen und Puffer wurden vor Verwendung steril filtriert und bei 4°C gelagert.

Dissektionspuffer: 10ml HBSS, 130µl 45% Glucose, 150µl 1M HEPES

MACS-Waschpuffer: 1x PBS, 2mM EDTA

5x Laemmli Puffer: 28 g/l Glycin, 6 g/l Tris Base, 1 g/l SDS in dH₂O

L929-konditioniertes Medium:

Konfluente L929-Zellen wurden in 75cm² Zellkulturflaschen in 30ml Mikrogliakulturmedium bei 37°C und 0,5% CO₂ im Brutschrank für 3-4 Tage inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch einen 0,2µm Filter filtriert und das Medium bei -20°C in Aliquote weggefroren. Die L929-Zellen wurden anschließend mit PBS gewaschen, für 5 min bei 37°C trypsinisiert, 1:10 gesplittet und in neue 75cm² Zellkulturflaschen ausgesät. Nach 3-4 Tagen wurden die konfluenten L929-Zellen erneut filtriert und das Medium weggefroren. Nach ca. 15 Passagen wurden die Zellen eliminiert.

Makrophagenmedium: RPMI-Medium, 20% FKS, 1% Penicillin/Streptomycin

Mausmedium: RPMI-Medium, 10% FKS, 1% Penicillin/Streptomycin, 1% HEPES, 1% L-Glutamin, 10 µg/ml β-Mercaptoethanol

Mikroglia-/Astrozytenkulturmedium:

DMEM (4,5 mg/l Glucose), 1% Penicillin/Streptomycin, 20% FKS

10x modifiziertes PBS: 20ml 10x PBS, 0,2g D-Glucose, 0,07g NaHCO₃

4% Paraformaldehyd: 20g PFA in 250ml dH₂O bei 50°C für 30 min lösen, NaOH-Plätzchen zufügen bis PFA aufgelöst, 250ml 0,2M PB, pH 7,4

0,2M Phosphatpuffer (PB): 21,8 g/l Na₂HPO₄, 6,4 g/l NaH₂PO₄ in dH₂O, pH 7,4

1x PBS: 9,6 g/l PBS in dH₂O

10% Polyacrylamid-Sammelgel:

0,33ml Rotiphorese[®] Gel 30, 0,4ml 0,625M Tris HCl (pH 6.8),
0,4ml 0,5% SDS in 0,87ml dH₂O lösen + 2 µl TEMED, 10 µl APS

10% Polyacrylamid-Trenngel:

2ml Rotiphorese[®] Gel 30, 1,2ml 1,88M Tris HCl (pH 8.8), 1,2ml 0,5%
SDS in 1,6ml dH₂O lösen + 5µl TEMED, 30 µl 10% APS

Producer-Cell-Medium (PCM):

DMEM (4,5mg/l Glucose), 20% FKS, 1% L-Glutamin,
1% Penicillin/Streptomycin

4x SDS Probenpuffer: 200mM Tris HCl (pH 6.8), 8% SDS, 0,4% Bromphenolblau,
40% Glycerin, 400mM DTT

50x Tris-Acetat-EDTA (TAE):

242 g/l Tris-HCL, 57,1 ml/l Essigsäure, 100 ml/l EDTA (0,5M) in
dH₂O lösen, pH 8

50mM Tris-buffered saline (TBS):

6,61 g/l Tris HCl, 0,97g/l Tris Base in dH₂O lösen, pH 7,4, 9 g/l NaCl

Waschmedium für die Th17-Zelldifferenzierung:

RPMI-Medium, 10% FKS, 1% Penicillin/Streptomycin, 1% HEPES

Western Blot Transfer Puffer:

200 ml/l 5x Laemmli Puffer, 200 ml/l Methanol in dH₂O lösen

Stock Isotonic Percoll (SIP):

36ml Percoll, 4ml 10x modifiziertes PBS

4.8 Antikörper

Antikörper für die Zellkultur

Spezifität	Klon	Herkunft
Anti-mouse CD28	37.51	eBioscience, San Diego (USA)
Anti-mouse CD3e	145-2C11	eBioscience, San Diego (USA)

Immunhistochemische Antikörper

Spezifität	Verdünnung	Herkunft
Primärantikörper		
anti-CD11b	1:250 (Mikroglia) 1:500 (Makrophagen)	AbD Serotec, Oxfordshire (GB)
anti-CD45	1:200	BD Biosciences, Heidelberg, (Dtl.)
anti-GFAP	1:1000	Zymed Laboratories, Kalifornien (USA)
anti-GFP rb	1:200	Invitrogen, Karlsruhe (Dtl.)
anti-GFP rat	1:200	Nascalai testque, Kyoto (Japan)
anti-iba1 rabbit	1:200	Wako, Neuss (Dtl.)
anti-NeuN rabbit	1:200	Invitrogen, Karlsruhe (Dtl.)
p65 rabbit	1:500	Santa Cruz, Heidelberg (Dtl.)

Sekundärantikörper

Alexa 488 donkey anti-rabbit	1:250	Invitrogen, Karlsruhe (Dtl.)
Alexa 488 donkey anti-rat	1:250	Invitrogen, Karlsruhe (Dtl.)
Alexa 594 donkey anti-rabbit	1:250	Invitrogen, Karlsruhe (Dtl.)
Alexa 594 goat anti-rat	1:250	Invitrogen, Karlsruhe (Dtl.)
biotinylierter goat anti-rabbit	1:200	Vector Laboratories, Kalifornien (USA)

FACS-Antikörper (Bezug über BD Biosciences, Heidelberg, Dtl. oder BioLegend, Fell, Dtl.)

Spezifität	gekoppeltes Fluorophor	Klon	Isotyp	Verdünnung
B220	PE	RA3-6B2	Rat IgG _{2a} , κ	1:400
CD11b	APC	M1/70	Rat IgG _{2b} , κ	1:400
CD11b	BV	M1/70	Rat IgG _{2b} , κ	1:200
CD11b	PerCP Cy5.5	M1/70	Rat IgG _{2b} , κ	1:200
CD115	PE	AFS98	Rat IgG _{2a} , κ	1:200
CD16/CD32	-	93	Rat IgG _{2a} , λ	1:400
CD183 (CXCR3)	BV	173	Armenian Hamster IgG	1:200
CD4	APC	RM4-5	Rat IgG _{2a} , κ	1:400
CD4	FITC	GK1.5	Rat IgG _{2b} , κ	1:200
CD4	PE	GK1.5	Rat IgG _{2b} , κ	1:200
CD45	FITC	30-F11	Rat IgG _{2b} , κ	1:200
CD45	PerCP Cy5.5	30-F11	Rat IgG _{2b} , κ	1:200
CD45	PB	30-F11	Rat IgG _{2b} , κ	1:200
CD45	V500	30-F11	Rat IgG _{2b} , κ	1:200

Spezifität	gekoppeltes Fluorophor	Klon	Isotyp	Verdünnung
CD8	PE	53-6.7	Rat IgG _{2a} , κ	1:200
CD8	PE Cy7	53-6.7	Rat IgG _{2a} , κ	1:400
c-kit (CD117)	APC	2B8	Rat IgG _{2b} , κ	1:200
IFN γ	APC	XMG1.2	Rat IgG ₁ , κ	1:200
IL-17A	PE	TC11-18H10.1	Rat IgG ₁ , κ	1:200
Ly6C	APC Cy7	HK1.4	Rat IgG _{2c} , κ	1:200
Ly6C	FITC	HK1.4	Rat IgG _{2c} , κ	1:400
Ly6G	FITC	1A8	Rat IgG _{2a} , κ	1:200
Ly6G	PB	1A8	Rat IgG _{2a} , κ	1:400
Ly6G	PE Cy7	1A8	Rat IgG _{2a} , κ	1:200
Sca-1	BV	D7	Rat IgG _{2a} , κ	1:200
Sca-1	PE	D7	Rat IgG _{2a} , κ	1:200
Streptavidin	PE-Cy7	-	-	1:200
Ter119	PE	TER-119	Rat IgG _{2b} , κ	1:200
Vbeta11 TCR	FITC	RR3-15	Rat IgG _{2b} , κ	1:200

Antikörper für Western Blot

Spezifität	Klon	Herkunft
mouse-anti-human IKK2	10AG2	Imgenex, Kalifornien (USA)
goat-anti-mouse Actin	I-19	Santa Cruz, Kalifornien (USA)

4.9 Mausstämme und Zelllinien

Mauslinie	Herkunft
C57BL/6	Charles Rivers Laboratories, Sulzfeld (Dtl.)
C57BL/6 2d2 tdRFP	Infante-Duarte, Charité Universitätsmedizin Berlin (Dtl.)
β -Actin EGFP	Dr. Schuchmann, Charité Universitätsmedizin Berlin (Dtl.) ^[256]
CerTN L15 LysM ^{tdRFP}	Infante-Duarte, Charité Universitätsmedizin Berlin (Dtl.)
CXCR3-KO	Kettenmann, Max-Delbrück-Centrum Berlin (Dtl.)
CXCR3-WT	Kettenmann, Max-Delbrück-Centrum Berlin (Dtl.)
IKK2 ^{fl/fl}	Marco Prinz, Institut für Neuropathologie, Universitätsklinikum Freiburg (Dtl.)
LysMCre	Marco Prinz, Institut für Neuropathologie, Universitätsklinikum Freiburg (Dtl.)
LysMCre Rosa26 ^{tdRFP}	eigene Verpaarungen (Priller, Institut für Molekulare Psychiatrie, Charité Universitätsmedizin Berlin, Dtl.)
Rosa26 ^{tdRFP}	Hans Jörg Fehling, Institut für Immunologie, Universitätsklinikum Ulm (Dtl.) ^[257]

Zelllinie	Herkunft
GP+E86 (Retrovirale Produzerezellen)	Derek A. Persons, St. Jude Children's Hospital, Tennessee (USA)

4.10 Anästhesie

Die Mäuse wurden durch eine Inhalationsnarkose (4% Isofluran in 100% Sauerstoff) mit anschließender i.p.-Injektion von 50 mg/kg Ketamin und 7,5 mg/kg Xylazin in 0,9%-iger Natriumchloridlösung betäubt.

4.11 Computerprogramme

Programm	Firma
FACS Diva	BD Biosciences, Heidelberg (Dtl.)
FCAP Array Analysis	BD Biosciences, Heidelberg (Dtl.)
FlowJo	TreeStar Inc., Oregon (USA)
GraphPadPrism 5	GraphPad Software Inc., Kalifornien (USA)
ImageJ	National Institutes of Health, Maryland (USA)
LightCycler Data Analysis	Roche Diagnostics, Mannheim (Dtl.)
Microsoft Office	Microsoft, Washington (USA)
Primer 3	Whitehead Institute for Biomedical Research, Massachusetts (USA)
Stereo Investigator	MicroBrightField, Magdeburg (Dtl.)
TINA 2.0	Raytest GmbH, Straubenhardt (Dtl.)
UCSC Genome Bioinformatics	Center for Biomolecular Science & Engineering, Kalifornien (USA)
Intas GDS ² Geldokumentation	Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen (Dtl.)
QCapture Pro 7	QImaging, British Columbia (Kanada)

5 Methoden

5.1 Molekularbiologische Methoden

5.1.1 DNA-Extraktion für die Genotypisierung

Für die Genotypisierung der Versuchstiere wurde aus Ohr- oder Schwanzspitzenbiopsien die chromosomale DNA mittels *RED Extract-N-AmpTM Tissue PCR Kit* nach Herstellerangaben extrahiert und anschließend durch eine entsprechende PCR analysiert.

5.1.2 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Für die Genotypisierung wurden jeweils 5µl Gewebeextrakt (5.1.1) verwendet und die Primer (4.6) in einer Endkonzentration von 0,3-0,5µM in 20µl Reaktionsvolumen eingesetzt. Die unterschiedlichen PCR-Programme sind in Abbildung 6 dargestellt.

Für die Genotypisierung der *LysMCre* *IKK2* Mäuse wurde für die Gene *LysM* und *Cre* eine Multiplex-PCR durchgeführt, wobei die Primer *NLSCre-FP*, *Cre8-RP* sowie *LysM-FP* und *LysM-RP* gemeinsam in die PCR eingesetzt wurden. Das *tdRFP* Gen der *Rosa26^{tdRFP}* Mäuse wurde mit den Primern *HL15*, *HL54* und *HL152* in einer PCR nachgewiesen. Für die Genotypisierung der *CXCR3* Mäuse mussten jeweils zwei PCRs durchgeführt, um entweder das *Cxcr3*-Gen oder den knockout von *Cxcr3* nachzuweisen. Die zu erwartenden PCR-Produktgrößen sind in Abbildung 7E aufgelistet.

<i>LysMCre</i>			<i>Ikk2</i>			<i>tdRFP</i>		
Temperatur	Dauer	Zyklen	Temperatur	Dauer	Zyklen	Temperatur	Dauer	Zyklen
94°C	3 min.	1x	94°C	3 min.	1x	94°C	3 min.	1x
94°C	30 s		94°C	30 s		94°C	30 s	
58°C	30 s	30x	64°C	30 s	30x	55°C	30 s	30x
72°C	60 s		72°C	40 s		72°C	40 s	
72°C	10 min.	1x	72°C	10 min.	1x	72°C	10 min	1x
4°C	∞		4°C	∞		4°C	∞	

<i>Cxcr3 - wt</i>			<i>Cxcr3 - ko</i>		
Temperatur	Dauer	Zyklen	Temperatur	Dauer	Zyklen
94°C	3 min.	1x	94°C	2 min.	1x
94°C	45 s		94°C	60 s	
62°C	30 s	30x	64°C	60 s	30x
72°C	90 s		72°C	60 s	
72°C	10 min.	1x	72°C	5 min.	1x
4°C	∞		4°C	∞	

Abbildung 6 PCR-Programme für die Genotypisierung von *LysM*, *Cre*, *Ikk2*, *tdRFP*, *Cxcr3-wt* und *Cxcr3-ko*.

5.1.3 Gelelektrophorese

Die PCR-Produkte wurde in einem 1%-igen Agarosegel (1g Agarose in 100ml TAE + 2 μ l GelRED™) bei 100V für 30-60 min aufgetrennt und die Banden unter UV-Licht detektiert. Die Größenbestimmung der Banden erfolgte anhand von 50bp oder 100bp Markern (Abbildung 7).

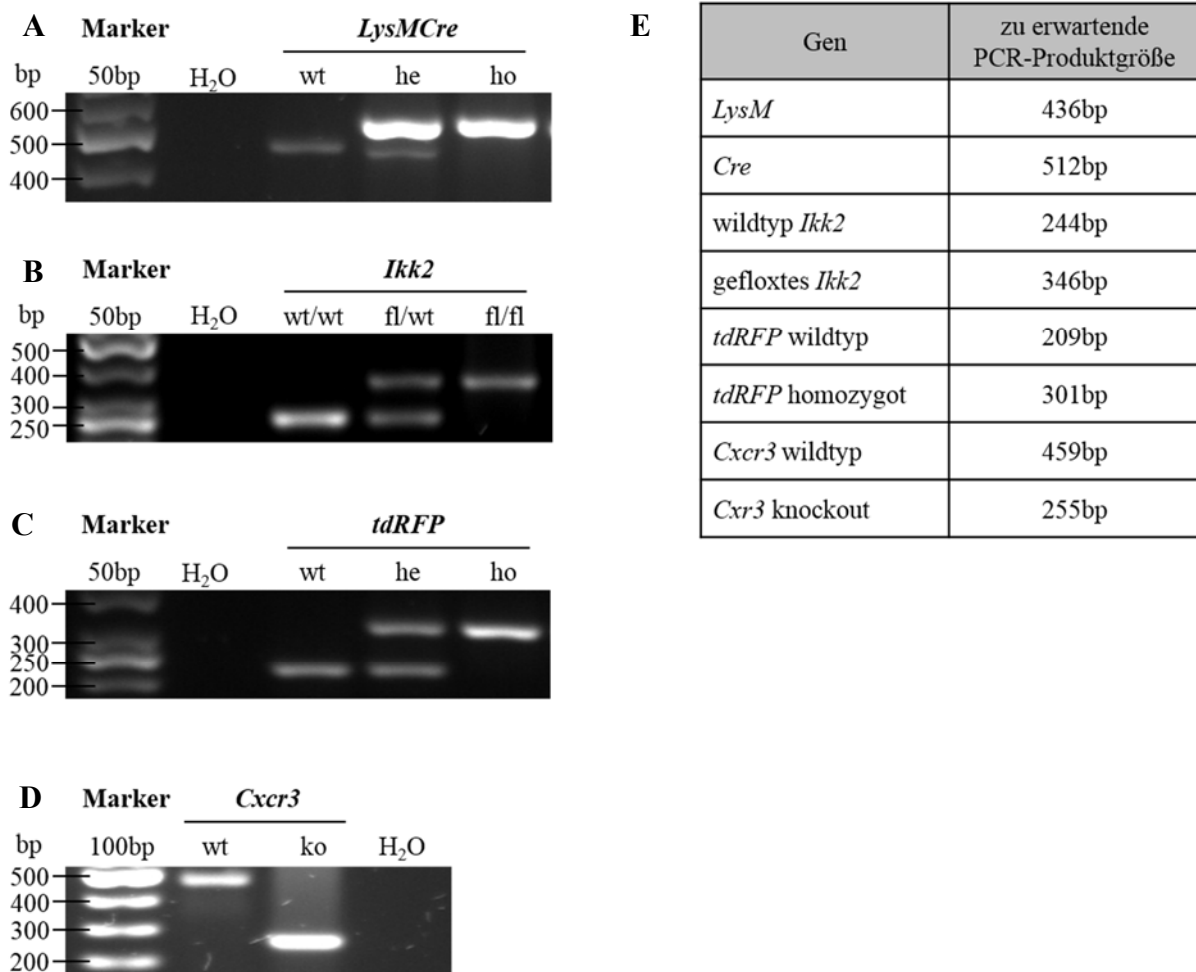


Abbildung 7 Genotypisierung der *LysMCre IKK2* (A und B), *LysMCre Rosa26^{tdRFP}* (A und C), *CX₃CR3-WT* und *-KO* (D) Tiere. Genomische DNA wurde aus Ohr- oder Schwanzspitzenbiopsien isoliert, die zu untersuchenden Genfragmente mittels PCR und entsprechenden Primern amplifiziert und die PCR-Produkte im Agarosegel nach ihrer Größe aufgetrennt. Zur Größenbestimmung wurden 50bp bzw. 100bp DNA-Marker verwendet. E) Zu erwartenden PCR-Produktgrößen. wt: wildtyp, ko: knockout, he: heterozygot, ho: homozygot, fl: gefloxt.

5.1.4 RNA-Präparation aus Organen, DNase-Verdau und cDNA-Generierung

Für die quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR) wurden die Tiere anästhesiert und transkardial mit kaltem PBS perfundiert. Das Rückenmark bzw. die Gehirne wurden präpariert und die einzelnen Gehirnregionen (Hirnstamm mit Fazialiskerne, Bulbus Olfactorius, Cerebellum, Kortex; Abbildung 9) in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Die RNA wurde mit Hilfe des *RNeasy Plus Mini Kits* nach Herstellerangaben aus den einzelnen Gehirnregionen bzw. dem Rückenmark isoliert und die RNA-Konzentration mit Hilfe des Nanodrops bestimmt. Anschließend erfolgte ein DNase-Verdau. Dazu wurden $0,5\text{-}2\mu\text{g}$ RNA mit zwei Einheiten RQ1 DNase in DNase Reaktionspuffer für 30 min bei 37°C verdaut. Die Reaktion wurde durch 10-minütige Inkubation mit $3,5\mu\text{l}$ RQ1 DNase Stop Lösung bei 65°C abgestoppt. Es wurden jeweils $2\mu\text{l}$ Dnase-verdaute RNA pro Probe weggefroren und die restliche RNA in cDNA umgeschrieben. Dazu wurde die DNase-verdaute RNA zunächst mit $6\mu\text{M}$ Random hexamer Primern für 10 min bei 70°C inkubiert und anschließend auf Eis gestellt. dNTPs (jeweils $0,5\mu\text{M}$ dATP, dCTP, dGTP und dTTP) und $1\mu\text{l}$ M-MLV Reverse Transkriptase in M-MLV Buffer in einem Endvolumen von $40\mu\text{l}$ wurden zugefügt und die cDNA-Synthese erfolgte über das folgende PCR-Programm: 5 min bei 21°C , 1 h bei 37°C , 5 min bei 95°C . Um die erfolgreiche cDNA-Synthese zu überprüfen wurde im Anschluss eine GAPDH-PCR durchgeführt, wobei die zuvor eingefrorene DNase-verdaute RNA-Probe als Negativkontrolle (zum Ausschluss einer Kontamination mit genomischer DNA) mitgeführt wurde. Es wurde der in Tabelle 1 dargestellte PCR-Ansatz und Thermocycler-Programm verwendet und die PCR-Produkte anschließend in einem 1%-igen Agarosegel gelelektrophoretisch aufgetrennt. Dabei lieferte die GAPDH-PCR ein 348bp großes PCR-Produkt bei den cDNA-Proben, bei den RNA-Proben jedoch nicht.

Tabelle 1 Ansatz (A) und Thermocycler-Programm (B) für die GAPDH-PCR

A		B		
Reaktionskomponenten	Volumen	Temperatur	Dauer	Zyklen
10x PCR-Puffer	$2\mu\text{l}$	95°C	2 min	1x
dNTPs (10mM)	$0,5\mu\text{l}$	95°C	30 s	
MgCl_2 (25mM)	$1,2\mu\text{l}$	63°C	30 s	40x
Primer (10 μM)	je $1\mu\text{l}$	72°C	30 s	
Taq-Polymerase (2U/ μl)	$0,2\mu\text{l}$	72°C	5 min	1x
RNA/cDNA	$1,5\mu\text{l}$	4°C	∞	
Rnase-freies Wasser	$12,6\mu\text{l}$			

5.1.5 Quantitative Real-Time PCR

Die qRT-PCR wurde mittels *LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I* Kit nach Herstellerangaben im LightCycler 2.0 durchgeführt. Dabei wurden jeweils 2µl cDNA zusammen mit den Primern für das zu untersuchende Zytokin, Chemokin oder Adhäsionsmolekül (siehe 4.6), in Anwesenheit des Fluoreszenzfarbstoffes SYBR-Green I, in die PCR-Reaktion eingesetzt (Tabelle 2). Von jeder Probe wurden Doppelbestimmungen durchgeführt.

Tabelle 2 Reaktionsansatz für die quantitative RT-PCR

Reaktionskomponenten	Volumen
MgCl ₂	0,8 – 2,4µl
Primer (10µM)	je 0,5µl
LC Fast Start	2µl
cDNA	2µl
Rnase-freies Wasser	Endvolumen 20µl

Die Magnesiumchloridkonzentrationen sowie die Reaktionsbedingungen variierten zwischen den untersuchten Molekülen und sind in Tabelle 3 dargestellt. SYBR-Green I interkaliert während der PCR-Reaktion in die doppelsträngige DNA, so dass die Amplifikatmenge proportional zum Fluoreszenzsignal ist und nach jedem Elongationsschritt gemessen wurde. Die Spezifität der Primer und damit des gebildeten Amplifikates, wurde über eine angeschlossene Schmelzkurvenanalyse bestimmt. Die PCR-Produkte wurden am Ende gelelektrophoretisch (siehe 5.1.3) auf ihre Größe hin kontrolliert.

Für die relative Quantifizierung der Expressionsniveaus der untersuchten Zytokine, Chemokine und Adhäsionsmoleküle, wurden die Ergebnisse jeweils mit denen des Housekeeping-Gens *Gapdh* als Referenzwert normalisiert.

Tabelle 3 Light-Cycler Reaktionsbedingungen und MgCl₂-Konzentrationen in der qRT-PCR

A	Zyklus- anzahl	Abschnitt	Ziel- temperatur	Dauer	Temperatur- Transitionsrate	Erfassungs- modus	
Pre-Inkubation							
	1		95°C	10 min	20°C/s	-	
Amplifikation für Quantifizierung							
	45	Denaturierung	95°C	15 s	20°C/s	-	
		Annealing	[A]	[B]	20°C/s	-	
		Extension	72°C	[C]	20°C/s	1x	
		Abstoppen	[D]	0 s	20°C/s		
Schmelzkurve							
	1	Denaturierung	95°C	0 s	0,05°C/s	-	
		Annealing	70°C	15 s	20°C/s	-	
		Schmelzen	[E]	0 s	20°C/s	kontinuierlich	
Kühlen							
	1		40°C	30 s	20°C/s	-	
B	Molekül	MgCl₂- Konzentration	[A]	[B]	[C]	[D]	[E]
	CCL2	2,4µl	66°C	5 s	10 s	84°C	95°C
	CCL5	2,4µl	60°C	10 s	15 s	84°C	95°C
	CCL21	1,6µl	63°C	10 s	15 s	87°C	95°C
	CD40	2,4µl	60°C	5 s	10 s	86°C	95°C
	CXCL4	2,4µl	63°C	10 s	15 s	87°C	95°C
	CXCL10	1,6µl	65°C	10 s	15 s	86°C	98°C
	E-Selektin	2,4µl	60°C	5 s	10 s	82°C	95°C
	GAPDH	2,4µl	63°C	10 s	15 s	87°C	95°C
	ICAM-1	0,8µl	60°C	10 s	15 s	83°C	95°C
	IL-1β	2,4µl	60°C	10 s	15 s	83°C	95°C
	IL-10	2,4µl	68°C	10 s	15 s	84°C	98°C
	Itgb3	1,6µl	60°C	5 s	10 s	86°C	98°C
	P-Selektin	2,4µl	60°C	10 s	15 s	82°C	95°C
	TNF-α	2,4µl	68°C	5 s	10 s	87°C	95°C
	VCAM-1	2,4µl	60°C	5 s	10 s	82°C	95°C

5.2 Zellbiologische Methoden

5.2.1 Organpräparation und Zellisolation

Für die Isolation der Leukozyten aus unterschiedlichen Geweben erfolgten alle Zentrifugations- und Waschschrirte, sofern nicht anders angegeben, in PBS bei 1200rpm für 10 min und 4°C. Alle verwendeten Lösungen waren stets auf 4°C vorgekühlt. Die Zellzahl der resuspendierten Zellen wurde anschließend mit Türks Lösung in einer Neubauer Zählkammer bestimmt.

Die Milz euthanasierter Tiere wurde operativ entfernt und zunächst durch ein 100µm und anschließend durch ein 40µm Sieb gedrückt. Das Blut wurde aus der Vena cava von betäubten Mäusen mit Hilfe einer mit Citrat benetzten Spritze abgenommen und die Tiere anschließend durch zervikale Dislokation getötet. Die Erythrozyten in Milz und Blut wurden nach einem Waschvorgang mit Hilfe des Pharm Lyse™ Puffers für 10 min bei RT lysiert. Das Abstoppen der Erylyse erfolgt durch Zugabe eines Überschusses an Dulbecco's PBS mit 2% FKS. Im Anschluss folgten ein Zentrifugations- sowie zwei Waschschrirte.

Die mesenterialen Lymphknoten euthanasierter Mäuse wurden entfernt, zunächst durch ein 100µm und anschließend durch ein 40µm Zellsieb gedrückt und in PBS gewaschen. Wurde eine größere Zellzahl benötigt, wurden zusätzlich die inguinalen, axialen und brachialen Lymphknoten präpariert.

Knochenmarkzellen wurden mit Hilfe einer 24G Kanüle aus dem präparierten Femur und Tibia mit PBS + 2% FKS gespült, die Zellen durch ein 70µm Zellsieb gedrückt, gewaschen und in PBS + 2% FKS resuspendiert. Die Tiere wurden für die Zellisolation zuvor durch zervikale Dislokation getötet und in 70%-igen Ethanol gelegt.

Für die Isolation der Leukozyten aus dem Rückenmark wurde die Wirbelsäule des euthanasierten Tieres frei präpariert und an beiden Enden durch einen Schnitt eröffnet. Anschließend wurde das Rückenmark mit einer am distalen Ende fixierten 24G Kanüle herausgespült und in Dissektionspuffer überführt, bevor es durch ein 70µm Zellsieb gedrückt wurde. Es folgte ein Zentrifugationsschrirte. Anschließend wurde das Pellet in 5ml 25% (v/v) Percoll in SIP-Lösung resuspendiert. In einem 15ml Zentrifugationsröhrchen wurde dieses Gemisch auf 5ml 75% (v/v) Percoll in SIP-Lösung pipettiert und mit 1ml kaltem PBS als weitere Phase überschichtet. Es folgte eine 25-minütige Zentrifugation bei 800g und 4°C, wobei die kleinstmögliche Beschleunigung gewählt und die Bremse ausgeschaltet wurde, um die Zellen im Dichtegradienten aufzutrennen. Die Leukozyten in der Interphase zwischen 75% und

25% Percoll wurden mit Hilfe einer Pipette abgenommen, gewaschen und die Zellzahl bestimmt.

Die Leukozytenisolation aus dem Gehirn erfolgte ähnlich wie beim Rückenmark, jedoch mit einem zusätzlichen enzymatischen Verdau. Dazu wurde das Gehirn nach seiner Präparation in kleine Stücke geschnitten und in 15ml RPMI-Medium + 20% FKS + 0,75mg Collagenase (125 CDU/mg) + 0,026mg DNase I (spezifische Aktivität ~2,000 U/mg) für 30 min bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert. Zwischendurch wurden die Gehirnstücke mechanisch mit Hilfe des gentleMACS™ Dissociator in C Tubes weiter zerkleinert. Der enzymatische Verdau wurde durch Zugabe von PBS + EDTA in einer Endkonzentration von 10mM abgestoppt, das Gewebe durch ein 70µm Zellsieb gegeben, in PBS gewaschen und anschließend in 25% Percoll aufgenommen. Die Auftrennung der Einzelzellsuspension im Dichtegradienten erfolgt analog zum Rückenmark.

5.2.2 Präparation von Mikroglia, Makrophagen und Astrozyten

Primäre Mikrogliazellen und Astrozyten wurden aus den Gehirnen von 1-3 Tage alten Mäusen isoliert. Dazu wurden die Gehirne entnommen, die Meningen unter einem Stereomikroskop entfernt und das Gehirn durch auf- und abpipettieren zerkleinert. Anschließend wurde es in 10ml Mikrogliakulturmedium in einer 75cm² Zellkulturflasche überführt und bei 37°C und 0,5% CO₂ für 9-12 Tage inkubiert. Nach zwei Tagen war am Flaschenboden bereits ein adhärenter Astrozytenlayer erkennbar, der mit kaltem PBS gewaschen und mit 10ml frischem Mikrogliakulturmedium weiter inkubiert wurde. An Tag 9-12 wurde das Medium durch 10ml Mikrogliakulturmedium + 5ml L929-konditioniertes Medium ersetzt. L929 Mausfibroblasten-konditioniertes Medium enthält M-CSF (*macrophage colony-stimulating factor*), welches die Proliferation und das Überleben von Mikroglia, Makrophagen und Granulozyten fördert. Nach drei Tagen wurden die primären Mikrogliazellen, die auf dem Astrozytenlayer gewachsen waren, auf einem Zellkulturshaker im CO₂-Inkubator für 30-60 min bei 200 rpm abgeschüttelt. Das Medium, welches die Mikrogliazellen enthielt, wurde abgenommen, zentrifugiert (300g, 10 min, 4°C) und das Zellpellet in Mikrogliakulturmedium resuspendiert. Die Zellen wurden gezählt, in well-Platten ausgesät und nach 30-minütiger Inkubation das Medium erneuert.

Die Astrozytenkultur wurde währenddessen mit 10ml Mikrogliakultur- und 5ml L929-konditioniertem Medium versetzt und nach 3-4 Tagen erfolgte ein erneutes Abschütteln von Mikrogliazellen. Dieser Vorgang erfolgte insgesamt dreimal. Nach dem letzten Abschütteln der Mikroglia wurden die Astrozyten in PBS gewaschen, für 5 min bei 37°C trypsinisiert und in 10ml

Zellkulturmedium gewaschen. Nach Zentrifugation bei 300g und 4°C für 10 min wurden die Zellen ebenfalls gezählt und in 6 well-Platten ausgesät.

Makrophagen wurden durch eine peritoneale Lavage aus 8-12 Wochen alten Mäusen gewonnen. Dazu wurden diese in Isoflurannarkose durch zervikale Dislokation getötet und anschließend 5ml kaltes Makrophagen-Kulturmedium ins Peritoneum injiziert. Nach einer 5-minütigen Massage wurde das Peritoneum eröffnet und das Medium mit einer 2ml Pipette herauspipettiert. Für die Erythrozytenlyse wurde die Zellsuspension 1:1 mit dH₂O versetzt und nach 5 s durch Zugabe von 30ml PBS + 2% BSA abgestoppt. Nach Zentrifugation der Zellen für 10 min bei 300g und 4°C wurden sie in Makrophagen-Kulturmedium resuspendiert und in 6-well-Platten ausgesät. Nach 2 h wurde das Medium erneuert.

Die Reinheit der primären Mikroglia, Makrophagen und Astrozyten wurde immunzytochemisch durch geeignete Marker (CD11b als Mikroglia-Makrophagen Marker, GFAP für Astrozyten) überprüft.

5.2.3 Retrovirale Transduktion von Knochenmarkzellen

Die retrovirale Transduktion von Knochenmarkzellen mit dem Markergen GFP wurde wie in Huck et al. (2015) beschrieben, durchgeführt.^[258] In Kürze: Knochenmarkzellen wurden aus 8-12 Wochen alten CXCR3-KO oder CXCR3-WT Tieren isoliert (siehe 5.2.1), denen drei Tage zuvor intraperitoneal 5-Fluoruracil (5-FU; 150mg/kg Körpergewicht) verabreicht wurde. Die isolierten Knochenmarkzellen wurden mit 50ng/ml IL-6, 20ng/ml IL-3 und 50ng/ml rSCF für 48h bei 35°C und 5% CO₂ in PCM prästimuliert. Am Tag 5 wurden die Knochenmarkzellen mit zuvor kultivierten und mit 12 Gy bestrahlten GP+E86 viralen Producer-Zellen (in PCM mit 50ng/ml IL-6, 20ng/ml IL-3, 50ng/ml rSCF und 6µg/ml Polybrene) inkubiert. Nach 48h wurde die Transduktionsrate der nicht adhären Zellen durchflusszytometrisch bestimmt (Abbildung 8) und jeweils 5x10⁶ retroviral transduzierte Knochenmarkzellen adoptiv in zuvor ganzkörperbestrahlte Empfängertiere transferiert.

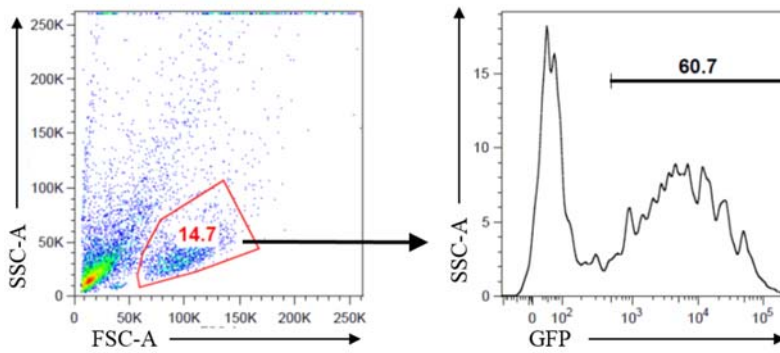


Abbildung 8 Durchflusszytometrische Kontrolle der retroviralen GFP-Transduktion von Knochenmarkzellen

Zusätzlich wurden die retroviral transduzierten Knochenmarkzellen einem Methylzelluloseassay unterzogen, um die Fähigkeit zur Bildung von Kolonien zu überprüfen. Dazu wurden jeweils 25.000 Zellen in DMEM-Medium auf aufgetaute Methylzellulose gesetzt und bei 1200rpm auf einem Minishaker gelegt. Anschließend wurde die Suspension für 48h im Brutschrank in Petrischalen inkubiert, bevor der Differenzierungsgrad unterm Mikroskop überprüft wurde.

5.2.4 Generierung von Knochenmarkchimären

Nach einer kurzen Isofluran-Anästhesie wurden die 8-12 Wochen alten Donormäuse durch zervikale Dislokation getötet. Anschließend erfolgte die Knochenmarkisolation unter sterilen Bedingungen aus Tibia und Femur (siehe 5.2.1). Nach Aufreinigung und Zellzählung wurden die Zellen in die zuvor kopf- bzw. ganzkörperbestrahlten 8-12 Wochen alten Empfängertiere transplantiert. Dabei wurden jeweils 2×10^7 Zellen intravenös über die Schwanzvene injiziert. Die Bestrahlung erfolgte in Ketamin-Xylazin-Narkose am Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie (Charité Berlin) mit einer Gesamtdosis von 3 bzw. 11 Gy, wobei bei der fokalen Kopfbestrahlung der Rest des Körpers mittels einer 3cm dicken Bleiabschirmung geschützt wurde (Abbildung 21A).

5.2.5 Kerntranslokation der NF- κ B Untereinheit p65

200.000 primäre Mikrogliazellen/well wurden auf Glasscheiben mit 12mm Durchmesser in 24-well Platten ausgesät und für einen Tag kultiviert, bevor das Medium gewechselt wurde.

Die Stimulation der Zellen erfolgte in Triplikaten mit 1 µg/ml LPS für 30 min im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂. Nach Inkubation der Zellen mit bzw. ohne LPS wurden sie mit PBS gewaschen, für 10 min mit 4% PFA fixiert, und nach erneutem zweimaligem Waschen mit PBS immunzytochemisch gefärbt (5.3.2).

5.3 Histologische Methoden

5.3.1 Organpräparation und Anfertigung von Kryoschnitten

Zur Gewinnung von Material für die Immunhistochemie ist es notwendig eine transkardiale Perfusionsfixierung vorzunehmen. Dazu wurden die anästhesierten Mäuse zunächst transkardial mit 30ml kaltem PBS und anschließend mit 30ml 4% Paraformaldehyd in PBS perfundiert und die präparierten Organe in 30% Sucrose + 0,05% Natriumazid bei 4°C equilibriert.

War es aufgrund des Versuchsaufbaus nicht möglich die Tiere mit PFA zu perfundieren, so wurden die Organe für die Histochemie nach Perfusion mit 30ml kaltem PBS entnommen und für 24-48 h in 4% PFA nachfixiert. Anschließend wurden sie in 30% Sucrose + 0,05% Natriumazid bei 4°C equilibriert.

Die Organe wurden am Kryostaten in 20-30µm dicke Schnitte geschnitten und anschließend gefärbt, oder bei -80°C gelagert. Für die immunhistologischen Färbungen wurden die Schnitte auf Objektträger gezogen oder free-floating in 24-well Platten gefärbt.

Abbildung 9 zeigt die Lage der in dieser Arbeit untersuchten Gehirnregionen.

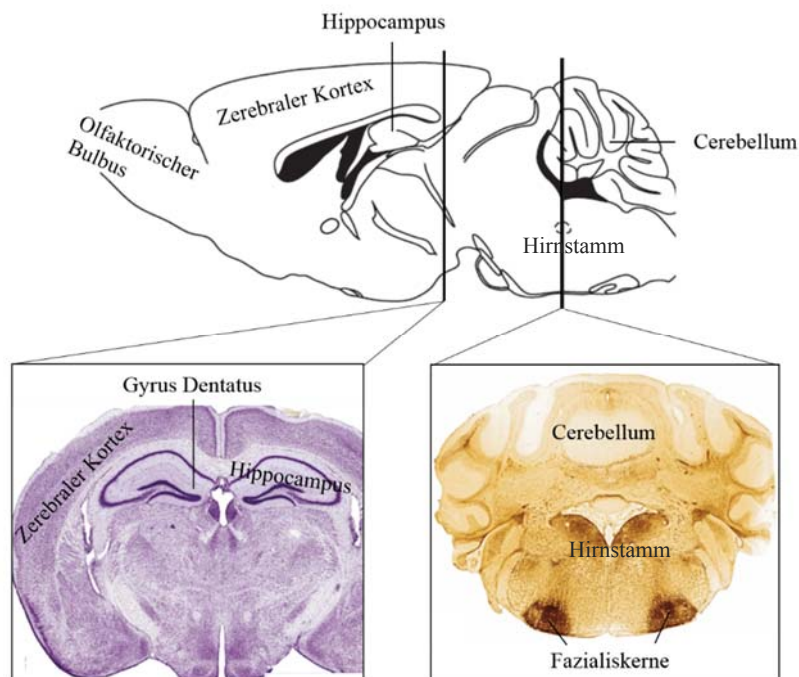


Abbildung 9 Schematische Übersicht eines Mausgehirns mit für diese Arbeit relevanten Gehirnstrukturen (A). Die einzelnen Strukturen in den Coronalen Schnitten wurden mit Acetylcholinesterase (AChE) oder einer Nissl-Färbung sichtbar gemacht (B). Abbildungen verändert aus *The Mouse Brain Stereotaxic Coordinates*.^[259]

5.3.2 Immunhistologische Gewebefärbung

GFP-, Iba-1-, CD45-, CD11b-, NeuN-, GFAP, CXCL10, p65-, DAPI- Fluoreszenzfärbung

Die coronalen Organschnitte wurden zunächst 30 min mit 50mM TBS + 0,3% Triton X-100 gewaschen, anschließend in 20% *Normal Donkey/Goat Serum* und 0,3% Triton X-100 in 50mM TBS für 1 h bei RT geblockt. Die Inkubation mit den Primärantikörpern (Antikörper und Verdünnungen siehe 4.8) in 300µl 50mM TBS + 0,3% Triton X-100 + 1% Serum erfolgte über Nacht bei 4°C. Nach dreimaligem Waschen der Schnitte für je 10 min in 50mM TBS bei RT, wurden sie mit den Sekundärantikörpern (siehe 4.8) in 300µl 50mM TBS + 0,3% Triton X-100 und 1% Serum bei RT für 4 h inkubiert. Im Anschluss wurden die Schnitte erneut dreimal für je 10 min in 50mM TBS auf einem Schüttler bei RT gewaschen und die Zellkerne mit DAPI (Verdünnung 1:10.000 in 50mM TBS) für 5 min bei RT gefärbt. Überschüssige Reagenzien wurden erneut abgewaschen, *free-floating* Schnitte auf Objektträger aufgezogen, und nach Trocknung in Einbettmedium (FluorSave™) eingedeckelt. Die gefärbten Schnitte wurden unter einem konventionellem Fluoreszenz- oder konfokalem Laserscanning Mikroskop untersucht.

Zur Untersuchung der Translokation der NF- κ B Untereinheit p65 in den Kern von primären Mikrogliazellen wurden ca. 500 ausgesäte Zellen pro Genotyp untersucht und mit Hilfe der Software MATLAB ausgewertet.

Die Quantifizierung der GFP⁺-Zellen im Fazialiskern nach Fazialisnerv-Axotomie erfolgte stereologisch mit einem Leica DMR Mikroskop und der Software *Stereo Investigator*. Die GFP⁺-Zellen wurden dazu in Serien von jedem sechsten 25 μ m Schnitt (in rostrocaudale Richtung geschnitten) ausgezählt.

GFP-DAB-Färbung

Fluoreszenzfarbstoffe bleichen bei langer Exposition unter der Lichtquelle schnell aus. Sie sind daher für stereologische Untersuchungen nur bedingt geeignet. Durch Zufügen von 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) und dessen Oxidation (DAB reagiert mit dem bei der Reaktion der Peroxidase mit Wasserstoffperoxid entstehenden Sauerstoff) bildet es ein braunes unlösliches Präzipitat, welches unterm Lichtmikroskop detektierbar ist.

Für die Quantifizierung der GFP⁺-Zellen im Fazialiskern von CXCR3 Knochenmarkschimären wurden die 40 μ m dicken Organschnitte daher DAB gefärbt. Dazu wurden sie wie bei der normalen Fluoreszenzfärbung zunächst gewaschen, geblockt und über Nacht mit dem Primärantikörper GFP-rat inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurden die Schnitte dann mit dem biotyliniertem goat anti-rat Sekundärantikörper (1:200 in 50mM TBS + 0,3% Triton X-100 + 3% normal goat serum) für 2 h bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für je 10 min in 50mM TBS auf einem Schüttler, wurden die Schnitte für 2 h bei RT mit einem Avidin-Biotin-Peroxidase Komplex (VECTASTAIN[®] ABC Kit; 1:100 in 50mM TBS) inkubiert. Überschüssige Reagenzien wurden anschließend heruntergewaschen (dreimal 5 min in 50mM TBS), bevor eine Inkubation mit DAB und Wasserstoffperoxid (SIGMAFAST[™] DAB Tabletten) erfolgte. Die Reaktion wurde visuell, bei Erreichen einer Dunkelbraunfärbung der Schnitte, durch Zugabe eines Überschusses an 50mM TBS abgestoppt und die Schnitte erneut dreimal für je 10 min in PBS bei RT gewaschen. Die Schnitte wurden anschließend auf Objektträger aufgezogen, über Nacht getrocknet und mittels aufsteigender Alkoholreihe (jeweils 1 min in 70%, 96% und 100% Ethanol) dehydriert. Die Fixierung der Schnitte erfolgte für 1 min in Roti-Histol, bevor sie in Roti[®]-Histokitt eingebettet wurden.

Die Quantifizierung der GFP⁺-DAB Zellen erfolgte stereologisch mit einem Leica DMR Mikroskop (20x Vergrößerung) und der Software *Stereo Investigator*. Dabei wurde jeder

sechste Schnitt des läsierten Fazialiskerns ausgezählt und die Anzahl GFP⁺ Zellen pro mm² (Zelldichte) bestimmt.

Hämatoxylin-Eosin (HE) - Färbung

Für die HE-Färbung wurden die 20µm großen Rückenmarkschnitte auf Objektträger aufgezogen und getrocknet. Anschließend wurden die Schnitte für 10 min in 100% Ethanol fixiert, über eine absteigende Ethanolreihe (jeweils 1 min in 96% und 70% Ethanol) rehydriert, bevor sie mit destilliertem Wasser gewaschen wurden. Die anschließende Hämalan-Färbung in Hämatoxylin nach Mayer erfolgte progressiv für 5-10 min. Nach einem erneuten Waschschrift in Wasser erfolgte die Blaufärbung der basophilen Zellbestandteile durch Waschen der Schnitte in 1% NaHCO₃ in warmem Leitungswasser für 15 min.

Für die Gegenfärbung mit Eosin, wobei alle eosinophilen Zellbestandteile rot gefärbt werden, wurden die erneut mit destilliertem Wasser gewaschenen Schnitte für 1 min in einer wässrigen Eosinlösung (0,25g Eosin in 100ml 80%-igem Ethanol) gefärbt. Überschüssige Eosinlösung wurde durch Spülen mit Wasser entfernt und die Schnitte mittels aufsteigender Alkoholreihe (jeweils 1 min in 70%, 96% und 100% Ethanol) dehydriert. Die Fixierung der Schnitte erfolgte für 5 min in Roti-Histol, bevor sie in Roti[®]-Histokitt eingebettet wurden.

Luxol Fast Blue/Kresylviolett-Färbung

Zur Visualisierung der Demyelinisierung im Rückenmark der EAE-Tiere wurden die 20µm Schnitte zunächst über Nacht in 70% Ethanol inkubiert, bevor die Hydratisierung in 95% Ethanol erfolgte. Anschließend wurden die Schnitte über Nacht bei 56°C im Ofen in 0,1% *Luxol Fast Blue* Lösung (0,1g *Luxol Fast Blue* + 100ml 95% Ethanol + 0,5ml Essigsäure) inkubiert. Überschüssige Färbelösung wurde durch Waschen in 95% Ethanol und anschließend in destilliertem Wasser entfernt. Die Differenzierung der Färbung erfolgte in 0,05% Lithiumcarbonatlösung mit einem angeschlossenen Bad in 70% Ethanol für jeweils 30 s. Nach dem Waschen der Schnitte in destilliertem Wasser wurde die Färbung mikroskopisch überprüft und gegebenenfalls die Differenzierungsschritte wiederholt. Nach vollständiger Differenzierung erfolgte eine Gegenfärbung der Schnitte in 0,1% Kresylviolettlösung (0,1g Kresylviolett + 100ml destilliertes Wasser + 10 Tropfen Essigsäure) bei 37°C für 30-40 s. Nach erneutem Runterwaschen überschüssiger Färbelösung wurden die Schnitte 5 min in 95% Ethanol belassen und die erfolgte Differenzierung mikroskopisch kontrolliert. Die Schnitte

wurden für 10 min in 100% Ethanol entwässert, in Roti-Histol für 5 min fixiert und in Roti®-Histokitt eingebettet.

TUNEL-Färbung und Quantifizierung apoptotischer Zellen

Um den neuronalen Schaden im Gyrus dentatus 24 h nach Meningitis-Induktion zu quantifizieren, wurden 20µm Serienschnitte in der Coronalebene des Gyrus dentatus (Abbildung 9B) mit dem Kryostaten angefertigt und mit dem *ApopTag® Fluorescein In Situ Apoptosis Detection* Kit behandelt. Dabei wurden die Schnitte zunächst mit 1% PFA in PBS für 10 min bei RT fixiert und anschließend zweimal für je 5 min in PBS bei RT gewaschen, bevor die Permeabilisierung in einer 2:1 Mischung aus Ethanol und Essigsäure für 5 min bei -20°C erfolgte. Nach erneutem zweimaligem Waschen der Schnitte in PBS für je 5 min bei RT, wurde der Equilibrierungspuffer und 100µl Reaktionslösung (bestehend aus 30% TdT Enzym und 70% Reaktionspuffer) auf die Schnitte gegeben und diese bei 37°C für 1 h inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch 10-minütige Inkubation in *Stop/Wash Puffer* abgestoppt und die Schnitte dreimal für je 1 min in PBS gewaschen. Es folgte eine 30-minütige Inkubation bei RT mit Anti-Digoxigenin-Alkalischer Phosphatase (62µl Primärantikörper + 68µl *Blocking Lösung*) und anschließendem viermaligem Waschen in PBS für jeweils 2 min. Die Zellkerne wurden mit DAPI (Verdünnung: 1:10.000 in 50mM TBS) bei RT gefärbt, bevor überschüssige Reagenzien erneut abgewaschen und die Schnitte auf Objektträger gezogen werden konnten. Nach Trocknung der Schnitte wurden sie in Einbettmedium eingedeckelt.

Bei der TUNEL (*TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling*)-Färbung katalysiert das Enzym TdT (terminale Desoxyribonukleotidyltransferase) die Verknüpfung von Digoxigenin-markierten dNTPs an die 3'-Hydroxyl-Enden der DNA-Moleküle. Die Inkubation mit Primärantikörpern, die gegen Digoxigenin gerichtet und mit Alkalischer Phosphatase gekoppelt sind, ermöglichte die Detektion der apoptischen Zellen unter einem Fluoreszenzmikroskop.^[260]

Die Quantifizierung der apoptotischen Zellen erfolgte stereologisch mit einem Leica DMR Mikroskop und der Software *Stereo Investigator*. Dabei wurde jeder sechste Schnitt des Gyrus dentatus ausgezählt und die Anzahl apoptotischer Zellen pro mm² (Zelldichte) bestimmt.

5.4 Immunologische Methoden

5.4.1 Durchflusszytometrische Genotypisierung

Die C57BL/6 *2d2* tdRFP Mäuse exprimieren hohe Level des transgenen T-Zellrezeptors, der über die Expression von V β 11 nachgewiesen werden kann. Die Genotypisierung dieser Mäuse erfolgte daher durchflusszytometrisch. Dazu wurde das entnommene und aufgearbeitete Blut (siehe 5.2.1) mit den FACS-Antikörpern CD4-PE und V β 11-FITC gefärbt (siehe 5.4.2). Die durchflusszytometrische Messung erfolgte mit dem LSRTM II.

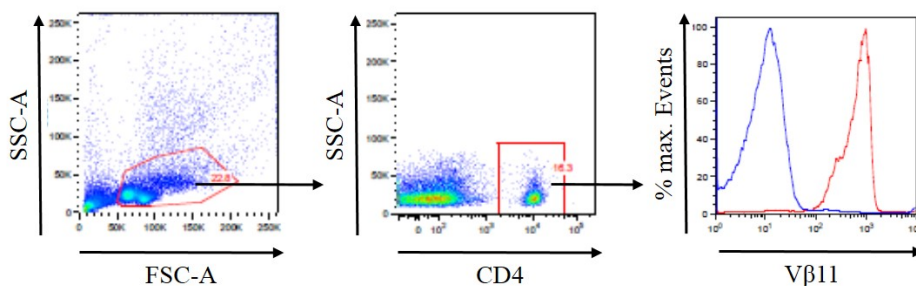


Abbildung 10 Durchflusszytometrische Typisierung transgener C57BL/6 *2d2* tdRFP Mäuse. Die isolierten Blutleukozyten wurden mit CD4-PE und V β 11-FITC gefärbt und anschließend im Durchflusszytometer analysiert. Das Histogramm zeigt CD4⁺2D2⁻ (blaue Linie) und CD4⁺2D2⁺ (rote Linie) Zellen.

5.4.2 Durchflusszytometrische Färbung und Messung

Für die FACS (*fluorescence activated cell sorting*)-Färbung erfolgten alle Wasch- und Zentrifugationsschritte in eiskaltem FACS-Puffer bei 1200 rpm und 4°C für 10 min.

Für den Nachweis der Expression von Zelloberflächenmolekülen wurden zunächst 1×10^5 bis 1×10^6 Zellen pro Probe (Aufarbeitung der Organe zu Einzelzellsuspension siehe 5.2.1) in ein FACS-Röhrchen überführt, abzentrifugiert und anschließend in 1ml FACS-Puffer resuspendiert. Nach einem Waschschrift wurden die Zellen mit 50 μ l Fc BlockTM (anti-mouse CD16/CD32; Verdünnung 1:100 in FACS-Puffer) für 5 min bei 4°C inkubiert, um unspezifische Bindungen der FACS-Antikörper über ihren Fc-Teil zu minimieren. Anschließend wurden die Zellen durch Zugabe von 50 μ l Antikörper-Mix in FACS-Puffer für 30 min bei 4°C im Dunkeln gefärbt. Nach einem Waschschrift erfolgte die Fixierung der Zellen mit 100 μ l 1% PFA in PBS für 8 min bei 4°C. Die fixierten Zellen wurden gewaschen und in 100 μ l FACS-Puffer bei 4°C bis zur Messung gelagert. Die durchflusszytometrischen

Messungen erfolgten am FACSCanto™ II, FACSCalibur™, LSR™ II oder dem MACSQuant und wurden mit Hilfe der *FlowJo*-Software ausgewertet.

5.4.3 tdRFP-Expression in LysMCre^{tdRFP} Mäusen

Mittels Durchflusszytometrie wurde die tdRFP-Expression in LysMCre^{tdRFP} Mäusen untersucht, um daraus Rückschlüsse auf die Cre-Expression in verschiedenen Zellpopulationen schließen zu können. Dazu wurden die Leukozyten aus Knochenmark, Blut, Milz und dem ZNS isoliert und anschließend, wie unter 5.4.2 beschrieben, gefärbt.

Abbildung 11 verdeutlicht die verwendete Gatingstrategie der untersuchten Zellpopulationen.

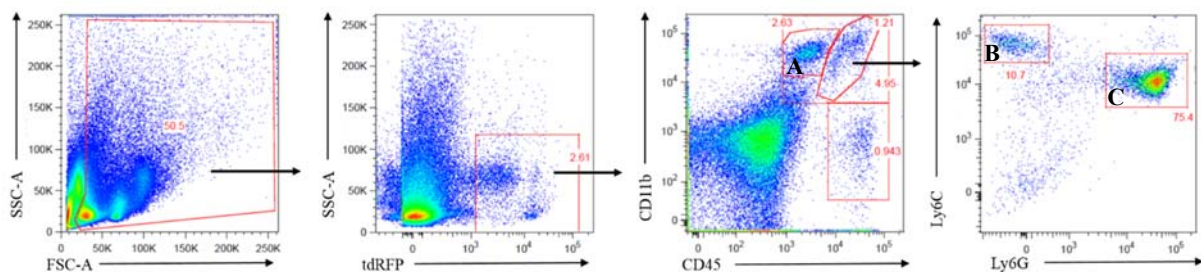


Abbildung 11 Gatingstrategie der tdRFP-exprimierenden myeloiden (CD45⁺CD11b⁺) und nicht-myeloiden (CD45⁺CD11b⁻) Zellkompartimente. Alle toten Zellen, wurden zunächst im FSC/SSC Bereich ausgegated und die tdRFP-exprimierenden Zellpopulationen anschließend anhand ihrer Zelloberflächenmarker mit Hilfe des *BD LSR II* gemessen. Monozyten (CD45^{hi}CD11b⁺Ly6C^{hi}Ly6G⁻, **B**), Granulozyten (CD45^{hi}CD11b⁺Ly6C^{int}Ly6G⁺, **C**) und residente Mikroglia (CD45^{dim}CD11b⁺, **A**) wurden dabei im myeloiden Zellkompartiment unterschieden.

5.4.4 Intrazelluläre Zytokinfärbung

Für die intrazelluläre Färbung der Zytokine IFN- γ und IL-17A wurden die Zellen zunächst mit Hilfe von anti-CD3/anti-CD28 stimuliert. Dazu wurden 96-well-Platten mit 3 μ g/ml anti-CD3 und 2,5 μ g/ml anti-CD28 über Nacht beschichtet und die Zellen für 4 h bei 37°C und 5% CO₂ darauf inkubiert. Anschließend folgte eine FACS-Oberflächenfärbung und die Fixierung dieser Färbung mit 1% PFA in FACS-Puffer (siehe 5.4.2). Die Zellen wurden in 1ml BD Perm/Wash-Puffer gewaschen und durch 15-minütige Inkubation bei RT in 1ml BD Perm/Wash-Puffer permeabilisiert. Nach Zentrifugation und Inkubation mit 50 μ l Fc Block™ (anti-mouse CD16/CD32; Verdünnung 1:100 in BD Perm/Wash-Puffer für 5 min bei 4°C) wurden die Zellen durch Zugabe von 50 μ l Antikörper-Mix in BD Perm/Wash-Puffer für 20 min bei 4°C im Dunkeln gefärbt. Nach einem Waschschrift wurden die Proben in 100 μ l FACS-Puffer

aufgenommen und durchflusszytometrisch am FACSCalibur™ gemessen. Die Messung wurde anschließend mit Hilfe der *FlowJo*-Software ausgewertet.

5.4.5 Zellseparation mittels MACS

Die Zellseparation mittels MACS (*magnetic activated cell sorting*) erfolgte entweder manuell mit Hilfe von MS-Säulen nach Herstellerangaben, oder automatisiert mit dem AutoMACS. Die Methode basiert auf der Kopplung magnetischer Partikel an Antikörper für Zelloberflächenmoleküle. Zellen, die diese Zelloberflächenmoleküle aufweisen, werden markiert und in einer Säule, die sich in einem Magnetfeld befindet, zurückgehalten. So werden sie von den nicht-markierten Zellen, die durch die Säule laufen, getrennt.

5.4.6 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Die IL-1 β Konzentration im Serum von Mäusen nach Meningitis oder EAE wurde mit Hilfe des *Mouse IL-1 β /IL-1F2 Quantikine ELISA* Kits bestimmt. Die Durchführung erfolgte dabei wie in Scheibe et al. (2012) beschrieben.^[261] Dabei bindet ein Antikörper, der spezifisch für das gesuchte Antigen ist und an einer Mikrotiterplatte absorptiv gebunden ist, das in der Probe enthaltene IL-1 β . Die anschließende Inkubation mit dem Enzym-gekoppelten Zweitantikörper, der spezifisch murines IL-1 β bindet, führt zur Reaktion eines hinzugefügten Farbstoffsubstrates. Die Enzymaktivität wurde im ELISA-Photometer bei 450nm in Doppelbestimmungen gemessen. Die detektierte Farbintensität stieg dabei mit der Konzentration an IL-1 β im Serum und wurde mit Hilfe einer zuvor erstellten Standardreihe (Verdünnungen bekannter Konzentrationen) berechnet.

5.4.7 Cytometric Bead Array

Zur Untersuchung der Zytokinproduktion bei EAE und Meningitis wurde der *Th1/Th2/Th17 Cytometric Bead Array* (CBA) Kit von BD Biosciences nach Herstellerangaben verwendet. Dieser erlaubt eine gleichzeitige durchflusszytometrische Bestimmung mehrerer Zytokine durch Markierung der Probe mit Polystyrol-Kügelchen, die mit einem fluoreszierenden Farbstoff (PE) und einem spezifischen Antikörper für das zu untersuchende Zytokine markiert sind.^[262]

Die Konzentration von IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, TNF- α und IFN- γ im Serum der EAE- und Meningitis-Tiere wurde mit dem FACSCalibur™ gemessen und mit der *FCAP Array*

*Analysis*TM Software ausgewertet. Die Fluoreszenzintensität im Durchflusszytometer gab dabei Aufschluss über die freigesetzte Zytokinmenge durch Vergleich mit einer zuvor erstellten Standardkurve mit bekannten Zytokinkonzentrationen.^[262]

Für die *ex vivo* Stimulation von Milzzellen aus immunisierten Tieren wurden 96-well-Platten mit 3µg/ml anti-CD3 und 2,5µg/ml anti-CD28 über Nacht gecoatet (37°C, 5% CO₂) und die Zellen anschließend für 1 h darin inkubiert. Die MOG₃₅₋₅₅ Stimulation erfolgte ebenfalls für 1h bei 37°C, 5% CO₂ mit 12µg/ml Peptid.

5.5 Biochemische Methoden

5.5.1 Proteinextraktion und -quantifizierung nach Bradford

Die Isolation von Mikroglia, Makrophagen und Astrozyten erfolgte wie unter 5.2.2 beschrieben. Die Zellen wurden nach zwei Tagen in Kultur, durch Zugabe von eiskaltem PBS, mit Hilfe eines Zellschabers geerntet. Es folgte ein 10-minütiger Zentrifugationsschritt bei 300g und 4°C. Anschließend wurden die Zellen, durch Zugabe von RIPA-Puffer für 10 min auf Eis, lysiert. Die zellulären Proteine wurden durch 5-minütige Zentrifugation bei 22000g und 4°C aus dem Überstand gewonnen und die Proteinkonzentration photometrisch nach der Methode von Bradford bestimmt. Dazu wurden 2µl der Probe oder des Standards mit 398µl PBS und 100µl *Roti Quant Bradford Reagent* versetzt, 10 min bei RT inkubiert und anschließend die Absorption bei 595nm gemessen. Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe der Regressionskurve des Standards bekannter Konzentration ermittelt.

5.5.2 SDS-PAGE

Für die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde das Proteinlysate mit 4x SDS Probenpuffer versetzt, für 5 min bei 95°C inkubiert und anschließend auf Eis gestellt. Jeweils 20µg Proteinlysate pro Geltasche wurden in Triplikaten auf ein SDS-Polyacrylamidgel (7,5%-iges Sammel- und 10%-iges Trenngel) geladen und in 1x Laemmli-Puffer bei 120V für ca. 90 min aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel für 1 h bei 15V auf eine PVDF-Membran transferiert und der erfolgreiche Proteintransfer durch 5-minütige Inkubation der Membran mit Ponceau S Lösung überprüft. Nach dem Waschen der Membran mit destilliertem Wasser und Blocken mit *SuperBlock T20 Blocking* Puffer für 1 h bei RT, wurde die Membran über Nacht bei 4°C auf einem Schüttler mit dem Primärantikörper (IKK2;

1:125 in *SuperBlock T20*) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in TBS wurde die Membran für 2 h bei RT mit dem HRP-konjugierten anti-rabbit Sekundärantikörper (1:1000) inkubiert. Die Membran wurde dreimal gewaschen und anschließend für 1 min mit *Western Lightning Plus ECL Enhanced Chemiluminescence Substrate* inkubiert. Die immunreaktiven Banden wurden mit einer CCD Kamera von Vilber sichtbar gemacht. Die Quantifizierung der Proteinexpression erfolgte mit der Software *TINA 2.0*, wobei Standardkurven für IKK2 und Aktin herangezogen wurden.

5.6 Tiermodelle

Zucht und Haltung der Tiere erfolgten im FEM (Forschungseinrichtungen für experimentelle Medizin; Berlin, Dtl.) unter SPF (spezifisch pathogenfreien) Bedingungen. Kurz vor und während eines Versuchs wurden die Versuchstiere in der Tierhaltung der Experimentellen Neurologie der Charité Berlin gebracht. Die Tierhaltung erfolgte in klimatisierten Räumen mit einem 12 h hell : 12 h dunkel-Rhythmus. Die Käfige wurden durch Filterdeckel belüftet, waren mit Einstreu aus Holzgranulat ausgelegt und enthielten Enrichment in Form von Röhren und/oder Häuschen. Das Wasser wurde täglich gewechselt und pelletiertes Mauseinfutter gereicht.

Die Haltung immunsupprimierter Tiere (zum Beispiel nach Bestrahlung oder Induktion von EAE) erfolgte in einem IVC- (individuell ventilierte Käfig) Bereich, wobei alle Käfigbestandteile, Futter (Spezialdiätfutter SDS VRF1), Einstreu und Wasser autoklaviert wurden.

Bestrahlte und mit Busulfan-behandelte Tiere wurden vorbeugend über vier Wochen oral mittels des Breitbandantibiotikums Cotrim (28 mg/100ml Sulfamethoxazol und 5,6 mg/100ml Trimethoprim) gegen Infektionen geschützt.

Tiere mit motorischen Handicaps wurde die Nahrungs- und Flüssigkeitsaufnahme durch Gabe von eingeweichem Trockenfutter, welches täglich gewechselt wurde, ermöglicht.

Alle Tierversuche wurden im Voraus vom Landesamt für Gesundheit und Soziales (LaGeSo) Berlin genehmigt und nach den Richtlinien des Deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt.

Alle in der vorliegenden Arbeit verwendeten transgenen Mauslinien hatten als genetischen Hintergrund C57BL/6. Sowohl vor als auch nach den Versuchen wurden die Tiere genotypisiert (siehe 5.1.1-5.1.3).

5.6.1 IKK2^{mye}, IKK2^{mye/wt}, IKK2^{wt} und LysM^{ko} Mäuse

Für den konditionalen Knockout von IKK2 wurden LysMCre Mäuse, die eine Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des Lysozyme M (LysM) Promotors exprimieren (generiert von Clausen et al.)^[243] mit IKK2^{fl/fl} Mäusen (Klonierung beschrieben von Pasperakis et al.)^[246] gekreuzt. Die resultierenden Mäuse tragen homozygot gefloخته *Ikk2* Allele und zusätzlich die Cre-Rekombinase in einem (LysMCre^{+/-} Ikk2^{fl/fl}, hier IKK2^{mye/wt} genannt) oder beiden LysM Loci (LysMCre^{+/+} Ikk2^{fl/fl}, hier als IKK2^{mye} bezeichnet). Aus der Kreuzung von LysMCre und IKK2^{fl/fl} Tieren entstanden auch Mäuse mit gefloختen *Ikk2* Allelen und LysM-Wildtyp-Loki (LysMCre^{-/-} Ikk2^{fl/fl}, hier IKK2^{wt} genannt). Diese dienten genauso wie die generierten LysM^{ko} Tiere, die homozygot die Cre-Rekombinase exprimieren, aber ungefloخته *Ikk2* Allele tragen (LysMCre^{+/+} Ikk2^{wt/wt}, hier als LysM^{ko} bezeichnet), als Kontrollgruppe.

Die Genotypen der Nachkommen wurden mittels PCR aus Schwanzspitzen- oder Ohrbiopsien ermittelt (5.1.1-5.1.3). Dabei zeigten Tiere, die homozygot für Cre im LysM Locus waren (LysMCre^{+/+}) im Agarosegel eine Bande bei 512bp, während eine Bande bei 436bp das intakte LysM Allel demonstrierte (Abbildung 7A). Das wildtyp *Ikk2* Gen wurde durch eine 244bp großes PCR-Produkt nachgewiesen, während das gefloخته *Ikk2* eine 346bp große Bande im Agraosegel lieferte. Bei Vorliegen beider Banden für ein Gen lag eine Heterozygotie vor (Abbildung 7B).

5.6.2 LysMCre^{tdRFP} Reportermaus (LysM^{tdRFP})

Um die LysM-Expression in den verschiedenen Organen und Zellpopulationen zu analysieren, wurden LysMCre Mäuse mit ROSA26^{tdRFP} Mäusen^[257] gekreuzt. Die resultierenden LysMCre^{tdRFP} Mäuse (in der vorliegenden Arbeit als LysM^{tdRFP} Tiere bezeichnet) exprimieren das Gen für tdRFP (*tandem dimer red fluorescent protein*) im ROSA26 Locus, welcher ubiquitär exprimiert wird und eine gute Rekombinationseffizienz aufweist. Abbildung 12 verdeutlicht die von Luche et al. beschriebene Insertion einer Cre-induzierbaren Genkassette in den ROSA26 Locus embryonaler Stammzellen von C57BL/6 Mäusen.^[257] Dabei ist dem Reporter-gen *tdRFP* ein loxP-flankierender Transkriptionsstopp vorgeschaltet. Durch Expression einer Cre-Rekombinase wird das Stoppsignal irreversible an der loxP-Sequenz herausgeschnitten und es kommt zur Inversion des *tdRFP* Gens.^[257]

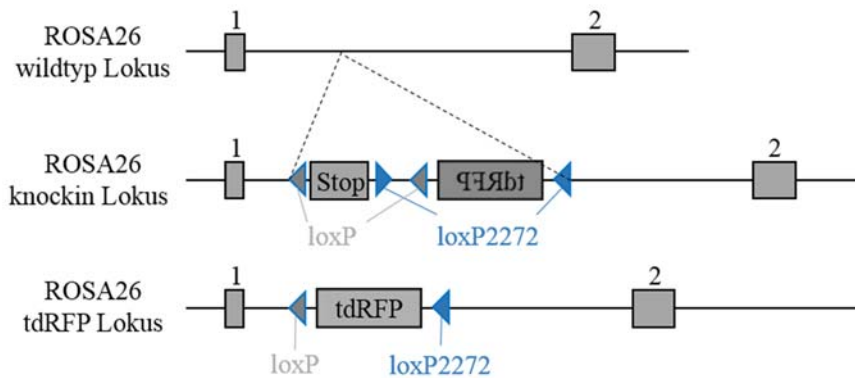


Abbildung 12 Schematische Darstellung der genetischen Veränderungen zur Generierung von tdRFP Reportertieren. Die Cre-induzierbare tdRFP Genkassette, bestehend aus einem Transkriptionsstopp, einem invertiertem *tdRFP* Gen, loxP- und loxP2272 Sequenzen, wurde zunächst in den ROSA26 Locus zwischen Exon 1 und 2 inseriert (ROSA26 knockin Lokus). In Anwesenheit der Cre-Rekombinase kommt es an den loxP-Sequenzen zur Exzision der Stopsequenz sowie zur Inversion des *tdRFP* Gens; der ROSA26^{tdRFP} Locus entsteht.

Die Genotypisierung der Tiere erfolgte anhand der tdRFP Insertion in den Rosa26 Locus. War das Reportergen in beiden Allelen des Rosa26 Locus vorhanden (homozygot für tdRFP), so zeigte sich, nach entsprechender Genotypisierungs-PCR, eine 301bp große Bande im Agarosegel, während ohne diese Insertion (wildtypisch für tdRFP) eine 209bp große Bande detektierbar war. Tiere, die das Reportergen nur in einem Allel des Rosa26 trugen, also heterozygot für tdRFP waren, zeigten beide Banden im Agarosegel (Abbildung 7C).

5.6.3 CerTN L15 LysM^{tdRFP} Reportermaus

Die CerTN L15 LysM^{tdRFP} Reportermause entstanden durch Verkreuzung von C57BL/6 Thy1.1 CerTN L15 Tiere ^[263], die den Troponin-C-basierenden Sensor CerTN L15 unter dem Thy1 Promotor exprimieren und eine starke *CerTN L15*-Expression in Neuronen aufweisen, mit LysMCre^{tdRFP} Mäusen. Die C57BL/6 Thy1.1 CerTN L15 Mäuse stammen von O.Griesbeck (Max-Planck-Institut für Neurobiologie, München, Dtl.).

Die Tiere wurden über eine Genotypisierungs-PCRs für *Cre*, *LysM* sowie auf die Insertion des *tdRFP* Gens in den Rosa26 Locus identifiziert (5.1.1-5.1.3).

5.6.4 C57BL/6 2d2 tdRFP Maus

C57/BL/6 2d2 TCR Mäuse (C57BL/6-Tg^{(Tcrα2D2,Tcrβ2D2)1Kuch/J}) besitzen spezifisch fürs MOG₃₅₋₅₅ Peptid transgene T-Zellrezeptoren, welche durch die Expression von Vα3.2- und

Vβ11 charakterisiert sind.^[264] Diese transgenen Mäuse wurden ursprünglich im Kuchroo Labor (Center for Neurologic Diseases, Harvard Medical School, Massachusetts, USA) generiert^[264] und stammen aus dem Labor von A. Waismann (Institut für Molekulare Medizin, Mainz, Dtl.). Im Labor von Infante-Duarte wurden sie mit ROSA26^{tdRFP} Mäusen verpaart. Die Typisierung der doppelt transgenen C57BL/6 2d2 tdRFP Mäuse erfolgte durchflusszytometrisch (5.4.1).

5.6.5 β-Actin EGFP Mäuse

C57BL/6 Mäuse, die das grün fluoreszierende Protein (EGFP) unter der Kontrolle des β-Actin Promotors exprimieren^[256], wurden über eine heterozygote Zucht mit C57BL/6 Tieren im FEM gezüchtet. Diese Mäuse dienten als Knochenmarkdonoren für bestrahlte oder Busulfan-behandelte Tiere, da deren Zellen *Gfp* ubiquitär exprimieren und daher sowohl im Durchflusszytometer, als auch in der Histologie, gut detektierbar sind.

Die Genotypisierung der Tiere erfolgte vor Versuchsbeginn visuell mittels einer UV-Lampe, die die grün-fluoreszierenden Zellen im Schwanzvenenblut sichtbar machte.

5.6.6 CXCR3 Mäuse

Die CXCR3-defizienten Mäuse (CXCR3-KO) und ihre nicht-transgenen Wurfgeschwister (CXCR3-WT) stammen aus dem Labor von Prof. Dr. H. Kettenmann (Max-Delbrück-Centrum Berlin, Dtl.). Die Generierung der CXCR3-KO Maus wurde 2000 von Hancock et al. beschrieben. Dabei wurde der Großteil des Exons 2 des murinen *Cxcr3* Gens durch ein Neomycin Resistenzgen ersetzt, welches durch den Phosphoglycerat Kinase Promotor getrieben wird.^[265]

Die Genotypisierung der CXCR3-KO und -WT Mäuse erfolgte in zwei getrennten PCRs (5.1.1-5.1.3).

5.7 Krankheitsmodelle und ihre tierexperimentellen Methoden

5.7.1 Experimentelle Autoimmunenzephalomyelitis

EAE kann aktiv oder passiv induziert werden. Die aktive EAE wurde durch subkutane Injektion von insgesamt 200µl Immunisat rechts und links der Schwanzwurzel induziert. Das Immunisat, bestehend aus 800µg *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra in PBS und 250µg MOG₃₅₋₅₅ in

Komplettes Freund-Adjuvanz (CFA), wurde dabei 8-12 Wochen alten weiblichen Tieren injiziert. Zwei Stunden sowie zwei Tage nach Immunisierung erfolgte eine intraperitoneale Injektion von 400ng Pertussistoxin (PTX) in PBS.

Für den adoptiven Transfer von T-Zellen (passive EAE) wurden zunächst Milzzellen aus C57BL/6 2d2 tdRFP Mäusen isoliert und die CD4⁺CD62L⁺-Zellen mittels MACS Kit (*CD4⁺CD62L⁺ T Cell Isolation Kit II*) separiert. Anschließend wurden die T-Zellen im Verhältnis 1:5 mit APCs in Mausmedium (+ 3ng/ml TGF- β , 20ng/ml IL-23, 20ng/ml IL-6) kokultiviert. Die APCs wurden zuvor aus der Milz von C57BL/6 Mäusen isoliert, mit 30 Gy bestrahlt und anschließend 30 min bei 37°C mit 12,5 μ g/ml MOG₃₅₋₅₅ Peptid inkubiert. An Tag 7 und 14 erfolgte eine Restimulation der differenzierten T-Zellen mit APCs aus der Milz von C57BL/6 Mäusen, die zuvor ebenfalls mit 30 Gy bestrahlt und mit 12,5 μ g/ml MOG₃₅₋₅₅ Peptid inkubiert wurden. Die Kokultur erfolgte erneut im Verhältnis 1:5 in Mausmedium. Dieser wurden bei der ersten Restimulation an Tag 7 10ng/ml IL-23, 10ng/ml IL-6 sowie 0,75ng/ml TGF- β zugefügt, während bei der zweiten Restimulation an Tag 14 dem Mausmedium 10ng/ml IL-23 und 5ng/ml IL-6 zugesetzt wurden. Zusätzlich wurden bei jeder Zellsplittung 10ng/ml IL-23 sowie 50U IL-2/ml dem Mausmedium zugefügt. Drei Tage nach der zweiten Restimulation erfolgte die Überprüfung der Th17-Zelldifferenzierung mittels intrazellulärer Zytokinfärbung (siehe 5.4.4). Anschließend wurden jeweils 30x10⁶ Th17-Zellen intravenös in Knochenmarkchimären (siehe 5.2.4) transferiert.

Die Mäuse wurden täglich auf das Vorhandensein klinischer EAE-Symptome hin kontrolliert und der Schweregrad protokolliert (Tabelle 4).

Tabelle 4 **Bewertungsparameter für die klinischen Symptome der EAE**
Ab einem Schweregrad von 3 wurden die Tiere euthanasiert.

Schweregrad	klinische Symptome
0	keine erkennbaren Symptome
0,5	Tonusverlust im Schwanz, keine Lähmung
1	Schwanzparalyse
1,5	Schwanzparalyse und gestörter Wiederaufrichtungsreflex
2	Schwanzparalyse, gestörter Wiederaufrichtungsreflex und Hinterbeinparese
2,5	Schwanzparalyse, gestörter Wiederaufrichtungsreflex, Hinterbeinparese, beginnende Vorderbeinparese
3	Schwanzparalyse, gestörter Wiederaufrichtungsreflex, Hinterbeinparalyse
4	Schwanzparalyse, Hinterbeinparalyse und Vorderbeinparese
4,5	Schwanzparalyse, Hinterbein- und Vorderbeinparalyse
5	Tod durch EAE

Soweit nicht anders angegeben, wurden die Tiere an Tag 30 nach Immunisierung, sofern sie nicht durch Überschreiten des Schweregrades von drei frühzeitig getötet werden mussten, euthanasiert und die aufgearbeiteten Organe durchflusszytometrisch und/oder histologisch untersucht (siehe 5.2.1, 5.3.1, 5.3.2, 5.4.2). Aus dem rechten Vorhof wurde zusätzlich Blut entnommen, welches anschließend bei RT innerhalb von 2 h geronn, bevor es bei 1000g zentrifugiert wurde. Das Serum wurde anschließend bei -20°C für ELISA und CBA weggefroren.

5.7.2 Fazialisnerv-Axotomie

Die Läsion des Nervus Fazialis ist ein gut etabliertes Tiermodell zur Untersuchung neuronaler Degenerations- und Regenerationsprozesse, ohne die Blut-Hirn-Schranke zu beeinträchtigen. Die Mäuse wurden zunächst durch intraperitoneale Injektion von 50 mg/kg Ketamin und 7,5 mg/kg Xylazin anästhesiert. Der Nervus Fazialis des rechten Ohres wurde freipräpariert und distal des Foramen stylomastoideum durchtrennt. Anschließend wurde die Wunde mit Histoacryl verschlossen. Die erfolgreiche Operation wurde über die resultierende ipsilaterale Whiskerparese überprüft.^[82] Die Zellen der kontralateralen Seite dienten als interne Kontrollen. Die Fazialisnerv-Axotomie wurde von Dr. Chotima Böttcher (Labor für Molekulare Psychiatrie, Charité Berlin) durchgeführt.

5.7.3 Meningitis

Anästhesierten C57BL/6 Männchen (8-12 Wochen alt) wurde 20µg Pam₃CysSK₄ in PBS in den Spinalkanal zwischen den Lendenwirbeln L2 und L3 injiziert. 24h nach Injektion wurde den anästhesierten Tieren Cerebrospinalflüssigkeit durch Punktion der Cisterna magna abgenommen und die Leukozytenzahl in dieser Gehirn-Rückenmarks-Flüssigkeit mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Diese Arbeiten wurden von Olga Rung (Institut für Neurologie, Charité Berlin) durchgeführt. Aus dem rechten Vorhof wurde Blut entnommen, welches anschließend bei RT innerhalb von 2 h geronn, bevor es bei 1000g zentrifugiert wurde. Das Serum wurde anschließend bei -20°C für ELISA und CBA weggefroren. Zeitgleich wurden die Tiere mit 20ml NaCl-Lösung perfundiert und die Milzen sowie die Gehirne präpariert. Die Milzen und jeweils eine Gehirnhemisphere wurden durchflusszytometrisch untersucht (FACS-Antikörper Färbung 1: CD45 PerCP, CD11b APC, Ly6C FITC, Ly6G PB, CD115 PE, MHCII APC Cy7; FACS-Antikörper Färbung 2: CD45 PB, CD4 APC, B220 PE, CD8 PE Cy7; 5.4.2).

Die andere Gehirnhemisphäre wurde zunächst in 2-Methylbutan auf Trockeneis schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert, bis einzelne Gehirnschnitte angefertigt und TUNEL-gefärbt wurden (siehe 5.3.2).

5.8 Statistische Analyse

Alle Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm Standardfehler (SEM; *standard error of the mean*) dargestellt. Bei größeren Tierzahlen wurden die Daten mehrere Experimente zusammengefasst. Die statistische Auswertung erfolgt mit der Software *GraphPad Prism 5.0*, wobei folgende statistischen Tests angewandt wurden: nicht-parametrischer Mann-Whitney Test, Student's t-test, One-way ANOVA (*analysis of variance*) oder Two-way ANOVA mit dem Bonferroni Posthoc-Test. Die Signifikanzen wurden wie folgt dargestellt: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

6 Ergebnisse

6.1 Rolle von NF- κ B in myeloiden Zellen

6.1.1 Geno- und phänotypische Charakterisierung der IKK2^{mye} Mäuse

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte die Rolle des kanonischen NF- κ B Signalweges in myeloiden Zellen des Zentralnervensystems untersucht werden. Hierfür wurden Mäuse mit einer zellspezifischen Deletion der I κ B Kinase 2 (IKK2) verwendet (IKK2^{mye}). Die Deletion von IKK2 in myeloiden Zellen wurde durch Kreuzung von LysM^{Cre/Cre} Mäusen, die die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des Lysozyme M (LysM) Promotors exprimieren, mit IKK2^{fl/fl} Tieren erzielt. Als Kontrollgruppen dienten Mäuse mit geflochten *Ikk2* Allelen ohne Cre-Rekombinase (IKK2^{wt}) sowie LysM^{Cre/Cre} Tiere, die homozygot die Cre-Rekombinase exprimieren, aber wildtyp *Ikk2* Allele tragen (LysM^{ko}).

Die Versuchstiere wurden über Genotypisierung identifiziert, wobei die spezifischen PCR-Fragmente für *Cre* (512bp), *LysM* (436bp), ungefloxtes *Ikk2* Allel (244bp) oder geflochte *Ikk2* Exons (346bp) mittels Gelelektrophorese nachgewiesen wurden (5.1.3). Bei Vorliegen beider Banden für ein Gen lag eine Heterozygotie vor (Abbildung 7). Phänotypisch waren keine Unterscheide zwischen den untersuchten Genotypen ersichtlich.

Die zellspezifische Deletion von IKK2 in den IKK2^{mye} Mäusen konnte bereits im Rahmen der Doktorarbeit von Dr. Katja Blazej bestätigt werden.^[266] Dabei konnte in primären Mikroglia sowie in peritonealen Makrophagen von IKK2^{mye} Mäusen *in vitro* gezeigt werden, dass deren IKK2 Protein- und mRNA-Expressionslevel signifikant reduziert sind. Astrozyten aus dem Neuroektoderm dienten als Kontrollen für die Gewebespezifität der IKK2-Deletion und zeigten unveränderte Expressionslevel zwischen den untersuchten Genotypen (Anhang 1).

Mikrogliazellen aus IKK2^{mye} Mäusen wiesen zudem eine herabgesetzte Kerntranslokation der NF- κ B Untereinheit p65 nach Stimulation mit LPS auf (Anhang 2).^[266]

6.1.2 Cre-Rekombination im myeloiden und nicht-myeloiden Zellkompartiment

Zunächst wurde untersucht in welchen Zellen und in welchem Ausmaß die Cre-Expression und somit auch die Deletion eines loxP-flankierenden Gens durch Klonieren einer Cre-Rekombinase in den LysM-Lokus erreicht werden kann. Dazu wurden mittels Durchflusszytometrie die tdRFP-exprimierenden Zellpopulationen in LysMCre^{tdRFP} Mäusen (hier kurz als LysM^{tdRFP} bezeichnet) untersucht. Die LysM^{tdRFP} Tiere entstanden durch

Kreuzung von LysMCre- mit ROSA26^{tdRFP} Tieren (siehe 5.6.2). Durch die Expression der Cre-Rekombinase kommt es in den Zellen zur Expression des tdRFP-Reporters, dessen Signal im Durchflusszytometer detektiert wurde. Die Gatingstrategie der untersuchten Zellpopulationen ist in Abbildung 11 dargestellt.

Im CD45⁺CD11b⁺-Zellkompartiment zeigte sich im Knochenmark der LysM^{tdRFP} Mäuse die höchste tdRFP-Expression und damit die höchste Cre-Rekombinationsrate mit $72 \pm 1\%$. In der Milz und dem Blut wiesen die LysM^{tdRFP} Mäuse vergleichbare tdRFP-Expressionslevel in CD45⁺CD11b⁺-Zellen von etwa 60% (Milz: $57 \pm 4\%$; Blut: $64 \pm 2\%$) auf. Im ZNS ist der Anteil an tdRFP-exprimierende Zellen im CD45⁺CD11b⁺ Kompartiment mit $30 \pm 2\%$ (LysM^{tdRFP}) und $13 \pm 2\%$ (LysM^{tdRFP/wt}) deutlich geringer als in den anderen analysierten Organen (Abbildung 13). Dabei zeigten die residenten Mikroglia im ZNS (definiert als CD45^{dim}CD11b⁺) eine geringere Cre-Rekombinationsrate im Vergleich zu den anderen myeloiden Zellen im ZNS (definiert als CD45^{hi}CD11b⁺), verdeutlicht durch die viel geringere Anzahl tdRFP-exprimierender Zellen (Abbildung 13). Mit Hilfe der Zelloberflächenmarker Ly6C und Ly6G konnte in der CD45^{hi}CD11b⁺-Zellpopulation zwischen Granulozyten und Monozyten unterschieden werden. Dabei zeigte sich, dass Granulozyten (CD45^{hi}CD11b⁺Ly6C^{int}Ly6G⁺) im ZNS eine doppelt so hohe Cre-Rekombinationsrate wie Monozyten aufweisen (CD45^{hi}CD11b⁺Ly6C^{hi}Ly6G⁻, Anhang 3).

In der Milz lag der Anteil tdRFP-exprimierender Zellen im nicht-myeloiden Zellkompartiment (CD45⁺CD11b⁻) mit $14 \pm 2\%$ (LysM^{tdRFP}) und $6 \pm 1\%$ (LysM^{tdRFP/wt}) deutlich unter dem der CD45⁺CD11b⁺ myeloiden Zellen (LysM^{tdRFP}: $57 \pm 4\%$; LysM^{tdRFP/wt}: $38 \pm 3\%$). Auch hier zeigte sich in den homozygoten LysM^{tdRFP} Tieren eine deutlich höhere Cre-Rekombinationsrate in Granulozyten im Vergleich zu Monozyten, ebenso im Knochenmark und im Blut (Anhang 3).

Die heterozygoten LysM^{tdRFP/wt} Mäusen wiesen aufgrund ihrer unvollständigen Cre-Rekombination in allen untersuchten Organen und Zellpopulationen reduzierte tdRFP-Expressionsraten im Vergleich zu ihren homozygoten Geschwistern (LysM^{tdRFP}) auf. Als Kontrolltiere dienten Mäuse ohne Cre-Rekombinase (LysM^{wt}) und damit ohne messbare tdRFP-Expression. Diese lag bei allen untersuchten Organen und Zellpopulationen in den LysM^{wt} Tieren unter 0,5%, was auf die ubiquitär vorhandene Hintergrundfluoreszenz zurückzuführen ist (Abbildung 13 und Anhang 3).

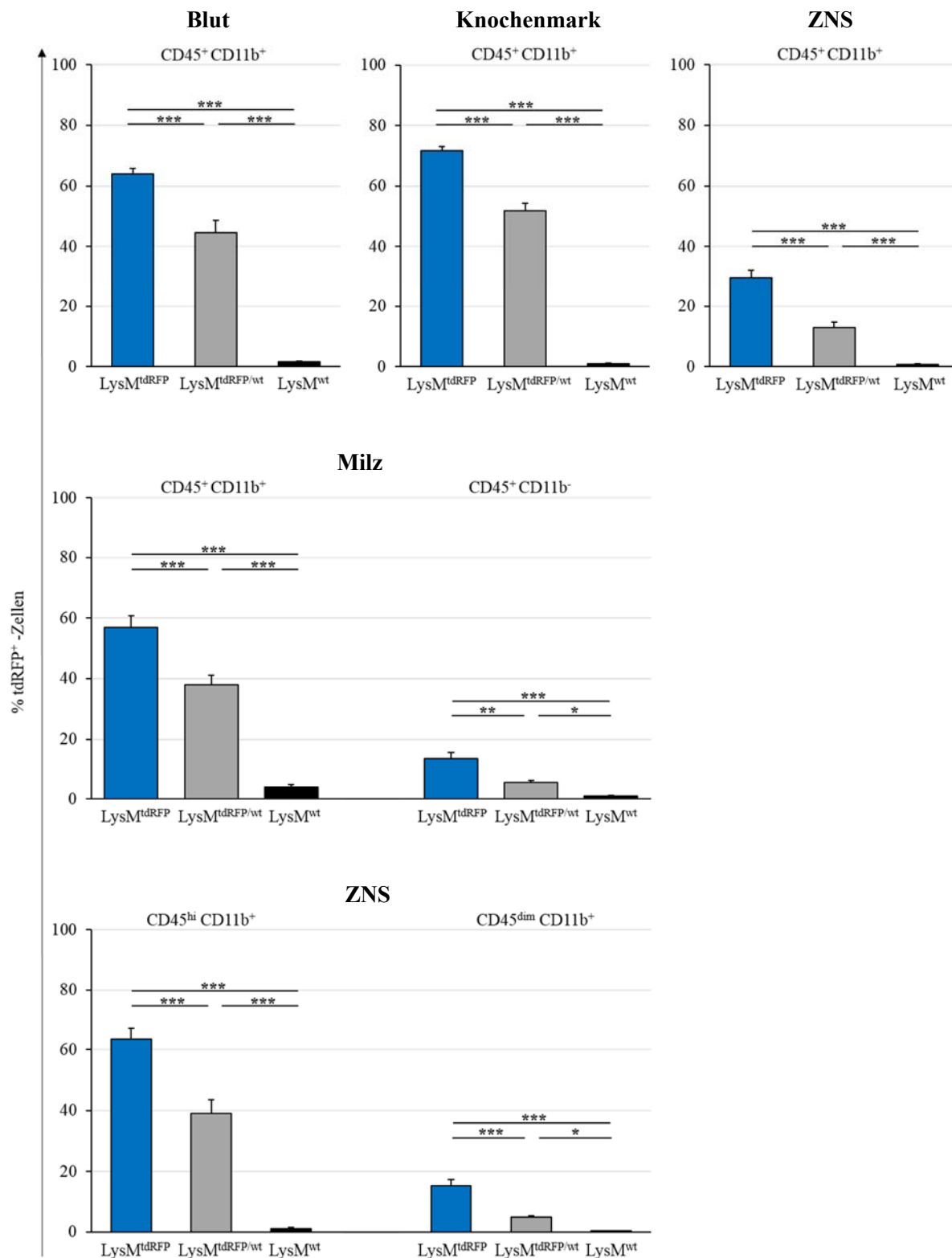


Abbildung 13 Frequenz $tdRFP$ -exprimierender Zellen in $LysM^{tdRFP}$ - und Kontrolltieren mittels FACS im Blut, Knochenmark, Milz und ZNS. Dargestellt sind die $CD45^+CD11b^+$ oder $CD45^+CD11b^-$ -Zellen. Im ZNS stellen die $CD45^{hi}CD11b^+$ -Zellen Monozyten und Granulozyten dar, während die $CD45^{dim}CD11b^+$ -Zellen die residenten Mikroglia repräsentieren. Die Ergebnisse stammen aus vier unabhängigen Versuchen und wurden zusammen mit Dr. Helena Radbruch generiert. $n=5-8$. $MW \pm SEM$; * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$ (One-way ANOVA mit dem Bonferroni Posthoc-Test).

Unter inflammatorischen Bedingungen (EAE) zeigte sich eine signifikante Herabregulation der tdRFP-Expression in den CD45⁺CD11b⁺-Zellen im Blut und der Milz von CerTN L15 LysM^{tdRFP} Mäusen (hier zur Vereinfachung auch als LysM^{tdRFP} bezeichnet), während die tdRFP-Expression im CD45⁺CD11b⁻-Zellkompartiment in der Milz am Peak der EAE unverändert war. Auch die CD45^{hi}CD11b⁺-Zellen im ZNS zeigten eine signifikant geringere tdRFP-Expression in den EAE-Tieren verglichen mit gesunden Tieren (Abbildung 14). Dabei ist jedoch zu erwähnen, dass unter inflammatorischen Bedingungen die Cre-Rekombinationseffizienz in Monozyten (CD45^{hi}CD11b⁺Ly6C^{hi}Ly6G⁻) nicht verändert ist, während die Granulozyten (CD45^{hi}CD11b⁺Ly6C^{int}Ly6G⁺) im ZNS und der Milz eine signifikant reduzierte Cre-Rekombinationsrate am Peak der EAE aufwiesen (Anhang 4).

Die tdRFP-Expression in den verschiedenen Organen und Zellkompartimenten wurde am Peak der EAE (Tag 15 nach Immunisierung mit MOG₃₅₋₅₅ Peptid) analysiert. Dabei war nur im CD45^{dim}CD11b⁺-Zellkompartiment im ZNS (Mikroglia) eine erhöhte tdRFP-Expression in den immunisierten LysM^{tdRFP} Tieren gegenüber naiven Tieren detektierbar (Abbildung 14). Zusätzlich zeigte sich ein vergleichbarer klinischer EAE-Verlauf zwischen den homo- und heterozygoten CerTN L15 LysM^{tdRFP} Tieren (Anhang 5), wobei die Mäuse an Tag 15 euthanasiert wurden. Nur die Wildtyptiere wiesen signifikant höhere klinische Scores an Tag 11 und 12 nach Immunisierung mit MOG₃₅₋₅₅ Peptid auf, was die AUC jedoch nicht signifikant erhöhte. Die Inzidenz, der erste Tag mit klinischen Symptomen sowie die maximalen EAE-Scores waren ebenfalls vergleichbar zwischen den homo- und heterozygoten CerTN L15 LysM^{tdRFP} Mäusen (Anhang 5).

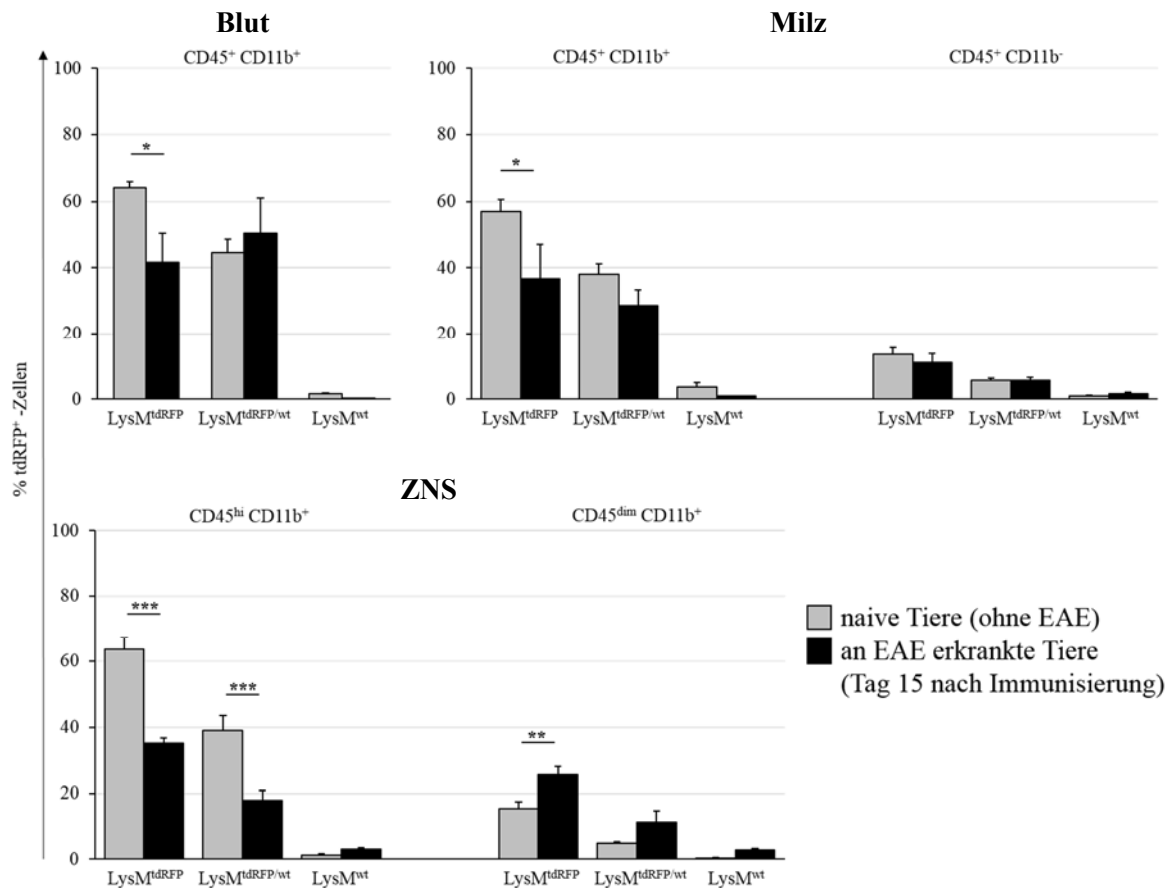


Abbildung 14 Frequenzen tdRFP-exprimierender Zellen in naiven LysM^{tdRFP} Mäusen (graue Balken) und unter inflammatorischen Bedingungen (EAE; an Tag 15 nach Immunisierung) in CerTN L15 LysM^{tdRFP} Mäusen (hier auch als LysM^{tdRFP} bezeichnet; schwarze Balken). Die tdRFP-Expression wurde mittels Durchflusszytometrie im Blut, der Milz und dem ZNS gemessen. Dargestellt sind die CD45⁺CD11b⁻- bzw. CD45⁺CD11b⁺-Zellen. Im ZNS stellen die CD45^{hi}CD11b⁺-Zellen Monozyten und Granulozyten dar, während die CD45^{dim}CD11b⁺-Zellen residente Mikroglia repräsentieren. Die Ergebnisse der naiven Tiere stammen aus vier unabhängigen Versuchen (n=5-8), die Daten der mit MOG₃₅₋₅₅ Peptid immunisierten Tiere aus einem Versuch (n=3). MW ± SEM; *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 (Two-way ANOVA mit dem Bonferroni Posthoc-Test)

6.1.3 Reduzierte EAE-Inzidenz in IKK2^{mye} Mäusen

Um die Rolle der NF-κB Aktivierung unter neuroinflammatorischen Bedingungen zu untersuchen, wurden IKK2^{mye} Mäuse mit MOG₃₅₋₅₅ Peptid immunisiert. Dabei sollte der Effekt der LysM-Deletion in den LysM^{Cre/Cre} Mäusen von jenem des deletierten *Ikk2* Gens unterschieden werden. Daher wurden LysM^{ko} Tiere, die homozygot die Cre-Rekombinase exprimieren, aber wildtyp-*Ikk2* Allele tragen, mit untersucht. IKK2^{mye} Mäuse zeigten dabei mit 22% eine signifikant geringere EAE-Inzidenz verglichen mit 75-80% Erkrankungen in den IKK2^{wt/mye}, IKK2^{wt} und LysM^{ko} Gruppen. Auch der mittlere klinische Score in der IKK2^{mye}

Versuchsgruppe war reduziert, einhergehend mit einer geringeren *Area under the Curve* (AUC; Abbildung 15B und C).

Interessanterweise zeigten die zwei erkrankten IKK2^{mye} Mäuse einen ähnlichen klinischen Verlauf wie die Tiere in den Kontrollgruppen, verdeutlicht durch vergleichbare maximale Scores und dem Tag erster klinischer Symptome (Abbildung 15C). Histopathologisch konnten keine signifikanten Immunzellinfiltrate oder Demyelinisierungen im Rückenmark der IKK2^{mye} Mäuse, die keine EAE Symptome zeigten, gefunden werden (Abbildung 16, Score 0). Erkrankte IKK2^{mye} Tiere wiesen dagegen vergleichbare Entzündungsherde im Rückenmark an Tag 30 nach Immunisierung wie IKK2^{wt} Mäuse auf (Abbildung 16, Score 1,5-3).

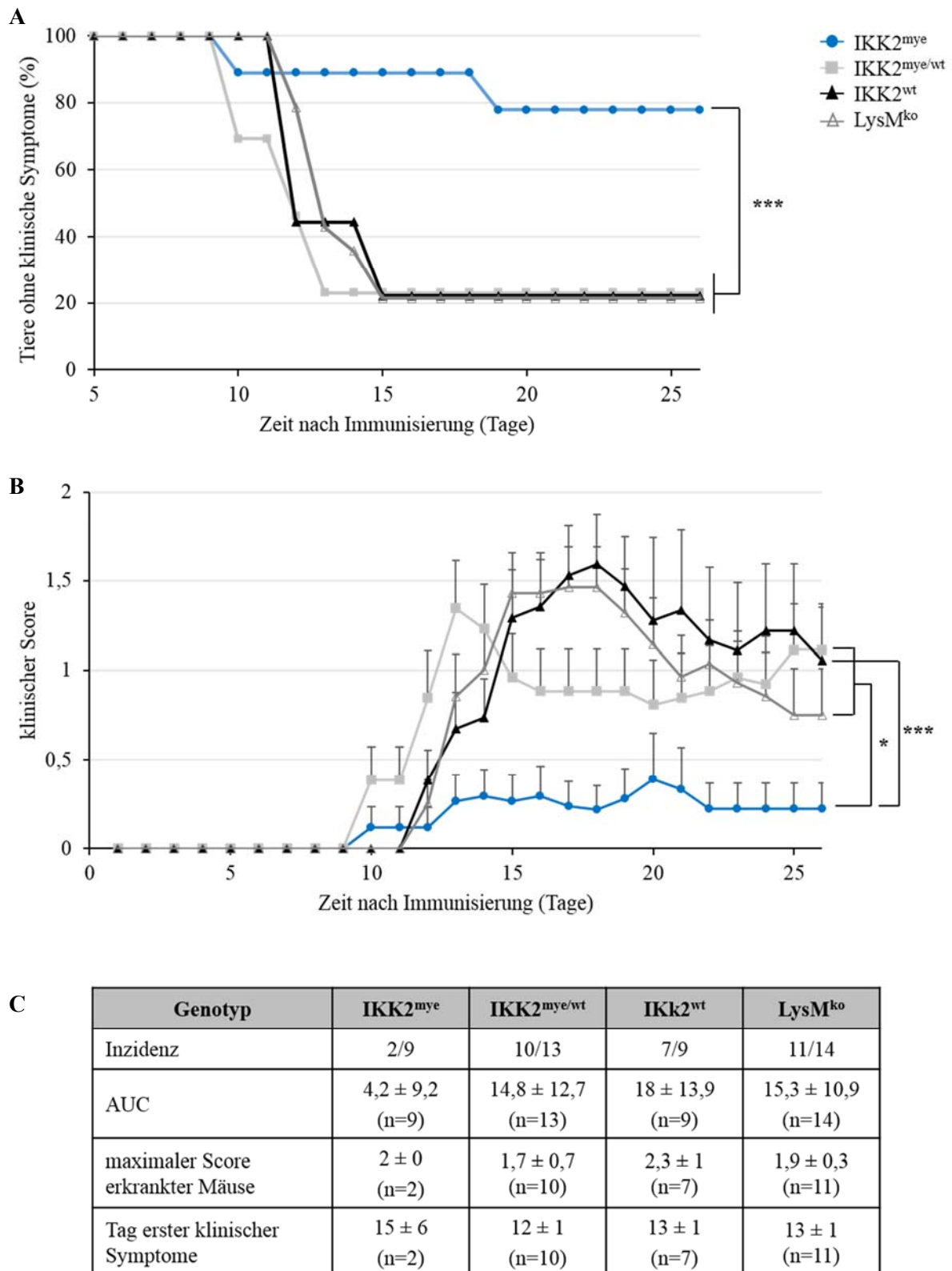


Abbildung 15 Klinischer EAE-Verlauf der IKK2 Mäuse. **A)** EAE-Inzidenz; **B)** Klinischer Score; **C)** Übersicht über die Inzidenz, die *Area under the Curve* (AUC), der maximale Score der erkrankten Tiere sowie den ersten Tag mit klinischen Symptomen. Der Versuch wurde zusammen mit Dr. Helena Radbruch durchgeführt. n = siehe Tabelle C. MW ± SEM; *p<0,05; ***p<0,001 (One-way ANOVA mit dem Bonferroni Posthoc-Test)

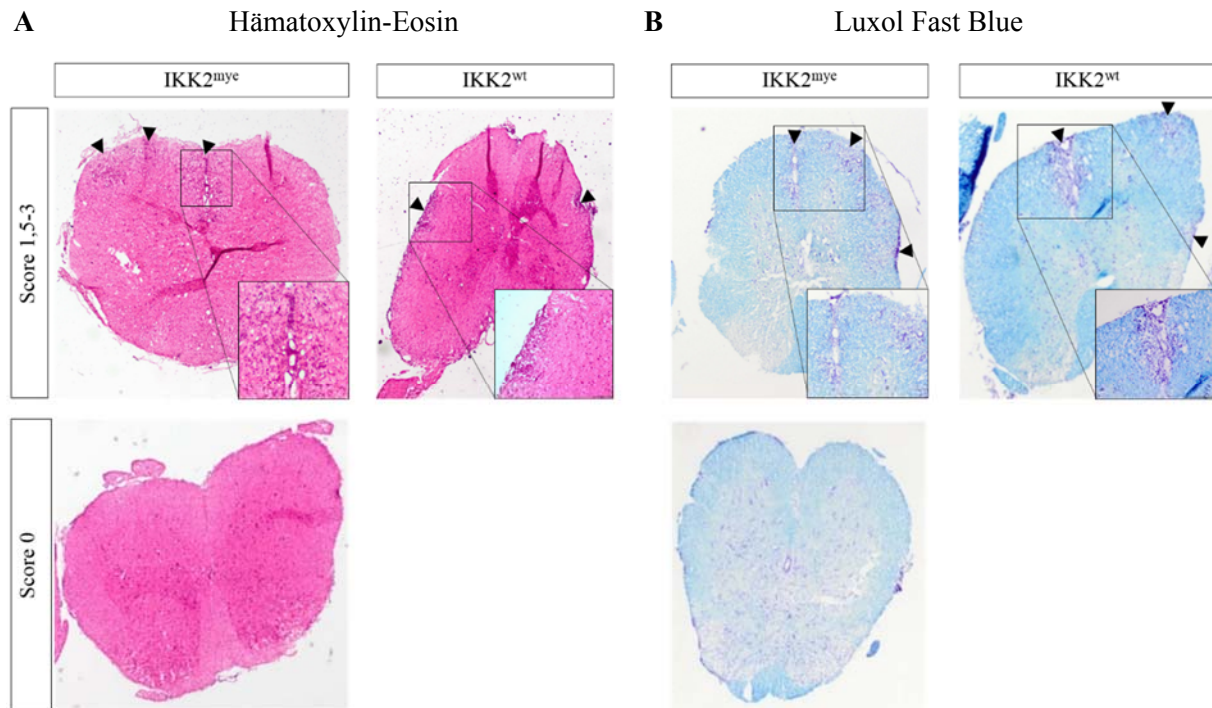


Abbildung 16 Immunzellinfiltrate und Demyelinisierungen im Rückenmark von $IKK2^{mye}$ und $IKK2^{wt}$ Tieren 30 Tage nach Immunisierung mit MOG_{35-55} Peptid. Die schwarzen Pfeile markieren die Läsionen (sichtbar gemacht mit einer HE-Färbung, **A**) und die Demyelinisierungen (repräsentiert durch eine Luxol Fast Blue Färbung, **B**) im Rückenmark von $IKK2^{mye}$ bzw. $IKK2^{wt}$ Mäusen mit klinischem EAE-Score von 0 bzw. 1,5-3. 20 μ m Transversal-Kryoschnitte. Übersichtsvergrößerung 40x; Detailvergrößerung 200x

Zwischen den $IKK2^{mye}$ Tieren und den Kontrollgruppen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Funktionalität der Blutleukozyten in Hinblick auf die Zytokinproduktion nach EAE. Dabei wurden die Zytokine IL-2, IL-4, IL-10, TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-17 und IL-1 β an Tag 30 nach Immunisierung mit MOG_{35-55} im Serum der Tiere untersucht (Abbildung 17). Es konnte nur eine Tendenz zur reduzierten Sekretion der Zytokine IL-17, IL-1 β und IL-10 in den $IKK2^{mye}$ Tieren detektiert werden, wobei in den drei untersuchten $IKK2^{mye}$ Tieren sogar keine IL-10-Sekretion detektierbar war (Abbildung 17). Zwischen $IKK2^{mye}$ Mäusen, die nach Immunisierung klinische Symptome der EAE zeigten, und Tieren gleichen Genotyps ohne klinische Symptome waren keine signifikanten Unterschiede in der Konzentration der Serumzytokine messbar. Auf eine graphische Darstellung wurde verzichtet. Auch *ex vivo* zeigten die an Tag 30 nach Immunisierung aus $IKK2^{mye}$ Mäusen und Kontrolltieren isolierten Milzzellen nach Stimulation mit anti-CD3/anti-CD28 bzw. MOG_{35-55} Peptid keinen signifikanten Unterschied in der Zytokinsekretion (Anhang 6 und 7), wengleich auch hier eine

Tendenz zur reduzierten Sekretion von IL-17 und TNF- α nach Stimulation mit anti-CD3/anti-CD28 in den Milzzellen der IKK2^{mye} Tiere messbar war. Gleichzeitig konnte eine nicht signifikant erhöhte IFN- γ -Expression von IKK2^{mye} Milzzellen nach anti-CD3/anti-CD28 Stimulation detektiert werden (Anhang 6).

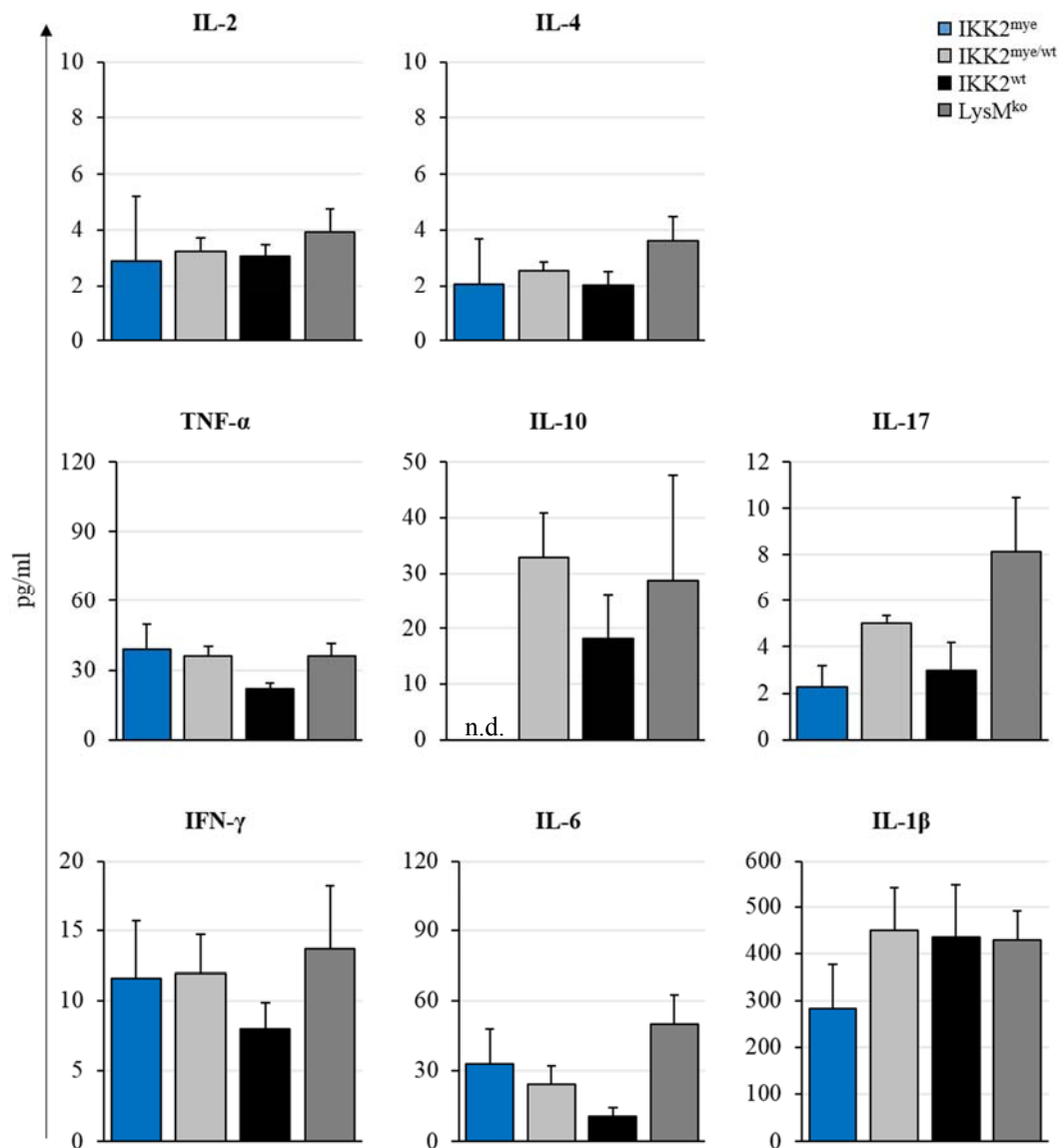


Abbildung 17 Zytokinkonzentration im Serum der IKK2 Mäuse an Tag 30 nach Immunisierung. Die Konzentration von IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IFN- γ und TNF- α wurde über ein Cytometric Bead Array (CBA), IL-1 β mittels ELISA, anhand einer Standardkurve bestimmt. n=3-8. MW \pm SEM; nicht signifikant (One-way ANOVA mit dem Bonferroni Posthoc-Test). n.d.: nicht detektierbar

6.1.4 Wiederhergestellte Inzidenz in $IKK2^{mye}$ Mäusen bei der passiven EAE

Aufgrund der Tatsache, dass trotz signifikantem Inzidenzunterschied zwischen den untersuchten Genotypen der klinische Verlauf der erkrankten $IKK2^{mye}$ Mäusen denen der Kontrollgruppen gleich, wurden passive EAE-Experimente durchgeführt. Dabei wurden *in vitro* generierte MOG-spezifische Th17-Zellen aus C57BL/6 *2d2* tdRFP Mäusen (siehe 5.6.4) in $IKK2^{mye}$ sowie $IKK2^{wt}$ Knochenmarkschimäre (siehe 5.2.4) über die Schwanzvene injiziert. Die FACS-Analyse bestätigte dabei das erfolgreiche Generieren von $CD4^+$ Th17-Zellen, die das Zytokin IL-17, aber kein $IFN-\gamma$ produzieren (Abbildung 18).

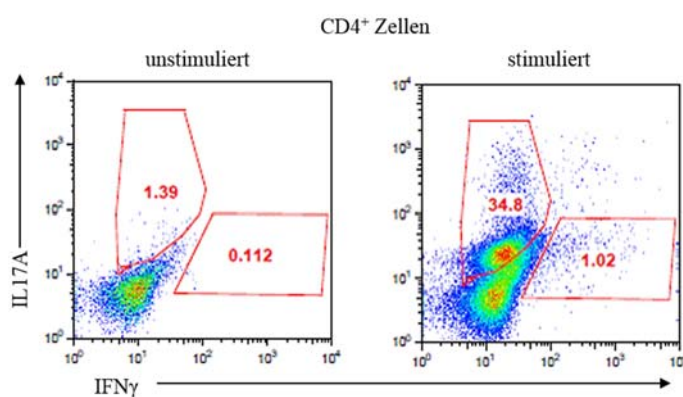


Abbildung 18 Durchflusszytometrische Kontrolle der intrazellulären Zytokinproduktion von *in vitro* generierten $CD4^+$ Th17-Zellen. IL-17 und $IFN-\gamma$ Messung von *in vitro* stimulierten (4h mit anti-CD3/anti-CD28) $CD4^+$ Zellen aus C57BL/6 *2d2* tdRFP Mäusen im Vergleich zu unstimulierten $CD4^+$ Zellen an Tag drei nach der zweiten Restimulation mit APCs aus C57BL/6 Tieren.

Im Vergleich zur aktiven Induktion entwickelt sich die EAE beim adoptiven Transfer von T-Zellen (passive EAE) schneller und ist zudem reproduzierbarer.^[267,268] Dabei zeigten die $IKK2^{mye}$ Knochenmarkschimären eine wiederhergestellte EAE-Inzidenz von 100% (Abbildung 19A). Die $IKK2^{mye}$ und $IKK2^{wt}$ Knochenmarkschimären Tiere wiesen in der passiven EAE zudem vergleichbare klinische Scores bis zur Remissionsphase (ab Tag 20; Abbildung 19B) auf, was auch Einfluss auf die AUC hatte (Abbildung 19C). Ab Tag 20 nach Immunisierung zeigten die $IKK2^{wt}$ Knochenmarkschimären eine deutliche Remission im klinischen EAE-Verlauf, während bei den $IKK2^{mye}$ Knochenmarkschimären diese Remission bis Tag 30 nicht eintrat. Ab Tag 28 wurden bei diesen Chimären sogar signifikant höhere klinische Scores detektiert verglichen mit $IKK2^{wt}$ Tieren (Abbildung 19B).

Indem die T-Zell Priming-Phase durch den adoptiven Transfer von *in vitro* stimulierten $CD4^+$ Th17-Zellen in den $IKK2^{mye}$ Mäusen umgangen wurde, zeigte sich eine unveränderte Infiltration von Immunzellen im ZNS von $IKK2^{wt}$ - und $IKK2^{mye}$ Chimären (Abbildung 19D).

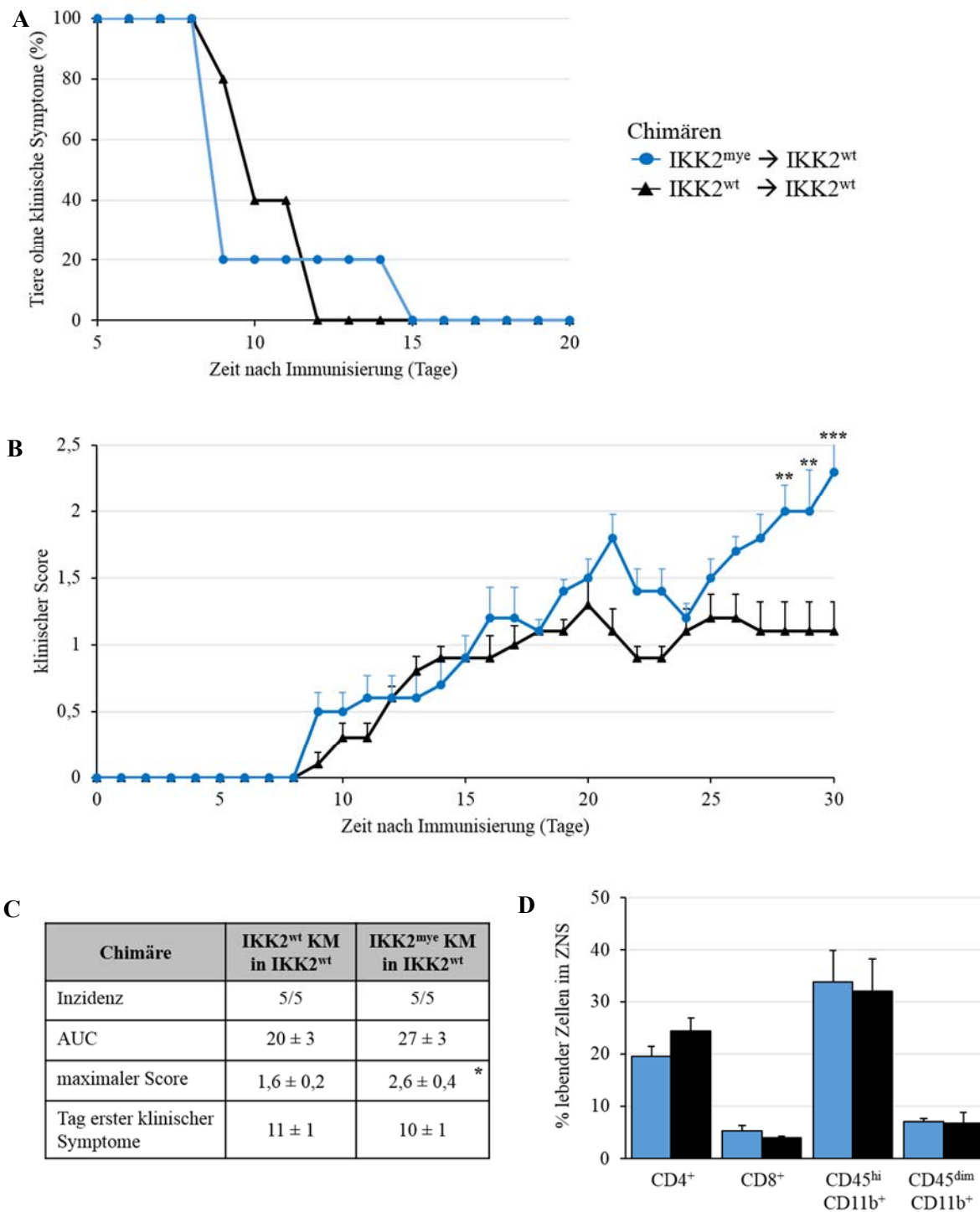


Abbildung 19 Klinischer Verlauf der passiven EAE in IKK2^{mye}- und IKK2^{wt} Knochenmarkchimären. **A)** EAE-Inzidenz; **B)** klinischer Score; **C)** Übersicht über Inzidenz, *Area under the curve* (AUC), maximaler Score sowie den Tag erster klinischer Symptome. **D)** Durchflusszytometrische Bestimmung der CD4⁺CD4⁺, CD4⁺CD8⁺, CD45^{hi}CD11b⁺, CD45^{dim}CD11b⁺ Zellen im ZNS von IKK2^{mye}- (blaue Balken) und IKK2^{wt} (schwarze Balken) Knochenmarkchimären an Tag 30 nach aditivem Transfer von CD4⁺ Th17-Zellen. n=5 (A, B, C); n=3 (D). MW ± SEM; *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 (A, B: Two-way ANOVA mit dem Bonferroni Posthoc-Test; C, D: Mann-Whitney t-Test;). KM: Knochenmark

6.1.5 Einfluss der myeloiden NF- κ B Inaktivierung auf den neuronalen Zelltod und den intrathekalen Leukozyteneinstrom in Pam₃Cys-induzierter Meningitis

Im T-Zell-abhängigen Krankheitsmodell EAE zeigte sich, dass die myeloide NF- κ B Aktivierung einen größeren Einfluss auf die T-Zellaktivierung als auf myeloide Effektorfunktionen und Migration hat. Dieser Befund sollte mit Hilfe eines T-Zell-unabhängigen Neuroinflammationsmodells bestätigt werden. Dazu wurde der TLR2-Agonist Pam₃Cys verwendet, um eine experimentelle Meningitis in den IKK2^{mye} Mäusen und den Kontrolltieren zu induzieren.

24h nach Stimulation zeigten sich keine signifikanten Unterschiede an eingewanderten Leukozyten im Liquor (Abbildung 20A). Der neuronale Zelltod im Gyrus dentatus des Hippocampus wurde mittels TUNEL-Färbung quantifiziert und zeigte ebenfalls keinen signifikanten Unterschied zwischen den experimentellen Gruppen (Abbildung 20C). Auch die IL-1 β -Konzentration im Liquor (Abbildung 20B) sowie die Infiltrate von Monozyten und Granulozyten im ZNS und der Peripherie (Abbildung 20D und Anhang 8) unterschieden sich nicht zwischen den experimentellen Gruppen.

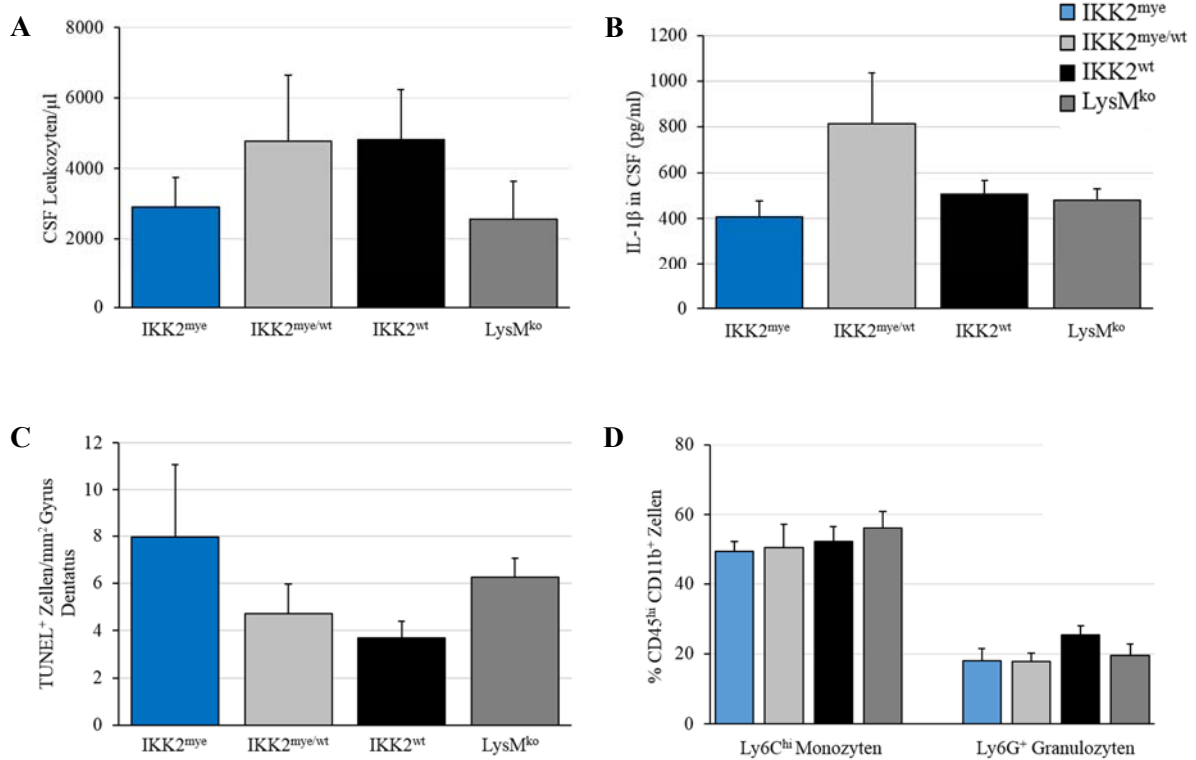


Abbildung 20 Pam₃Cys-induzierte Meningitis in IKK2^{mye}- und Kontrollmäusen.

Leukozytenzahl (A) und IL-1 β Konzentration (B) in der Cerebrospinalflüssigkeit (CSF) sowie Anzahl TUNEL-positiver hippocampaler Zellen (gemessen im Gyrus dentatus, C) 24h nach intrathekaler Pam₃CysSK₄ Gabe. D) Durchflusszytometrische Bestimmung der Frequenz CD45^{hi}CD11b⁺Ly6C^{hi}-Monozyten und CD45^{hi}CD11b⁺Ly6G⁺-Granulozyten im ZNS von IKK2^{mye}- und Kontrollmäusen 24h nach Meningitisinduktion. n = 4-5 (A, B, D); n=5-7 (C). MW \pm SEM; nicht signifikant (One-way ANOVA mit dem Bonferroni Posthoc-Test).

6.2 Etablierung einer nicht-myeloablativen Konditionierung für die Einwanderung myeloider Zellen ins Gehirn

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte ein nicht-myeloablatives Konditionierungsschema etabliert werden, das im ZNS ein Milieu für die Einwanderung myeloider Zellen ins Gehirn schafft. Bei der Kopfbestrahlung (*head irradiation*; HI) wird der Rest des Körpers durch eine Bleiabschirmung vor Bestrahlung geschützt (Abbildung 21A) und dadurch die vollständige Rekonstitution des hämatopoetischen Systems überflüssig gemacht. Dosimetrische Messungen zeigten dabei, dass die Nase der 8-12 Wochen alten Mäuse 3,75cm vor der Bleiabschirmung platziert werden muss, damit alle Gehirnareale eine Strahlendosis von 95-100% der Ausgangsstrahlung erhielten. Die Reststrahlung im abgeschirmten Bereich lag unter 6% (Abbildung 21B). Die fokale Bestrahlung führt zu einem Verlust der Fellfarbe ausschließlich im bestrahlten Bereich (Abbildung 21C).

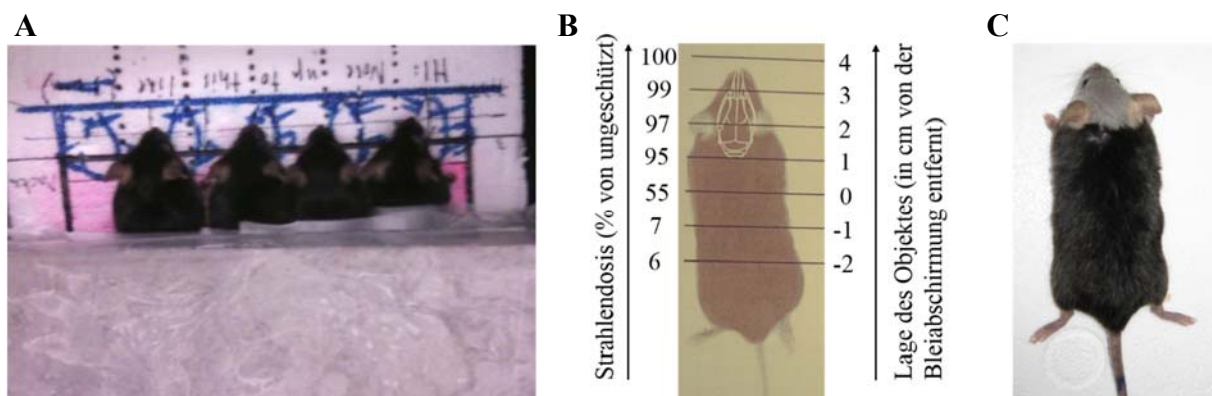


Abbildung 21 Fotografische Aufnahmen zeigen die 3cm dicke Bleiabschirmung, die die selektive Bestrahlung des Kopfes ermöglicht (A), wobei die Reststrahlung im abgeschirmten Bereich mit der Entfernung zur Bleiabschirmung bis unter 6% sinkt (B). Die fokale Bestrahlung führt zum Verlust der Fellfarbe nur im Kopfbereich (C).

Die Signale, die bei der Rekrutierung myeloider Zellen ins ZNS eine Rolle spielen, sind immer noch nicht umfassend geklärt. Daher sollten zunächst die durch Kopfbestrahlung induzierten molekularen und zellulären Veränderungen charakterisiert werden. Adulte C57BL/6 Mäuse wurden dazu mit einer Gesamtdosis von 11 Gy kopfbestrahlt und unterschiedliche Gehirnregionen (Bulbus olfactorius, OB; Cerebellum, CB; Hirnstamm mit Fazialiskernen, FN) 1, 2, 4, 12 bzw. 16 Wochen nach Bestrahlung auf ihre Genexpressionen hin untersucht. Dabei wurde die Expression verschiedener Zytokine (TNF- α , IL-1 β , IL-10), Chemokine (CCL2,

CCL5, CCL21, CXCL4, CXCL10), Zelladhäsions- und kostimulatorischer Moleküle (ICAM-1, Itgb3, VCAM-1, P-Selektin, E-Selektin, CD40) mittels quantitativer Real-Time PCR analysiert (Abbildung 22A, Anhang 9-11). Nichtbestrahlte Tiere dienten als Kontrollen.

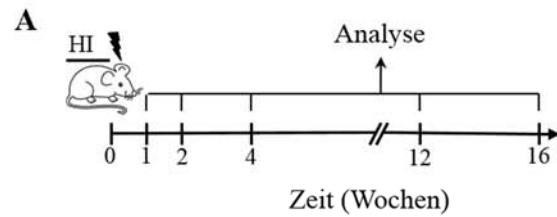
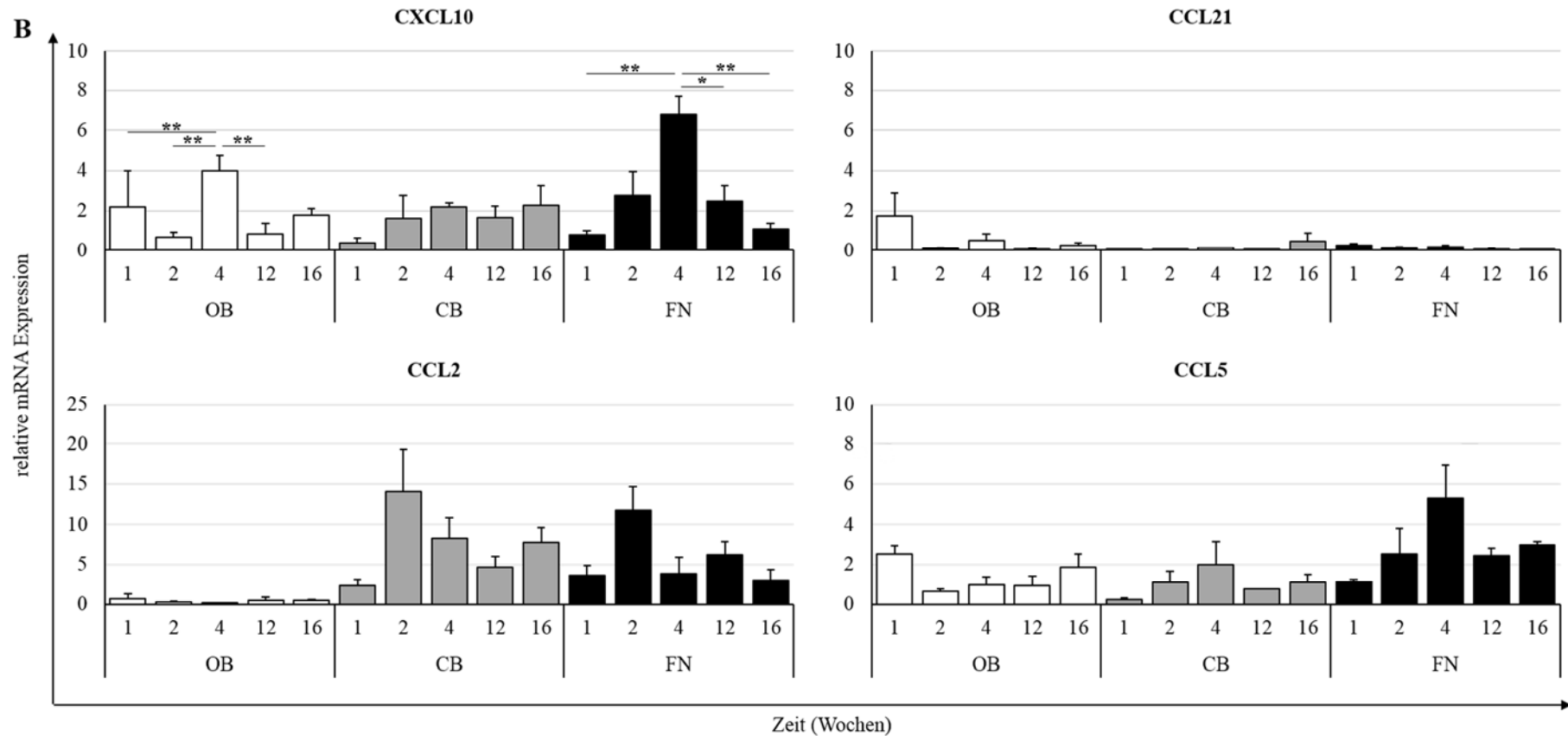


Abbildung 22 Genexpressionsprofile ausgewählter Chemokine im Gehirn nach HI.

A) Übersicht über den experimentellen Versuchsverlauf; **B)** qRT-PCR von CXCL10, CCL21, CCL2 und CCL5 im Bulbus olfactorius (OB, weiße Balken), Cerebellum (CB, graue Balken) und Hirnstamm mit Fazialiskernen (FN, schwarze Balken) 1, 2, 4, 12 und 16 Wochen nach Kopfbestrahlung (HI 11 Gy). Die mRNA-Expressionslevel wurden gegen GAPDH normalisiert und sind als Induktionswerte gegenüber unbestrahlten Tieren als $MW \pm SEM$ aufgezeigt. $n=3-4$. * $p<0,05$; ** $p<0,01$ (One-way ANOVA mit dem Bonferroni Posthoc-Test)



Es zeigte sich eine Bestrahlungs-induzierte Hochregulation der Genexpression von CXCL10, CCL2 und CCL5 (Abbildung 22B) sowie von CXCL4, TNF- α , ICAM-1, VCAM-1, P-Selektin und Itgb3 (Anhang 9-11) in einigen der untersuchten Gehirnregionen nach Kopfbestrahlung gegenüber unbestrahlten Tieren. Dabei ist auffällig, dass im Hirnstamm (in der Region der Fazialiskerne) vier Wochen nach HI die Genexpression von u.a. CXCL10, CCL5, VCAM-1, ICAM-1 und Itgb3 ansteigt und 12 Wochen nach HI bereits wieder stark reduziert war (Abbildung 22B, Anhang 9 und 11). Ein ähnliches Bild zeigte sich im Bulbus olfactorius für die Expression von CXCL10 und ICAM-1 (Abbildung 22B, Anhang 9). Dagegen konnte vier Wochen nach HI im Hirnstamm reduzierte mRNA-Expressionslevel von CCL2, CXCL4 und TNF- α gegenüber den Analysezeitpunkten zwei und 12 Wochen nach Konditionierung gemessen werden (Abbildung 22B, Anhang 10). Einige untersuchte Zytokine und Chemokine (CCL21, E-Selektin, CD40, IL-10 und IL-1 β) zeigten keine Bestrahlungs-induzierten Genexpressionsunterschiede in den untersuchten Gehirnregionen und Zeitpunkten (Abbildung 22B, Anhang 9-11).

Die Induktion der Genexpression von CCL2, CXCL10, CCL5 und TNF- α nach Kopfbestrahlung war im Vergleich zu ganzkörperbestrahlten Mäusen im Gehirn reduziert. Dazu wurden HI bzw. TBI Tiere nach Bestrahlung mit 11 Gy mit 2×10^7 Knochenmarkzellen transplantiert und die Genexpression im gesamten Gehirn mittels qRT-PCR analysiert (Abbildung 23A). Vor allem die Induktion der CXCL10 und CCL2 mRNAs war 2 bzw. 4 Wochen nach Knochenmarkstransplantation in den kopfbestrahlten Mäusen signifikant reduziert gegenüber den ganzkörperbestrahlten Tieren, ebenso wie die Genexpression von CCL5 und TNF-alpha (Abbildung 23B).

A

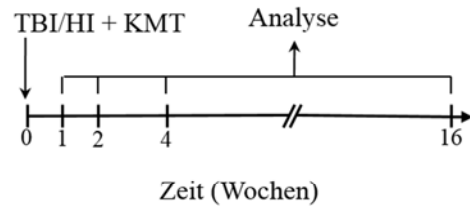
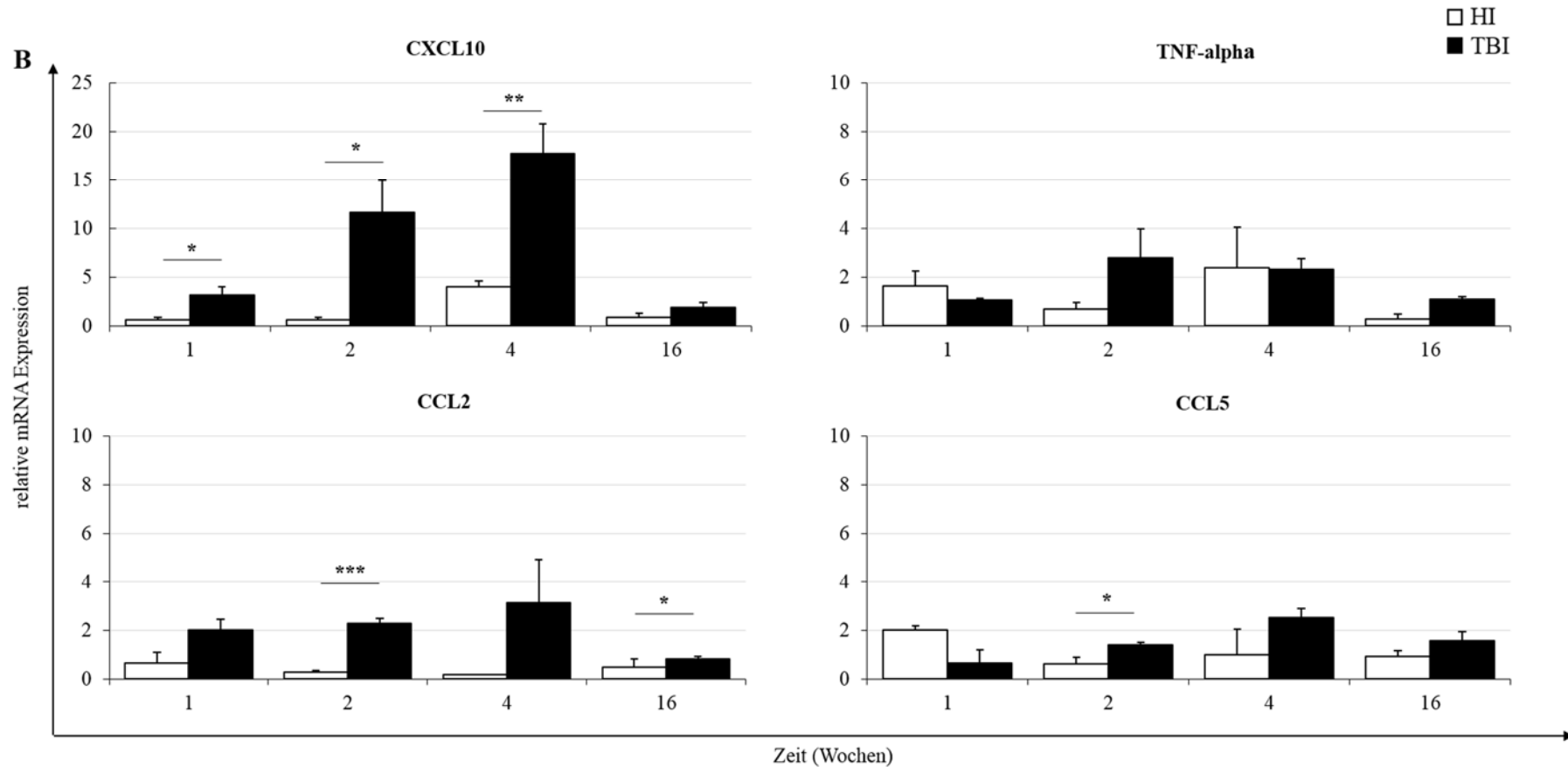


Abbildung 23 Genexpressionsprofile ausgewählter Zytokine/Chemokine im Gehirn nach HI bzw. TBI. **A)** Übersicht über den experimentellen Versuchsverlauf; **B)** qRT-PCR von CXCL10, TNF-alpha, CCL2 und CCL5 im Gehirn 1, 2, 4 und 16 Wochen nach Kopf- (HI 11 Gy; weiße Balken) bzw. Ganzkörperbestrahlung (TBI 11 Gy; schwarze Balken). Die mRNA-Expressionslevel wurden gegen GAPDH normalisiert und sind als Induktionswerte gegenüber unbestrahlten Tieren als MW ± SEM aufgezeigt. Die HI-Daten wurden von Dr. Chotima Böttcher generiert. n=3-5. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 (t-Test)

B



Daher wurde als nächstes überprüft, ob die reduzierte Zytokininduktion nach HI für die Rekrutierung von Knochenmarkzellen ins ZNS ausreichend ist. Dazu wurden Knochenmarkzellen aus β -Actin EGFP Mäusen (siehe 5.6.5) adoptiv in TBI (11 Gy) bzw. HI (11 Gy) C57/BL6 Tiere transferiert und die Chimären 1, 2, 4, 12 bzw. 16 Wochen nach Bestrahlung auf die Einwanderung der GFP⁺-Zellen ins Gehirn hin untersucht (Abbildung 24A). Bis 12 Wochen nach Knochenmarktransplantation konnten keine GFP⁺ Donorzellen in den Gehirnen der HI Tiere gefunden werden (nicht dargestellt). Erst 16 Wochen nach Bestrahlung waren GFP⁺ Donorzellen im Kortex der HI Mäuse sichtbar (Abbildung 24D), deren Anzahl signifikant reduziert gegenüber TBI Tieren war (HI: $5 \pm 1/\text{mm}^2$, TBI: $25 \pm 1/\text{mm}^2$, Abbildung 24C). Die TBI Mäuse zeigten dagegen ramifizierte GFP⁺ Donorzellen in allen untersuchten Gehirnregionen und zu allen Untersuchungszeitpunkten (Abbildung 24D). Die Chimerismusrate im peripheren Blut von HI Mäusen war 16 Wochen nach Knochenmarktransplantation signifikant reduziert gegenüber TBI Tieren (HI: $3 \pm 0,3\%$, TBI: $97 \pm 0,6\%$; Abbildung 24B).

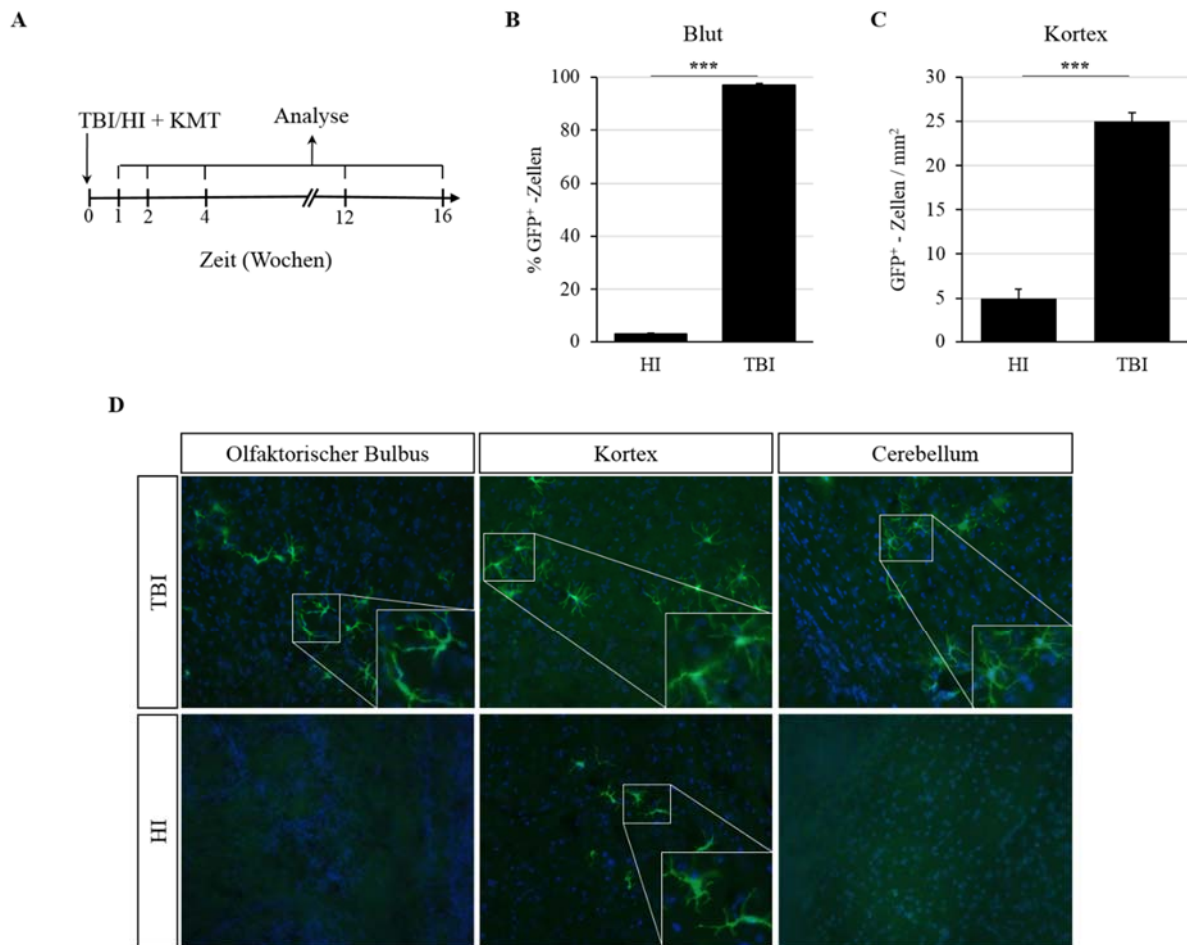


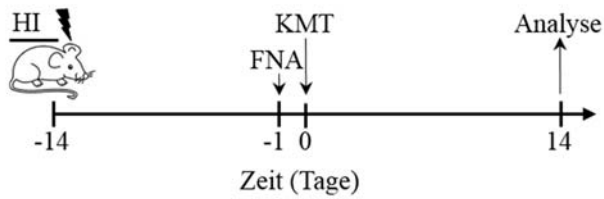
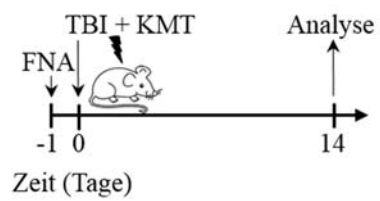
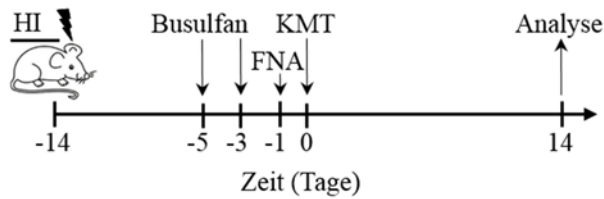
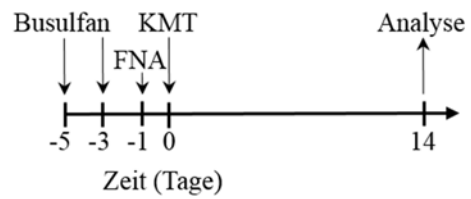
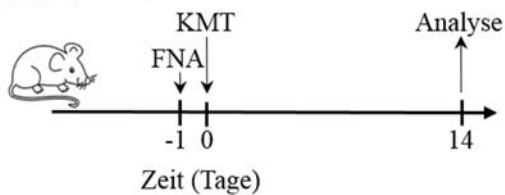
Abbildung 24 Einwanderung Knochenmark-abgeleiteter GFP⁺ Zellen ins Gehirn 16 Wochen nach HI/TBI (11 Gy). **A**) Übersicht über den experimentellen Versuchsverlauf; **B**) Durchflusszytometrische Analyse der GFP-Expression in den peripheren CD45⁺ Blutleukozyten; **C**) Quantifizierung GFP⁺ Zellen im Kortex von HI- und TBI Tieren 16 Wochen nach Knochenmarktransplantation. **D**) Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen repräsentativer histologischer Gehirnschnitte zeigen nur im Kortex von kopfbestrahlten (HI) Tieren eingewanderte GFP⁺ Zellen 16 Wochen nach Bestrahlung und Knochenmarktransplantation (KMT), während bei ganzkörperbestrahlten (TBI) Mäusen im Bulbus Olfactorius, Kortex und Cerebellum Donor-abgeleitete Zellen zu finden sind (400x Vergrößerung). n=5. MW ± SEM; ***p<0,001 (t-Test).

Schädigungen im ZNS führen zu einer schnelleren Einwanderung myeloider Zellen ins ZNS.^[82,94,95] Daher sollte im Läsionsmodell der FNA, bei dem die Funktion der Blut-Hirn-Schranke nicht beeinträchtigt wird, untersucht werden, ob eine beschleunigte Rekrutierung im Vergleich zur alleinigen HI erreicht werden kann. Der kontralaterale unbeschädigte Fazialiskern in den Tieren diente jeweils als Kontrolle.

Einige potenzielle Vorläufer der Gehirnmakrophagen zeigen keine Selbsterneuerungskapazität und weisen im Blutkreislauf eine kurze Lebenszeit auf. Daher erfolgte die FNA einen Tag vor der Knochenmarktransplantation (KMT; Abbildung 25).

Um den Zeitpunkt der höchsten Zytokinexpression nach Bestrahlung (vergleiche dazu Abbildung 22B und 23B, Anhang 9-11) abzugleichen, wurden die Tiere 14 Tage vor der KMT bestrahlt und die Analyse der Einwanderung myeloider Donorzellen erfolgte 14 Tage nach Transplantation, also vier Wochen nach Bestrahlung (Abbildung 25).

Das Chemotherapeutikum Busulfan kann ebenfalls zur ZNS-Konditionierung eingesetzt werden, was mit einer reduzierten ZNS-Inflammation einhergeht.^[60] Daher wurde Busulfan in Kombination mit einer Kopfbestrahlung (HI + Busulfan, Abbildung 25C) oder als alleinige Konditionierung (Busulfan, Abbildung 25D) für die Einwanderung von Knochenmarkzellen ins Gehirn getestet. Als Kontrollen dienten unbestrahlte (Abbildung 25E) sowie ganzkörperbestrahlte Tiere (TBI, Abbildung 25B). Bei der HI genauso wie bei der TBI wurden jeweils die subletale Strahlendosis von 3 Gy sowie die letale Dosis von 11 Gy getestet. Anschließend wurden den C57BL/6 Mäusen 2×10^7 unsortierte Knochenmarkzellen aus β -Actin EGFP Mäusen intravenös transplantiert. Ab dem Tag der FNA erhielten die Tiere täglich Rapamycin zur Vermeidung einer Abstoßungsreaktion.

A: HI + FNA**B: TBI + FNA****C: HI + Busulfan + FNA****D: Busulfan + FNA****E: unbestrahlt + FNA****Abbildung 25 Schema der experimentellen Konditionierungsprotokolle.**

Die Kopf- (HI; **A** und **C**) sowie die Ganzkörperbestrahlung (TBI; **B**) erfolgten mit 3 bzw. 11 Gy. Die Busulfangabe von jeweils 25mg/kg Körpergewicht erfolgte an Tag -5 und -3 (**C** und **D**). Unbestrahlte Tiere dienten als Kontrollen (**E**). Alle Versuchsgruppen erhielten ab dem Tag der FNA bis zum Analysezeitpunkt täglich Rapamycin (3mg/kg/Tag i.p.). HI: Kopfbestrahlung; TBI: Ganzkörperbestrahlung; FNA: Fazialisnerv-Axotomie; KMT: Knochenmarktransplantation

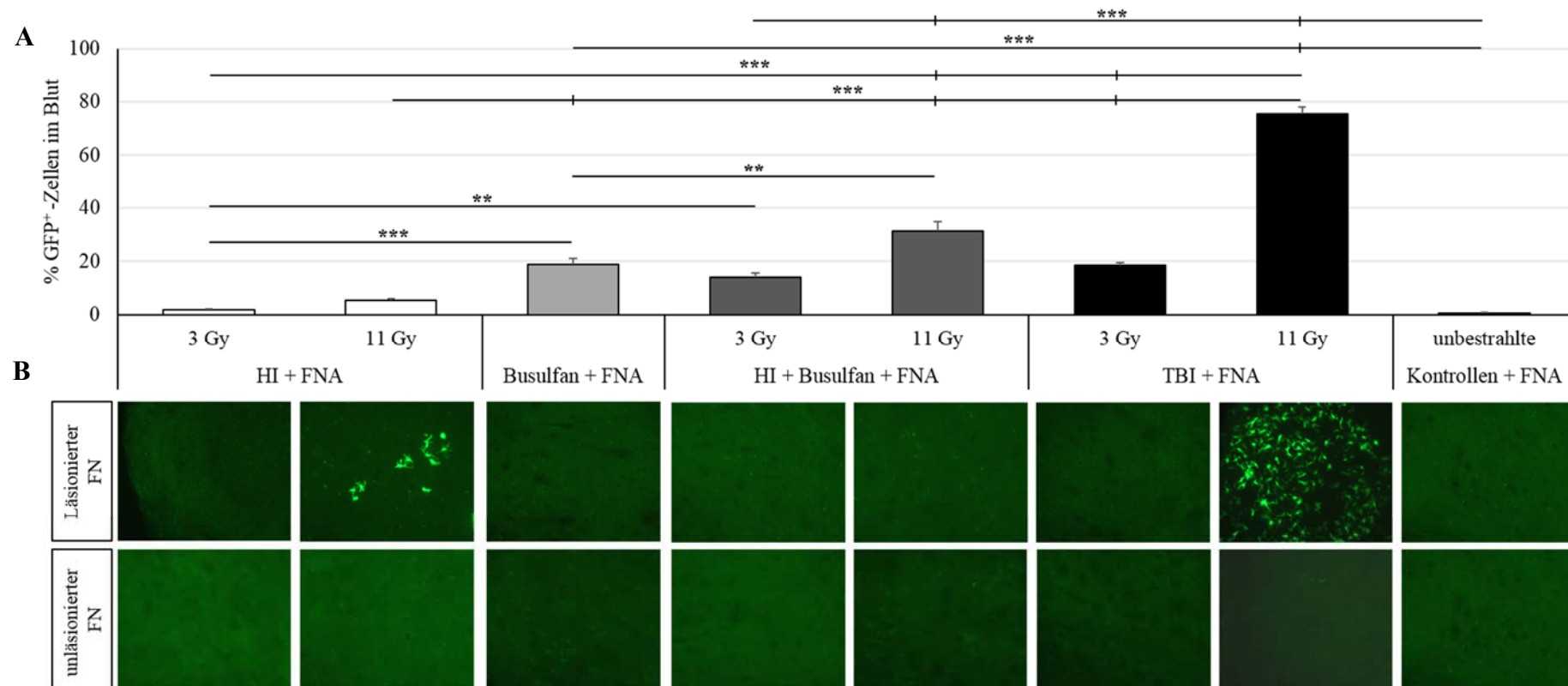


Abbildung 26 Konditionierungsabhängige, selektive Einwanderung Knochenmark-abgeleiteter Zellen ins Gehirn. A) Durchflusszytometrische Analyse der GFP-Expression in den peripheren Blutleukozyten. B) Repräsentative histologische Schnitte zeigen die selektive Einwanderung GFP⁺ Donor-Knochenmarkszellen in den läsierten, aber nicht in den unläsionierten Faziliskern von mit 11 Gy bestrahlte HI- und TBI Mäuse 15 Tage nach FNA (400x Vergrößerung). n=5. MW ± SEM; signifikant **p<0,01; ***p<0,001 (One-way ANOVA mit dem Bonferroni Posthoc-Test)

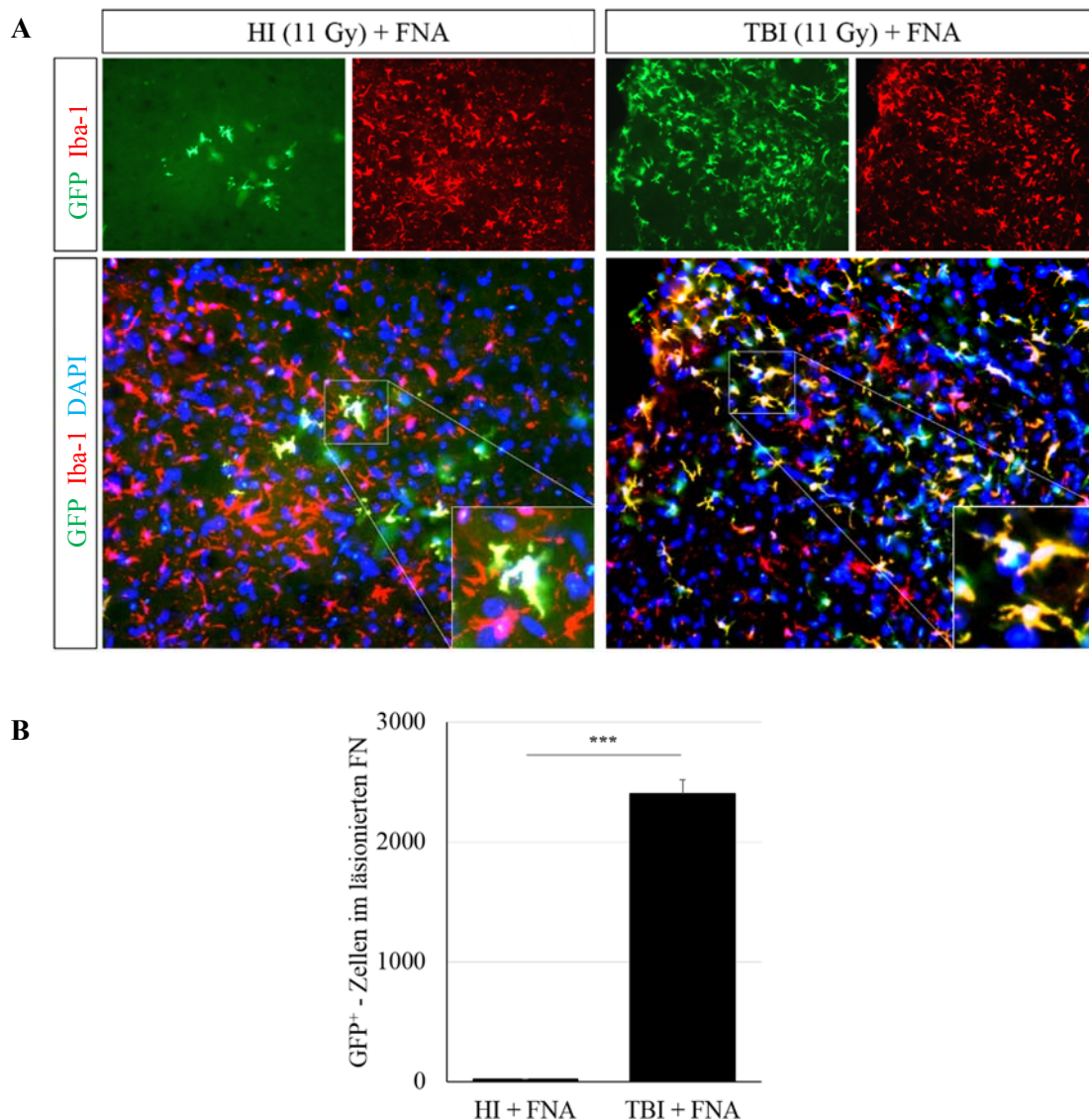


Abbildung 27 Einwanderung myeloider Zellen aus dem Knochenmark in den läsierten Fazialiskern nach TBI bzw. HI (11 Gy) + FNA und KMT. A) Repräsentative histologische Schnitte zeigen die selektive Einwanderung GFP⁺ Donor-abgeleiteter Zellen in den läsierten Fazialiskern von mit 11 Gy bestrahlten HI- bzw. TBI Mäusen (400x Vergrößerung) und deren myeloiden Charakter. **B)** Quantifizierung Knochenmark-abgeleiteter Zellen in HI (11 Gy) + FNA und TBI (11 Gy) + FNA Mäusen. n=10. MW ± SEM; ***p<0,001 (t-test)

Die Kopfbestrahlung führte zu einer geringeren Blutchimerismusrate verglichen mit den Busulfankonditionierungen (HI 11 Gy + FNA: $5 \pm 0,4\%$ vs. Busulfan + FNA: $19 \pm 2\%$ vs. HI 11 Gy + Busulfan + FNA: $31 \pm 3\%$; Abbildung 26A), was auf den myelotoxischen Effekt von Busulfan zurückzuführen ist. Auch die sublethalen Strahlendosen von 3 Gy resultierten in viel geringeren Blutchimerismusraten verglichen mit der letalen Strahlendosis von 11 Gy, sowohl bei HI als auch bei TBI Tieren (HI 3 Gy + FNA: $2 \pm 0,3\%$ vs. HI 11 Gy + FNA: $5 \pm 0,4\%$,

HI 3 Gy + Busulfan + FNA: $14 \pm 2\%$ vs. HI 11 Gy + Busulfan + FNA: $31 \pm 3\%$, TBI 3 Gy + FNA: $18 \pm 0,9\%$ vs. TBI 11 Gy + FNA: $76 \pm 0,1\%$; Abbildung 26A). Zusätzlich konnten nur in den mit 11 Gy bestrahlten HI- (ohne Busulfanbehandlung) und TBI Mäusen eingewanderte GFP⁺-Zellen im läsionierten Fazialiskern nach FNA gefunden werden (Abbildung 26B). Die quantitative Analyse zeigte dabei eine signifikant reduzierte Anzahl eingewanderter Knochenmarkzellen ins Gehirn kopfbestrahlter Tiere im Vergleich zu ganzkörperbestrahlten Mäusen (HI: 20 ± 3 , TBI: 2402 ± 117 ; Abbildung 27B). Diese Einwanderung der GFP⁺-Zellen beschränkte sich dabei vier Wochen nach Bestrahlung auf den läsionierten Fazialiskern. Im restlichen Gehirn waren keine Donor-abgeleiteten Zellen zu diesem Untersuchungszeitpunkt detektierbar. In den Schnitten des läsionierten Fazialiskerns zeigte sich bereits zwei Wochen nach Transplantation, dass der Großteil der eingewanderten GFP⁺-Zellen stark ramifiziert und immunreaktiv für den Mikroglia/ Makrophagen Marker Iba-1 war (Abbildung 27A). Im Gegensatz dazu fanden sich in den unläsionierten Fazialiskernen zwei Wochen nach Knochenmarktransplantation keine eingewanderten GFP⁺-Zellen (Abbildung 26B).

Diese Ergebnisse zeigen die Notwendigkeit der Konditionierung für die Einwanderung myeloider Zellen ins ZNS und verdeutlichen, dass der Blutchimerismus nicht mit der ZNS-Rekrutierung korrelierte. So waren trotz hoher Blutchimerismusraten keine Donor-GFP⁺-Zellen im läsionierten Fazialiskern von Busulfan + FNA- bzw. HI 11 Gy + Busulfan + FNA behandelten Mäusen zwei Wochen nach Knochenmarktransplantation detektierbar (Abbildung 26). Zusätzlich zeigte sich, dass die FNA keinen Einfluss auf den Blutchimerismus hat (HI 11 Gy: $3 \pm 0,3\%$, Abbildung 24B vs. HI 11 Gy + FNA + täglich Rapamycin: $5 \pm 0,4\%$, Abbildung 26A).

Die HI in Kombination mit der FNA führte jedoch zu einer signifikant höheren Induktion der Genexpression von CCL21 und CXCL10 gegenüber der alleinigen HI (Abbildung 28B). Dazu wurde zwei Wochen nach Knochenmarktransplantation die Induktion der entsprechenden mRNAs im Fazialiskern in HI- bzw. HI + FNA Tieren mittels quantitativer Real-Time PCR untersucht. Frühere Publikationen wiesen bereits darauf hin, dass die Induktion der Zytokine CCL2 und CXCL10 für die myeloide Zellrekrutierung von Bedeutung ist.^[60,84] In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen zeigte sich in Busulfan-behandelten Mäusen zwei Wochen nach FNA und Knochenmarktransplantation keine Induktion von CCL2, CCL21 und

CXCL10 mRNAs im läsierten Fazialiskern (Abbildung 28B) und auch keine Einwanderung von GFP⁺ Donorzellen (Abbildung 26B).

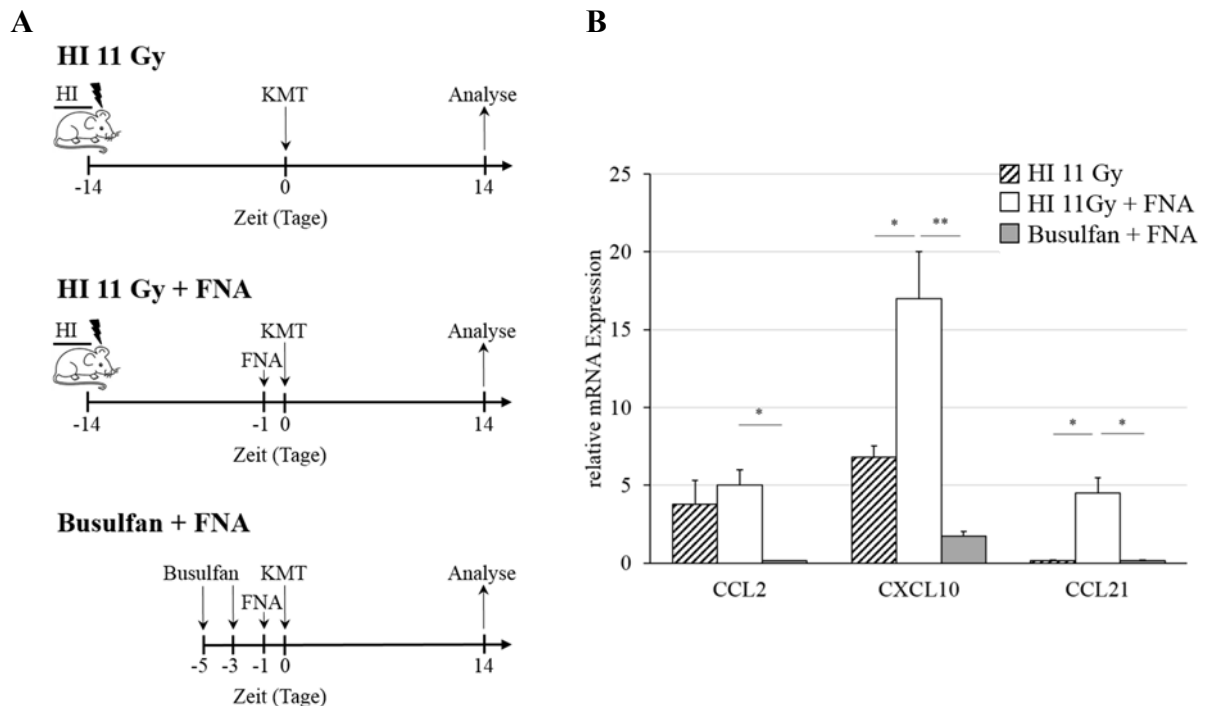


Abbildung 28 Zytokinexpression im Hirnstamm mit Fazialiskernen nach HI, HI + FNA und Busulfan + FNA. **A)** Übersicht über den experimentellen Versuchsverlauf; **B)** qRT-PCR von CXCL10, CCL21 und CCL2 in HI (gestreifte Balken), HI + FNA (weiße Balken) und Busulfan + FNA (graue Balken) konditionierte Tiere zwei Wochen nach Knochenmarktransplantation (KMT). Die mRNA-Expressionslevel wurden gegen GAPDH normalisiert und sind als Induktionswerte gegenüber unbestrahlten Tieren aufgezeigt. n=3; MW ± SEM. *p<0,05; **p<0,01 (One-way ANOVA mit dem Bonferroni Posthoc-Test).

Über 90% der GFP⁺ Zellen im peripheren Blut der HI + FNA, Busulfan + FNA, HI + Busulfan + FNA und TBI Chimären waren CD11b⁺ (Abbildung 29A). Unter diesen myeloiden Zellen stellten die Ly6G⁺-Neutrophilen (CD45⁺CD11b⁺Ly6C^{int}CD115⁻Ly6G⁺) und die Ly6C^{hi}-Monozyten (CD45⁺CD11b⁺Ly6C^{hi}CD115⁺) den größten Anteil dar. Zwischen den untersuchten Konditionierungen gab es jedoch keine signifikanten Unterschiede in der Zusammensetzung der vom Donor abstammenden myeloiden Zellen im Blut (Abbildung 29B).

GFP⁺ HSCs als Vorläufer von Ly6C⁺-Neutrophilen bzw. Ly6C^{hi}-Monozyten konnten im peripheren Blut der Chimären zwei Wochen nach Knochenmarktransplantation nur zu einem sehr geringen Anteil (unter 1% der GFP⁺-Zellen) gefunden werden (Abbildung 29A).

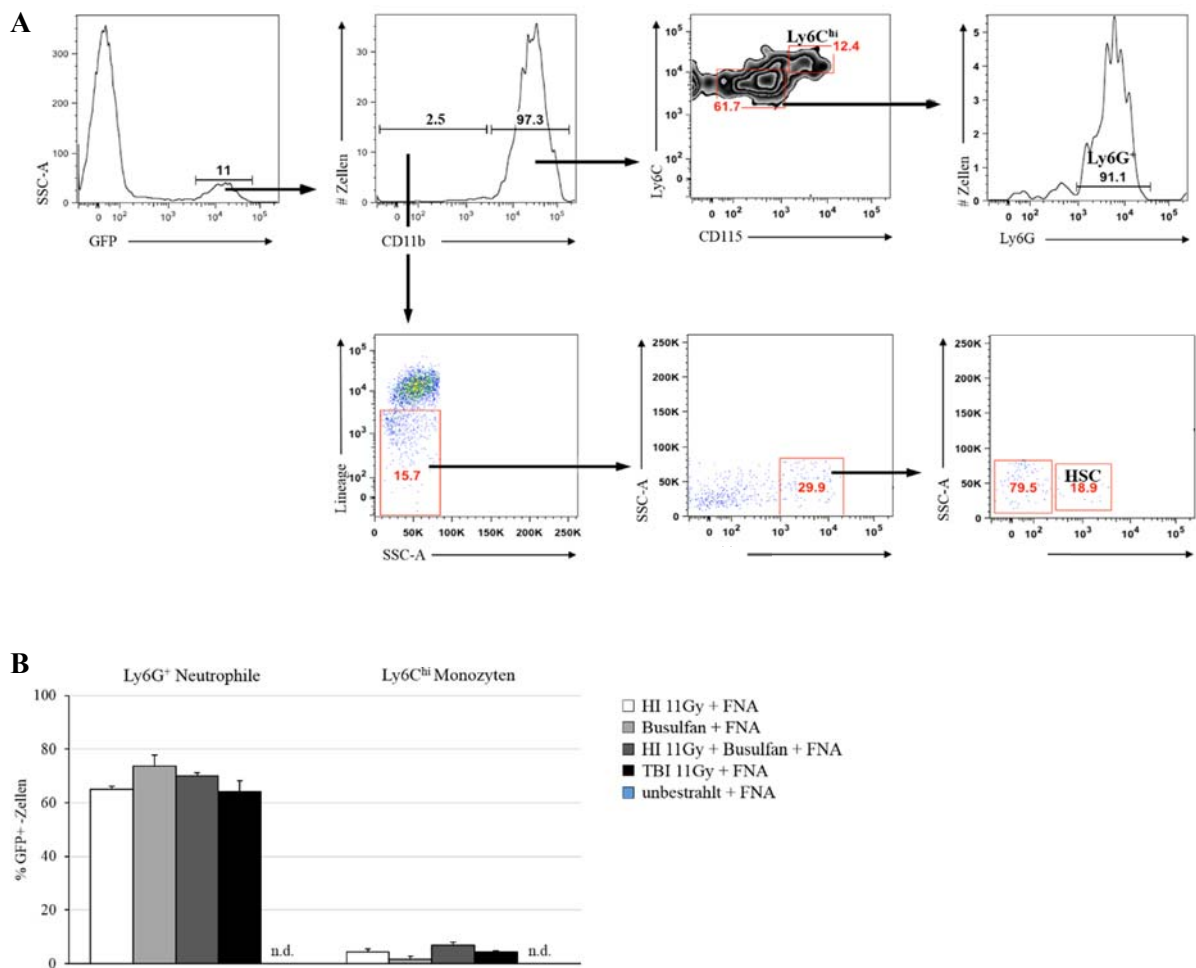


Abbildung 29 Charakterisierung und Quantifizierung GFP-exprimierender Zellen im peripheren Blut von HI-, Busulfan-, TBI- und unbestrahlten Mäusen nach FNA. A) Gatingstrategie für die durchflusszytometrische Bestimmung der GFP-exprimierenden Zellen im peripheren Blut zwei Wochen nach Knochenmarktransplantation. Tote Zellen und Dupletten wurden zuvor ausgegattet und nur die CD45-exprimierenden Zellen untersucht. **B)** Im CD11b⁺-Zellkompartiment exprimieren hauptsächlich Ly6G⁺-Neutrophilen (CD45⁺CD11b⁺Ly6C^{int}CD115⁻Ly6G⁺) und Ly6C^{hi}-Monozyten (CD45⁺CD11b⁺Ly6C^{hi}CD115⁺) GFP. GFP-exprimierende Monozyten oder Neutrophile wurden in unbestrahlten Rezipienten nach FNA nicht detektiert (n.d.). n=3-5. MW ± SEM; nicht signifikant (One-way ANOVA mit dem Bonferroni Posthoc-Test).

6.3 Rolle von CXCR3 bei der Migration von myeloiden Zellen aus dem Knochenmark ins ZNS

Chemokine und ihre Rezeptoren spielen eine entscheidende Rolle bei der Rekrutierung von myeloiden Zellen in Zielorgane. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Expression von CXCL10 mRNA vier Wochen nach HI im Hirnstamm signifikant induziert wird (Abbildung 22B und 28B). Zudem zeigte sich keine Induktion von CXCL10 mRNA in Busulfan-behandelten Tieren, in denen auch keine Rekrutierung von Knochenmarkzellen ins Gehirn detektiert werden konnte (Abbildung 28 B und 26B). Daher sollte die Rolle von CXCR3, dem Rezeptor von CXCL10, bei der Migration von Knochenmarkzellen ins Gehirn untersucht werden. Dazu wurden die Knochenmarkzellen von 5-FU-behandelten Donormäusen retroviral GFP markiert (siehe 5.2.3) und anschließend adoptiv in ganzkörperbestrahlte Rezipienten transferiert (Abbildung 30A). Es wurden verschiedene Chimären generiert, wobei jeweils Knochenmark aus Wildtyp- (WT) oder CXCR3-Knockout (KO) Mäusen in WT bzw. CXCR3-KO Tiere transferiert wurde. Die retroviralen GFP-Transduktionsraten der KM-Zellen wurden durchflusszytometrisch analysiert und lagen bei durchschnittlich 62% (WT) bzw. 64% (CXCR3-KO) (Abbildung 8). Da die GFP-Transduktionsraten zwischen den Genotypen ähnlich waren und um die Zellen durch eine durchflusszytometrische Sortierung nicht noch weiter zu stressen, wurden jeweils 5×10^6 retroviral transduzierte Gesamtknochenmarkzellen pro Empfängertier transplantiert.

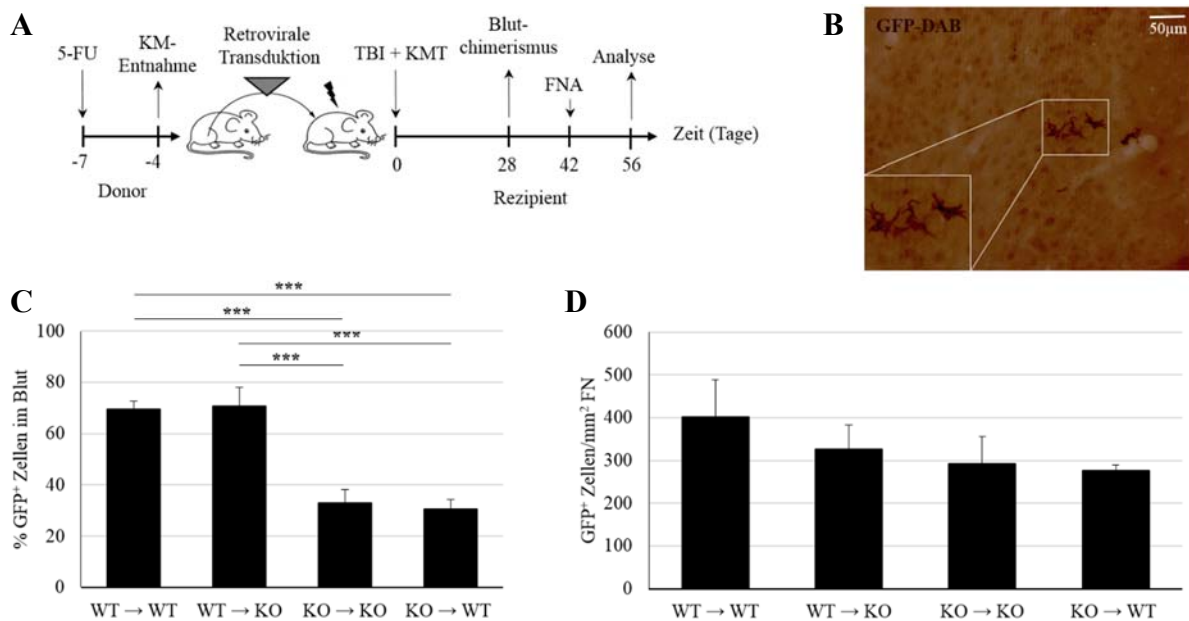


Abbildung 30 Einwanderung KM-abgeleiteter, retroviral transduzierter Zellen ins Gehirn von CXCR3-Chimäre. **A)** Experimentelles Versuchsprotokoll; **B)** Repräsentativer histologischer Schnitt zeigt die Einwanderung retroviral mit GFP transduzierter KM-abgeleiteter Zellen ins Gehirn von TBI Mäusen; visualisiert durch eine GFP-DAB-Färbung (400x Vergrößerung). **C)** Durchflusszytometrische Analyse des Blutchimerismus vier Wochen nach TBI (11Gy) und Knochenmarktransplantation (KMT). **D)** Quantifizierung eingewanderter GFP⁺-Zellen in den läsierten Fazialiskern zwei Wochen nach FNA und acht Wochen nach TBI + KMT. n=4-5. MW ± SEM; ***p<0,001 (One-way Anova mit dem Bonferroni Posthoc-Test). WT: C57/BL6 Mäuse; KO: CXCR3-KO Mäuse.

Vier Wochen nach TBI und Knochenmarktransplantation wurde der Blutchimerismus der Tiere durchflusszytometrisch analysiert. Dabei zeigte sich, dass der Knockout von CXCR3 in den transplantierten Zellen zu einer signifikant geringeren Anzahl GFP⁺ Zellen im peripheren Blut der Rezipienten führte. Der Knockout von CXCR3 in den Rezipienten hatte dagegen keinen Einfluss auf die Blutchimerismusrate (Abbildung 30C).

Acht Wochen nach Bestrahlung und Knochenmarktransplantation wurden die Tiere auf die Einwanderung von Zellen aus dem Donorknochenmark ins Gehirn untersucht (Abbildung 30A). Dabei konnte kein signifikanter Unterschied in der Anzahl eingewanderter GFP⁺-Zellen im läsierten Fazialiskern zwei Wochen nach FNA zwischen CXCR3-KO und WT-Rezipienten festgestellt werden, wenngleich der Knockout von CXCR3 im Donor-Knochenmark eine Tendenz zu geringerer Migration in den läsierten Fazialiskern gegenüber dem WT-KM Zellen zeigte (Abbildung 30D). Zur besseren stereologischen Quantifizierung wurden die Schnitte der Fazialiskerne GFP-DAB gefärbt. Dabei zeigten sich im

mikroskopischen Bild des läsierten Fazialiskerns GFP⁺-Zellen mit verzweigten Zellausläufern (Abbildung 30B). In den unläsierten Fazialiskernen konnten erwartungsgemäß keine GFP-markierten Zellen aus dem Donorknochenmark detektiert werden (nicht dargestellt).

Anschließend wurde überprüft, in welchen Organen und von welchen Zellen CXCR3 in naiven Tieren exprimiert wird. Dabei zeigte sich im Durchflusszytometer eine CXCR3-Expression in Knochenmark, Blut, Milz und Lymphknoten mit einem Anteil von 2-9% an den Leukozyten (Abbildung 31). Dagegen konnte im Gehirn bereits in naiven WT Tieren ein hoher Anteil CXCR3-exprimierender Zellen gemessen werden (Abbildung 31A). Eine CXCR3-Expression in myeloiden Zellen konnte in keinem der untersuchten Organe gefunden werden (Abbildung 31B). Auch eine Expression von CXCR3 auf HSCs genauso wie auf Ly6C^{hi}-Monozyten oder Ly6G⁺-Granulozyten konnte weder im Knochenmark (Anhang 12B) noch in den anderen Organen (nicht dargestellt) detektiert werden. Stattdessen begrenzte sich die CXCR3-Expression auf das CD11b⁻ Zellkompartiment (Abbildung 31B). So konnten u.a. CXCR3⁺ CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten in naiven Wildtyp-Mäusen gefunden werden (Anhang 12A). In CXCR3-KO Mäusen war durchflusszytometrisch erwartungsgemäß keine CXCR3-Expression nachweisbar (Abbildung 31A).

Nach Kopfbestrahlung und FNA (Konditionierungsprotokoll siehe Abbildung 25A) konnte im läsierten Fazialiskern von WT Tieren die Expression des CXCR3-Liganden CXCL10 nachgewiesen werden. Dabei zeigte sich, dass CXCL10 von Neuronen (Anhang 13A), jedoch nicht von Iba-1⁺ Gehirnmakrophagen (Anhang 13B) oder GFAP⁺ Astrozyten (Anhang 13C) exprimiert wird.

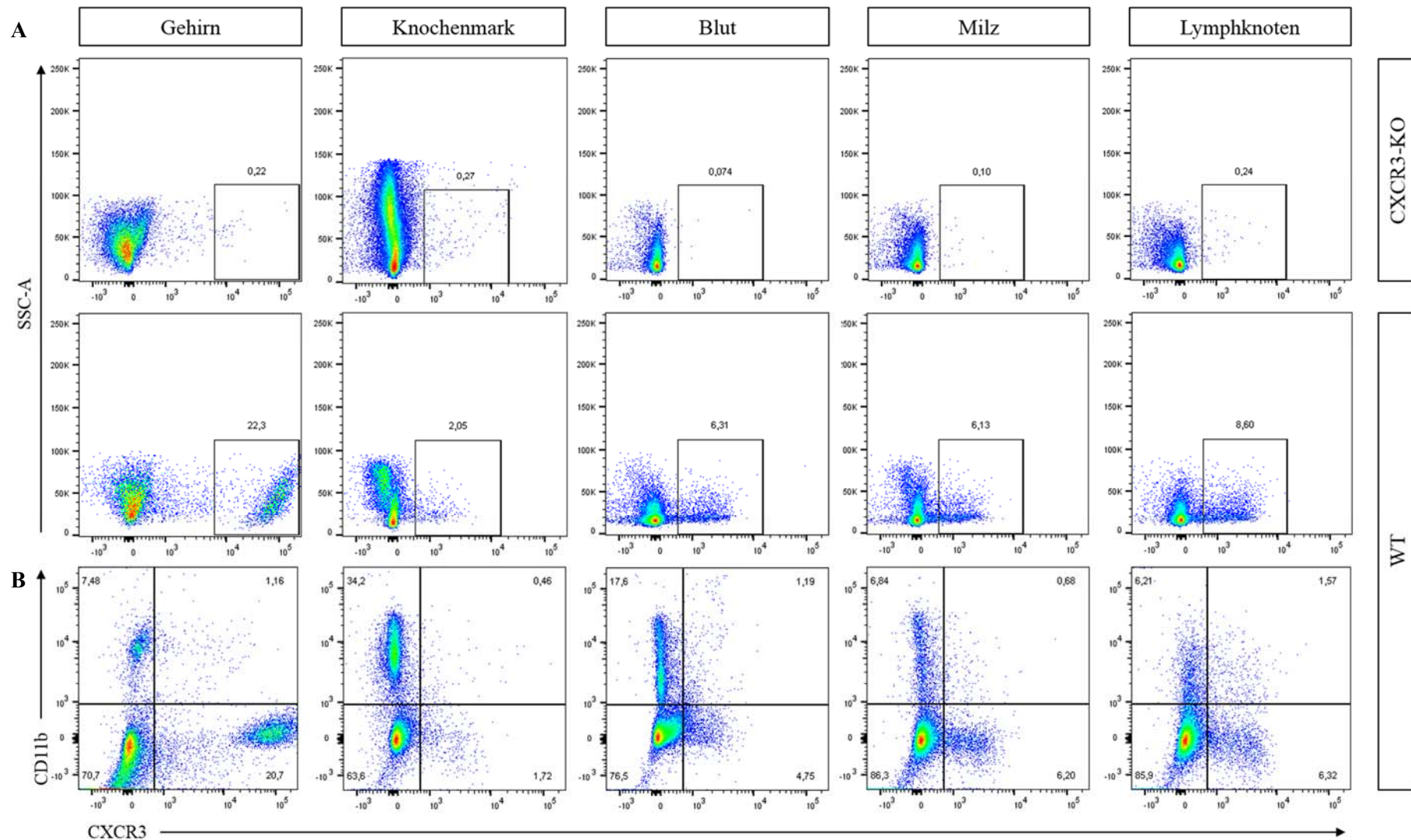


Abbildung 31 Durchflusszytometrische Analyse der CXCR3-Expression im Gehirn, Knochenmark, Blut, Milz und Lymphknoten von C57/BL6 (WT) bzw. CXCR3-KO Tieren (A). Myeloide Zellen von naiven WT Tieren exprimieren kein CXCR3 in den untersuchten Organen (B).

7 Diskussion

Bei ZNS-Erkrankungen spielt die Aktivierung von Mikroglia im ZNS sowie die Rekrutierung von peripheren Immunzellen zum Entzündungsort eine entscheidende Rolle. Der Transkriptionsfaktor NF- κ B stellt bei Entzündungsprozessen ein Schüsselement dar, da er von allen Immunzellen exprimiert wird und Einfluss auf multiple physiologische Vorgänge, u.a. auf die Differenzierung, Proliferation und das Überleben von Immunzellen, hat.^[219,220]

Die Aktivierung des adaptiven Immunsystems und die Induktion Myelin-spezifischer autoreaktiver T-Zellen ist für die Induktion der EAE entscheidend.^[171] Inwieweit NF- κ B in myeloiden Zellen für diese T-Zellaktivierung oder Effektorfunktion bei der Neuroinflammation involviert ist, ist derzeit noch nicht hinreichend untersucht. Daher sollte in der vorliegenden Dissertation die Rolle des kanonischen NF- κ B Signalweges in myeloiden Zellen auf die T-Zellfunktion im Tiermodell der Multiplen Sklerose untersucht werden. Dazu wurden Mäuse mit einer myeloid-spezifischen Deletion der I κ B Kinase IKK2 (IKK2^{mye}) verwendet. Die funktionelle Unterbrechung des NF- κ B Signalweges beruhte dabei auf dem Fehlen der Kinase IKK2, wodurch keine vollständige Phosphorylierung und anschließende Degradierung von I κ B erfolgte. Dadurch liegen die NF- κ B Dimere weiterhin in einem Komplex mit den I κ Bs vor und können so nicht in den Zellkern translozieren (Anhang 2), um ihre Funktion als Transkriptionsfaktor auszuführen.^[221,232-234] Die Makrophagen in diesen Mäusen weisen daher reduzierte NF- κ B-regulierte Zytokine auf.^[251,266,269] Gleichzeitig war die Expression von *Ikk2* auf Protein- und mRNA-Ebene in primären Mikroglia und peritonealen Makrophagen signifikant reduziert (Anhang 1). Dabei zeigten sich vergleichbare Werte zu denen in der Literatur, wo eine Deletionseffizienz von über 80% in Makrophagen beschrieben wurde.^[243,244] Diese Ergebnisse spiegeln jedoch nur die Situation *in vitro* wieder. So konnte in naiven adulten Tieren gezeigt werden, dass die Deletionseffizienz in Mikroglia von LysMCre^{tdRFP} Reporter-mäusen stark reduziert ist gegenüber den kultivierten Mikroglia (Abbildung 13), was mit den Ergebnissen von Cho et al. und Greten et al. in Einklang steht.^[270,271] Im Gegensatz zu den Mikroglia wiesen perivaskuläre Monozyten und Granulozyten (CD45^{hi}CD11b⁺) im ZNS höhere tdRFP-Expressionsraten auf (Abbildung 13). Die höchste tdRFP-Expression zeigten Granulozyten mit 69-94% im Blut, Milz, Knochenmark und ZNS (Anhang 3). Ähnliche Daten wurden bereits 1999 von Clausen et al. publiziert. Diese beschrieben eine Gr1⁺ Population mit annähernd 100% Deletionseffizienz im LysMCre-System.^[243] Gr1 ist jedoch ebenfalls auf mehreren Zellen der myeloiden Linie, u.a. plasmazytoide dendritische Zellen (PDCs), CCR2⁺ inflammatorische Monozyten und MDSCs (*myeloid-derived suppressor cells*) exprimiert.^{[15,272-}

^{274]} Unter Verwendung der spezifischen Zellmarker Ly6C und Ly6G war es möglich, die tdRFP-Expression in Neutrophilen (definiert als $CD45^{hi}CD11b^{+}Ly6C^{int}Ly6G^{+}$) sowie Monozyten (definiert als $CD45^{hi}CD11b^{+}Ly6C^{hi}Ly6G^{-}$) zu untersuchen. Dabei zeigten sich mit 26-34% viel geringere Cre-Rekombinationsraten im Knochenmark und ZNS als in der Literatur beschrieben (Anhang 3).^[243,244] Es ist wahrscheinlich, dass die tdRFP-Expression vor allem in PDCs und MDSCs vorkommt, die wir unter Verwendung von Ly6C und Ly6G nicht untersucht haben, in den Daten von Clausen et al. als Gr1-exprimierende Populationen jedoch mit erfasst sind.^[243]

Durch Klonieren des *Cre*-Gens in den *LysM*-Lokus ist *LysM* in homozygoten *LysMCre* Mäusen deletiert. In naiven Tieren führt dieser Verlust zur Hochregulation vom murinen *LysP*, welches die Lysozymaktivität größtenteils kompensiert.^[275,276] Unter inflammatorischen Bedingungen wird jedoch die geringere antimikrobielle Aktivität des Lysozym P in Form einer höheren Anfälligkeit von *LysM*-Deletionsmutanten gegenüber bakteriellen Infektionen deutlich.^[245,275,277] Daher musste auch unter inflammatorischen Bedingungen untersucht werden, ob die Cre-Rekombination möglicherweise beeinflusst wird. Überraschenderweise zeigte sich in fast allen untersuchten Geweben und Zellkompartimenten eine Herabregulation der *LysM*-Expression in den myeloiden Zellen ($CD45^{+}CD11b^{+}$) der homo- und heterozygoten *LysM^{tdRFP}* Reportertiere nach EAE-Induktion gegenüber naiven Tieren (Abbildung 14, Anhang 4). Gleichzeitig konnte sowohl unter inflammatorischen Bedingungen, als auch in naiven Tieren, ein zum Teil signifikanter Unterschied zwischen homo- und heterozygoten Tieren detektiert werden (Abbildung 13 und 14, Anhang 3 und 4), der auf einen Gen-Dosis-Effekt hindeutet. Arakin et al. konnten diese Korrelation zwischen Rekombinationseffizienz und der Promotoraktivität von Cre-Expressionsvektoren bereits publizieren.^[278]

Im nicht-myeloiden Zellkompartiment ($CD45^{+}CD11b^{-}$), welches u.a. die B- und T-Lymphozyten enthält, konnte kein signifikanter Unterschied in der Frequenz tdRFP-exprimierender Zellen nach EAE-Induktion im Vergleich zu naiven Tieren detektiert werden (Abbildung 14). Gleichzeitig zeigte sich eine allgemein sehr geringe tdRFP Expression in $CD45^{+}CD11b^{-}$ Zellen (Abbildung 13 und 14), was bei der Verwendung des *LysMCre*-Systems berücksichtigt werden muss. So ist es für die Untersuchung von Lymphozyten und bestimmten Subpopulationen dendritischer Zellen ungeeignet. Dennoch widerlegen unsere Daten bisherige Publikationen, nach denen es in B- und T-Zellen zu keiner Cre-vermittelten Deletion in *LysMCre* Tieren kommt.^[243,244] Ye et al. zeigten erstmals, dass das *LysMCre*-System nicht

spezifisch für myeloide Zellen ist, sondern dass es zu einem geringen Maß auch in hämatopoetischen Stammzellen, T- und B-Lymphozyten zur Expression vom Lysozym M kommt.^[279] Übereinstimmend mit diesen Daten konnte eine tdRFP-Expression von unter 20% in nicht-myeloiden Zellen sowohl in naiven, als auch EAE-induzierten LysM^{tdRFP} Reportertieren nachgewiesen werden (Abbildung 13 und 14).

Mikroglia (definiert als CD45^{dim} CD11b⁺) zeigten im Vergleich zu den anderen untersuchten Zellpopulationen eine erhöhte LysM-Expression unter inflammatorischen Bedingungen (Abbildung 14). Jedoch ist diese mit 15% (in naiven Tieren) bis 25% (in EAE-Tieren) sehr gering, was in LysMCre transgenen Tieren jedoch ausreicht, um Mikroglia-assoziierte Krankheitsprozesse zu beeinflussen, wie bereits in der Literatur beschrieben.^[51] So konnte gezeigt werden, dass eine myeloid-spezifische Cre-Expression in LoxSOD1^{G37R} Tieren die Krankheitsprogression der Amyotrophen Lateralsklerose verlangsamt und zu einem verlängerten Überleben der Tiere führt.^[51]

Das LysMCre-System kann mit den genannten Einschränkungen als Modell zur Untersuchung der Rolle von IKK2 in Monozyten und Makrophagen sowie Neutrophilen bei neuroinflammatorischen Erkrankungen verwendet werden. Jedoch muss dabei berücksichtigt werden, dass auch nicht-myeloide Zellen eine geringe LysM-Expression aufweisen und damit die Cre-Rekombination in diesen Zellen zur Deletion von IKK2 führt, was Auswirkungen auf die Krankheitsprogression haben kann. Zusätzlich ist die LysM-Expression unter inflammatorischen Bedingungen in den myeloiden Zellen, ausgenommen Mikroglia, herabreguliert, was Auswirkung auf die Cre-Rekombinationseffizienz hat.

7.1 Einfluss der IKK2 Deletion auf den klinischen Verlauf der EAE und Meningitis

Die Relevanz des NF- κ B Signalweges bei der Entwicklung von Autoimmunerkrankungen wurde bereits mehrfach verdeutlicht. Im EAE-Modell weisen p50- genauso wie c-Rel-defiziente Mäuse eine herabgesetzte Inzidenz und geringere klinische Scores sowie eine geringere ZNS-Inflammation auf.^[280,281] Dabei zeigte sich, dass die NF- κ B Aktivierung für die Initiierung der Neuroinflammation verantwortlich ist, indem sie die Th1-Antwort oder Th2-Zelldifferenzierung reguliert.^[280,281] Ebenso führt die T-Zell-spezifische Deletion von IKK2 zu

einer verringerten Expansion autoreaktiver T-Zellen, wodurch die Tiere ebenfalls eine Resistenz gegenüber MOG₃₅₋₅₅-induzierter EAE zeigten.^[282] Loo et al. publizierten, dass die ZNS-spezifische NF- κ B Inhibition durch Ablation von NEMO oder IKK2 in Nicht-Mikroglia-Zellen zu einer Reduzierung des inflammatorischen Milieus und damit zu einem milderen Krankheitsverlauf der EAE führt.^[283] Im Einklang mit diesen Ergebnissen konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die LysM-vermittelte spezifische Deletion von IKK2, vor allem in den homozygoten Tieren, zu einer reduzierten Inzidenz sowie signifikant geringeren klinischen Scores bei der EAE führt (Abbildung 15). Im Gegensatz dazu wiesen einige wenige homozygote Deletionsmutanten ähnliche klinische EAE-Verläufe wie die Tiere in den Kontrollgruppen auf (Abbildung 15C), was auf Variabilität in der Transgenexpression hinweisen könnte.

Unsere Ergebnisse lassen darauf schließen, dass in den konditionalen Knockout-Tieren (IKK2^{mye}) die NF- κ B abhängige Aktivierung von T-Zellen in der Peripherie während der Induktionsphase der EAE beeinträchtigt ist und somit die Entzündungskaskade nicht weiter in Gang gesetzt wird. Diese Vermutung wird auch durch vergleichbare Immunezellinfiltrate und Demyelinisierungen im Rückenmark von erkrankten IKK2^{mye}- und Kontrolltieren unterstützt (Abbildung 16). Das Migrationsverhalten der Leukozyten im Parenchym erkrankter Tiere scheint somit zwischen den untersuchten Gruppen unverändert zu sein. Bei homozygoten IKK2-Deletionsmutanten ohne erkennbaren EAE-Symptome wurden histomorphologisch keine Immunezellinfiltrate oder Demyelinisierungen sichtbar (Abbildung 16). Dieser Befund könnte darauf hinweisen, dass ein gewisser Schwellenwert in der Induktionsphase der EAE überschritten werden muss, damit es zum Ausbruch der Erkrankung kommt, die dann einen zu den Kontrollgruppen vergleichbaren klinischen Verlauf nimmt. So wurde bei einigen IKK2^{mye} Tieren gleiche Schweregrade der EAE wie in den Kontrollgruppen detektiert. Zudem zeigten heterozygote Deletionsmutanten (IKK2^{mye/wt}) vergleichbare mittlere klinische Scores sowie *Area under the Curves* (AUC) wie die Kontrolltiere (IKK2^{wt} und LysM^{ko}; Abbildung 15). Die Ursache für das Erreichen dieses Schwellenwertes für die T-Zellaktivierung liegt möglicherweise in der variablen Effizienz der IKK2-Deletion innerhalb der einzelnen Individuen. So wurde mit Hilfe der Reporteranalyse bereits gezeigt, dass die LysM-Expression gewissen Schwankungen unterliegt (Abbildung 13 und 14, Anhang 3 und 4). Die LysM^{ko} Mäuse wiesen den gleichen klinischen EAE-Verlauf wie die IKK2^{wt} Tiere auf (Abbildung 15), weshalb ein Einfluss der LysM-Deletion auf die inflammatorischen Prozesse während der EAE ausgeschlossen werden kann. Dieses Ergebnis wurde auch in den CerTN L15LysM^{tdRFP}

Reportertieren unter inflammatorischen Bedingungen (EAE) bestätigt (Anhang 5). Zudem gibt es in der Literatur keine Hinweise auf einen LysM-abhängigen Phänotyp.^[244,245]

Die myeloid-spezifische Deletion von IKK2 scheint also Einfluss auf das T-Zell-Priming zu haben. Um die Fähigkeit der myelin-spezifischen T-Zellen zur Differenzierung in Effektor-T-Zellen in der Peripherie zu überprüfen, wurde die Funktionalität der Blutleukozyten im Hinblick auf ihre Zytokinproduktion hin überprüft. Dabei zeigte sich, dass die Sekretion der Zytokine IL-17, IL-10 und IL-1 β in den IKK2^{mye} Mäusen in der Remissionsphase der EAE reduziert gegenüber den Kontrolltieren ist (Abbildung 17). Aufgrund der geringen Anzahl an untersuchten Tieren und den hohen Schwankungen innerhalb des Testverfahrens, fielen diese Ergebnisse jedoch nicht signifikant aus. Hilliard et al. konnten zeigen, dass die Deletion von NF- κ B1 bzw. c-Rel mit einer verminderten Th1- (IL-2, IFN- γ) und/oder Th2- (IL-4, IL-10) Zytokinproduktion einhergeht. Daraus resultiert eine verminderte Aktivierung und Differenzierung autoreaktiver T-Zellen, was den Verlauf der EAE-Erkrankung in diesen Tiermodellen milderte.^[280,281] Ähnliche Resultate zeigten sich auch in T-Zell-spezifischen IKK2-Deletionsmutanten, die zusätzlich eine Reduktion von IL-17-produzierenden Zellen nach *ex vivo* Stimulation aufzeigten.^[282] In Einklang mit diesen Daten konnte in den untersuchten myeloid-spezifischen IKK2-Deletionsmutanten eine verminderte Produktion von IL-17 und TNF- α nach *ex vivo* Stimulation von Milzzellen aus immunisierten IKK2^{mye} Tieren mit anti-CD3/anti-CD28, detektiert werden (Anhang 6).

Das von Th17-Zellen sekretierte proinflammatorische Zytokin IL-17 ist für ein verbessertes T-Zell-Priming verantwortlich. Es stimuliert u.a. Endothelzellen, Fibroblasten und Makrophagen zur Produktion verschiedener proinflammatorischer Zytokine, wie IL-6, TNF- α und IL-1.^[284,285] IL-6 ist zusammen mit IL-23 und TGF- β für die Entstehung von Th17-Zellen verantwortlich. Die Konzentration dieser Zytokine wurde im Rahmen der Dissertation nicht weiter untersucht. Den Th17-Zellen kommt, wie bereits erläutert, eine entscheidende Rolle bei der EAE-Pathogenese zu.^[214-216]

Zusätzlich zeigte sich eine Tendenz zur erhöhten IFN- γ Sekretion in Milzzellen der IKK2^{mye} Mäuse nach anti-CD3/anti-CD28 Stimulation (Anhang 6). Dem von Th1-Zellen sekretierten Zytokin IFN- γ kommt eine entscheidende Rolle bei der Regulation der Th2-Genexpression zu. So inhibiert es u.a. die Differenzierung von Th2-Zellen. Zusätzlich bewirkt IFN- γ eine gesteigerte Expression von MHCII-Molekülen auf Makrophagen, was die Antigenpräsentation und damit die T-Zell Aktivierung begünstigt.^[31,33,34,286] Jedoch konnte bereits von mehreren

Forschergruppen gezeigt werden, dass die genetische Ablation von IFN- γ oder seines Rezeptors zu keinem protektiven Effekt gegenüber der EAE, sondern sogar zu einem schwereren klinischen Verlauf in den Tieren führte.^[214,287,288] Dadurch lässt sich die Relevanz der IFN- γ vermittelten Th1-Immunantwort bei der EAE in Frage stellen. Gleichzeitig unterstützen diese Daten die bereits erwähnte entscheidende Rolle der Th17-Zellen bei der Pathogenese der EAE. So konnten im ZNS von EAE-Tieren erhöhte Mengen an IL-17⁺IFN- γ ⁺ Th-Zellen gefunden werden, die Makrophagen aktivieren und damit die Erkrankung unabhängig von Th1-Zellen induzieren konnten.^[289] Darüber hinaus gibt es Hinweise auf eine kombinierte IL-17–IFN- γ Immunreaktion bei der Rekrutierung von T-Zellen, Makrophagen und Neutrophilen.^[290] So führt die Neutralisation von IL-17 oder IFN- γ zur gesteigerten Expression des jeweils anderen Zytokins, zum Teil einhergehend mit einer gesteigerten Pathogenese.^[291-293]

Aufgrund des Versuchsaufbaus war es nur möglich die Zytokinproduktion und Restimulationsfähigkeit der Leukozyten in der Remissionsphase der EAE zu untersuchen. Dies hatte den Vorteil, dass bei der IKK2^{mye} Gruppe zwischen Tieren, die klinische EAE-Symptome aufwiesen, und solchen, die resistent gegenüber EAE waren, unterschieden werden konnte. Jedoch kann so nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass die myeloid-spezifische Deletion von IKK2 zusätzlich einen Einfluss auf die Effektorphase der EAE hat. Dem widersprechen jedoch die histologischen Befunde von unveränderten Immunzellinfiltraten und Demyelinisierungen in den erkrankten IKK2^{mye} Tieren (Abbildung 16). Zusätzlich konnte in passiven EAE-Experimenten vergleichbare klinische Verläufer der EAE in den IKK2^{mye} Mäusen und Kontrolltieren gefunden werden (Abbildung 19). Dazu wurden *in vitro* generierte Myelin-reaktive Th17-Zellen aus C57BL/6 2d2 tdRFP Tieren in IKK2^{mye}- oder IKK^{wt} Knochenmarkchimäre appliziert und damit die T-Zell-Priming Phase umgangen, wodurch vergleichbare EAE-Inzidenzen, klinische Scores und ZNS-Immunzellinfiltrate in den IKK2-defizienten und Kontrolltieren erkennbar waren. Greve et al. publizierten ähnliche Resultate in T-Zell-spezifischen IKK2-deletierten Tieren, welche eine Resistenz gegenüber MOG₃₅₋₅₅-induzierter EAE zeigten.^[282] Die transgene Expression des MOG₃₅₋₅₅ spezifischen T-Zellrezeptors (2d2) führte in diesen Tieren zu einem vergleichbaren klinischen EAE-Verlauf wie in den Wildtyp Tieren. Daraus schlossen sie, dass IKK2 bei der Induktion der EAE eine entscheidende Rolle durch Kontrolle der Expansion autoreaktiver T-Zellen spielt.^[282]

Zur genauen Beurteilung der Funktionalität der Blutleukozyten und der Immunreaktion während der Induktionsphase wäre die *ex vivo* Stimulation mit MOG₃₅₋₅₅ Peptid zur Induktion

einer antigen-spezifischen T-Zell Reaktivierung, bzw. mit anti-CD3/anti-CD28 zur Induktion einer breiten T-Lymphozytenaktivierung, an Tag 7-10 nach Immunisierung der Tiere hilfreich.

Im Tiermodell der Meningitis stellen Makrophagen und Granulozyten die Haupt-Effektorzellen dar.^[157,161,162] Sie werden direkt über TLR2 aktiviert, ohne zusätzliche Beteiligung von T-Zellen. In Einklang mit diesen Befunden zeigten Mäuse mit einer myeloid-spezifischen IKK2-Deletion keine Unterschiede im klinischen Verlauf der Meningitis im Vergleich zu den der Kontrollgruppen. Dabei wurden u.a. die Pleozytose im CSF und die Apoptose neuronaler Zellen untersucht (Abbildung 20).

Der unveränderte klinische Verlauf und die vergleichbare Zellmigration ins ZNS im Tiermodell der Meningitis sowie in der passiven EAE bestätigen die Hypothese, dass die NF- κ B-Aktivierung in myeloiden Zellen für das Priming von T-Zellen, jedoch nicht für die myeloide Effektorfunktion und Migration entscheidend ist.

7.2 Etablierung einer nicht-myeloablativen Konditionierung für die Einwanderung von Knochenmarkzellen in das Gehirn

Die aus dem Dottersack stammenden residenten Mikroglia spielen als Haupteffektorzellen bei nahezu allen Erkrankungen des ZNS eine entscheidende Rolle, indem die lokale angeborene Immunreaktion vermitteln. Ontogenetisch stellen sie eine eigenständige Makrophagenpopulation dar, die im adulten Organismus nicht von hämatopoetischen Vorläuferzellen oder zirkulierenden Monozyten ersetzt wird, was auch Versuche in parabiotischen Mäusen belegten.^[13,65,70-72] Eines der größten Hindernisse für die erfolgreiche Therapie neurologischer Erkrankungen stellt damit der limitierte Zugang zum ZNS aufgrund der Blut-Hirn-Schranke dar. Jedoch zeigte sich in den letzten Jahren, dass bestrahlungsinduzierte Veränderungen im ZNS sowie die Transplantation von hämatopoetischen Stamm-/Vorläuferzellen zur myeloiden Zellrekrutierung ins Gehirn führen.^[65,72,84] Im Vergleich zu den CD45^{hi}-exprimierenden myeloiden Zellen des ZNS galten Mikroglia lange Zeit als strahlungsresistente Zellpopulation.^[84,294,295] Menzel et al. konnten jedoch zeigen, dass Mikroglia hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit gegenüber Bestrahlung eine heterogene Zellpopulation im Gehirn darstellen.^[296] Die strahlungsresistente Mikroglia-Population ist jedoch nicht in der Lage den bestrahlungsbedingten Schaden im Gehirn zu

kompensieren. Die Gesamtzahl der Mikroglia im Gehirn ist nach Bestrahlung reduziert. Anders als in Mikroglia-Depletionsexperimenten beschrieben, konnten Menzel et al. nach Ganzkörperbestrahlung keine Repopulation von Mikroglia aus internen Vorläufern im Gehirn detektieren.^[296,297,298]

Bei der myeloablativen Ganzkörperbestrahlung kommt es zur massiven ZNS-Entzündung und zur Zerstörung des hämatopoetischen Systems. Es konnten *Graft-versus-Host* (GvH)-Reaktionen, einhergehend mit einer gesteigerten Morbidität und Mortalität, beobachtet werden.^[254,299,300] Eine gezielte Kopfbestrahlung mit einer geringeren Gewebeerstörung, ähnlich wie die bereits von anderen Forschergruppen publizierten Knochen- bzw. Markbestrahlung, stellt daher eine Alternative zur Ganzkörperbestrahlung dar.^[254,255]

Es zeigte sich, dass die selektive Kopfbestrahlung mit einer Strahlendosis von 11 Gy die Rekrutierung von Knochenmarkzellen ins Gehirn ermöglicht. Dabei wiesen die HI Tiere eine geringere Chimerismusrate im peripheren Blut sowie eine verzögerte Einwanderung von Knochenmarkzellen ins Gehirn verglichen mit TBI Tieren auf (Abbildung 24). In den HI Tieren konnten erst 16 Wochen nach Transplantation GFP⁺-Donorzellen im Kortex gefunden werden, während sie bereits sieben Tage nach Transplantation in allen untersuchten Gehirnregionen der TBI Tiere zu finden waren (Abbildung 24D). Auch die Zahl ramifizierter GFP⁺-Zellen war gegenüber ganzkörperbestrahlten Tieren signifikant reduziert (Abbildung 24C).

Publizierte Daten geben Hinweise darauf, dass die Bestrahlung des ZNS die Regulation von Genen induziert, darunter Zytokine und Chemokine, die die Migration von Knochenmarkzellen ins ZNS steuern. So wurde u.a. eine Hochregulation der Genexpression von CXCL10, CCL2, CCL5 und TNF- α nach Bestrahlung im Gehirn publiziert.^[60,84,91,301] Im Gegensatz dazu zeigen Tiere, deren Kopf vor der Strahlung abgeschirmt war, keine Induktion der Genexpression der erwähnten Zytokine, einhergehend mit einer verhinderten Einwanderung transplanteder Zellen ins Gehirn.^[84] In Übereinstimmung mit diesen Daten konnte nach HI eine Induktion der Genexpression von CXCL10, CCL2, CCL5 und TNF- α sowie zusätzlich von CXCL4, ICAM-1, VCAM-1, P-Selektin und Itgb3 im Gehirn gegenüber unbestrahlten Mäusen detektiert werden (Abbildung 22B, Anhang 9-11). Dabei wurde vier Wochen nach Kopfbestrahlung die höchste mRNA Expression von CXCL10, CCL5, Itgb3, ICAM-1 und VCAM-1 im Hirnstamm (in der Region der Fazialiskerne) detektiert (Abbildung 22B, Anhang 9 und 11).

Unter pathologischen Prozessen erfolgt eine verstärkte Rekrutierung von Knochenmarkzellen ins ZNS und zwar bevorzugt an den Ort einer Inflammation, wie bereits in Mausmodellen der zerebralen Ischämie, der bakterieller Meningitis und der neuronalen Degenerationen gezeigt werden konnte.^[82,84,94,96] In Einklang mit diesen Daten wurde in HI Mäusen mit einer neuronalen Schädigung in Form einer Motoneurondegeneration nach FNA eine gesteigerte und beschleunigte Rekrutierung von Knochenmarkzellen detektiert. Dabei konnten bereits vier Wochen nach Bestrahlung GFP⁺-Zellen im läsierten Fazialiskern der HI (11 Gy) + FNA Tiere gefunden werden (Abbildung 26B). Die eingewanderten Zellen waren zwei Wochen nach FNA bereits stark ramifiziert und immunreaktiv für den Mikroglia/Makrophagenmarker Iba-1 (Abbildung 27A). Die FNA führte in HI Tieren zu einer erhöhten mRNA-Expression von CCL2, CXCL10 und CCL21 im Hirnstamm (Abbildung 28B), wodurch die gesteigerte Einwanderung von Knochenmarkzellen in den läsierten Fazialiskern in diesen Tieren erklärt werden kann. Jedoch konnten in den Tieren, die als alleinige Konditionierung einer FNA unterzogen wurden, keine GFP⁺ Knochenmarkzellen im peripheren Blut und im läsierten Fazialiskern gefunden werden^[302], was die publizierten Daten der Notwendigkeit einer bestrahlungsinduzierten Konditionierung des ZNS für die Rekrutierung myeloider Zellen stützt.^[77,84] Darüber hinaus konnten wir zeigen, dass eine hohe Strahlendosis für die Einwanderung von Knochenmarkzellen ins ZNS erforderlich ist. So führte die sublethale Strahlendosis von 3 Gy in TBI und HI Tieren zu einem geringeren Blutchimerismus als die erhöhte Dosis von 11 Gy (Abbildung 26A) und zu keiner Einwanderung von Knochenmarkzellen in den läsierten Fazialiskern (Abbildung 26B).

Dass die Einwanderung von Knochenmarkzellen ins konditionierte ZNS unabhängig vom peripheren Blutchimerismus ist zeigte sich zusätzlich bei Tieren, die mit Busulfan behandelt wurden. In diesen konnten trotz erhöhter Rate von GFP⁺-Zellen im Blut keine Zellen aus dem Donorknochenmark im läsierten Fazialiskern detektiert werden (Abbildung 26). Dieses Ergebnis deckt sich mit Daten von Lampron et al., die zusätzlich zeigten, dass Busulfan eine ähnlich effiziente Myeloablation wie bei der TBI induziert.^[89] Andere Forschergruppen konnten dagegen eine Rekrutierung von Knochenmarkzellen ins Gehirn nach Busulfanbehandlung publizierten, wenngleich deren Anzahl geringer als bei TBI war. Die Anzahl an transplantierten Zellen nach Konditionierung war mit 5×10^6 bis 2×10^7 unsortierten Knochenmarkzellen vergleichbar zum verwendeten Konditionierungsprotokoll in der vorliegenden Arbeit (Transplantation von 2×10^7 Knochenmarkzellen). Jedoch lag die

verwendete Busulfandosis mit 50mg/kg Körpergewicht unter der der anderen Gruppen, die zwischen 80-125mg/kg applizierten.^[60,91,303]

In den Gehirnen von Busulfan-behandelten Tieren wurde eine Induktion der Genexpression von CXCL10, CCL2, CCL3, CCL5, TNF- α und IL-1 beschrieben, die gegenüber der TBI signifikant reduziert war.^[60,91] Auch im Rahmen dieser Arbeit wurde eine signifikant reduzierte Expression von CCL2, CXCL10 und CCL21 im Gehirn Busulfan-behandelter Tieren gegenüber HI Mäusen detektiert (Abbildung 28B). Aus diesen Daten lässt sich auf eine mögliche Rolle der Zytokine CXCL10, CCL21 und CCL2 bei der Migration von Knochenmarkzellen in das ZNS schließen. Es gibt bereits publizierte Daten, die zeigen, dass CCR2, der Rezeptor von CCL2, für die Rekrutierung von Zellen aus dem Knochenmark ins Gehirn notwendig ist.^[21,84]

7.3 Rolle von CXCR3 bei der Migration von Knochenmarkzellen ins ZNS

Zhou et al. konnten zeigen, dass myeloide Zellen aus Wildtyp-Tieren in der Lage sind, das vaskuläre Remodelling nach einer Ligation der äußeren Halsschlagader in Chimären mit CXCR3-Knockout Hintergrund wiederherzustellen. Dabei konnten sie eine Expression von CXCR3 auf Makrophagen aus dem Knochenmark nachweisen, die die Adventitia infiltrieren. Der Rekrutierungsprozess zur Adventitia war dabei abhängig von CXCR3 und dessen Ligand CXCL10.^[304]

Wir konnten in CXCR3-KO-Knochenmarkchimären einen signifikant geringeren peripheren Blutchimärismus nachweisen als nach Transplantation von Wildtyp-Knochenmark (Abbildung 30C). Allerdings konnten wir keinen signifikanten Unterschied in der Anzahl GFP⁺-Zellen im läsierten Fazialiskern zwei Wochen nach FNA zwischen CXCR3-KO und WT Donorknochenmark feststellen (Abbildung 30D). Bei diesen Daten ist zu beachten, dass nur GFP⁺-Zellen im Fazialiskern gefärbt und quantifiziert wurden. Die retrovirale GFP-Transduktionsrate lag jedoch bei 62% in den WT- bzw. 64% in den CXCR3-KO Donor-Knochenmarkzellen, so dass die Anzahl eingewanderter GFP⁺-Zellen vermutlich entsprechend höher lag. Aus diesen Daten lässt sich schließen, dass CXCR3 nicht essentiell für die Migration von Knochenmarkzellen ins ZNS ist.

Rappert et al. konnten in Zellkulturexperimenten zeigen, dass CXCL10 und CCL21 chemotaktisch die Migration von CXCR3-exprimierenden Mikroglia steuern. Mikroglia aus CXCR3-Knockout Mäusen zeigten dagegen keine Chemotaxis gegenüber diesen

Chemokinen.^[132] Im Läsionsmodell der FNA konnte dieselbe Gruppe keine Unterschiede in der Morphologie und Dichte von Mikroglia im Gehirn von CXCR3-KO und WT-Mäusen finden. Dagegen konnte nach Läsion des entorhinalen Kortex in CXCR3-KO Tieren eine beeinträchtigte Migration von Mikroglia im Hippocampus beschrieben werden.^[144]

Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass CXCR3 nach Läsion eine Rolle bei der Migration, nicht jedoch bei der Proliferation von Mikroglia innerhalb des ZNS spielt. In unseren Untersuchungen konnte in den untersuchten lymphatischen Organen und im Blut naiver C57/BL6 Mäuse eine geringe Expression von CXCR3 detektiert werden (Abbildung 31A). Diese beschränkte sich jedoch aufs CD11b⁻ Zellkompartiment, vor allem auf CD4⁺- und CD8⁺ T-Lymphozyten (Anhang 12A). In myeloiden Zellen naiver Tiere konnten wir dagegen keine Expression von CXCR3 detektieren (Abbildung 31B). Aus der Literatur ist bisher nur eine CXCR3-Expression auf einem kleinen Prozentsatz humaner Blutmonozyten bekannt.^[136] Bei Patienten mit rheumatischer Arthritis und chronischer Inflammation wurde im peripheren Blut eine Zunahme an CXCR3⁺ Monozyten beschrieben.^[136,137] Im Gehirn konnten wir eine relativ zu peripheren Organen höhere CXCR3-Expression detektieren, die sich aber auf CD11b⁻-Zellen beschränkte (Abbildung 31A). In naiven Tieren konnten wir auf Mikroglia, die CD11b im Gehirn exprimieren, keine CXCR3-Expression nachweisen, was sich mit den Daten von Goldberg et al. deckt.^[130] Andere Publikationen konnten dagegen eine Expression von CXCR3 in Mikroglia, jedoch nur unter Kulturbedingungen zeigen.^[129,132,133] Inwieweit eine Expression von CXCR3 unter inflammatorischen Bedingungen hochreguliert wird, konnte im Rahmen der durchgeführten Versuche nicht erfasst werden. Jedoch ist eine solche Hochregulation der Genexpression wahrscheinlich, betrachtet man publizierte Daten aus aktivierten Mikroglia. So weisen zum Beispiel residente Mikroglia *in vivo* keine Expression des Dopaminrezeptors D2 auf, während in Kultur und bei *in vivo* aktivierten Mikroglia nach MCAO eine D2R-Expression nachgewiesen werden konnte.^[258]

Unter pathologischen Bedingungen wurde eine CXCL10-Expression von Astrozyten, Mikroglia und Neuronen im ZNS beschrieben, wobei die Publikationen dazu sehr widersprüchlich sind.^[144,305,306] In unserer Arbeit konnten wir nach HI + FNA eine CXCL10-Expression in Neuronen (Anhang 13A), jedoch nicht in Astrozyten oder Mikroglia nachweisen (Anhang 13B und C), was die Daten von Rappert et al. sowie Tanuma et al. bestätigt.^[144, 305,306]

Die im Rahmen dieser Arbeit etablierte nicht-myeloablative ZNS-Konditionierung ermöglicht es, einzelne Zellpopulationen zu transplantieren, um die Vorläuferzellen der Knochenmarkzellen zu identifizieren, die in das Gehirn einwandern. Eine vollständige Rekonstitution des hämatopoetischen Systems, wie etwa bei der Ganzkörperbestrahlung, ist bei der selektiven Kopfbestrahlung nicht erforderlich. Publikationen deuten darauf hin, dass zirkulierende CCR2-exprimierende Ly6C^{hi}-Monozyten in das bestrahlte Gehirn einwandern können.^[84] Neuere Daten zeigen jedoch, dass nur transplantierte Lin⁻c-kit⁺Sca-1⁺ multipotente Knochenmarkzellen in bestrahlten Mäusen zu einer stabilen Langzeit-Einwanderung myeloider Zellen im ZNS von EAE-Mäusen führen.^[71,77] Allerdings verbleiben hämatopoetische Stammzellen im Knochenmark und sind im peripheren Blut konditionierten Tiere kaum detektierbar.^[71,307] In Übereinstimmung mit diesen Daten konnten wir zeigen, dass im peripheren Blut der TBI bzw. HI Mäuse ebenso wie in den Busulfan-behandelten Tieren der Anteil GFP-exprimierender HSCs (Lin⁻CD11b⁻c-kit⁺Sca-1⁺) im peripheren Blut unter 1% lag (Abbildung 29A). Das etablierte neue Modell der nicht-myeloablativen Konditionierung ermöglicht es nun die Knochenmarkzellen zu identifizieren, die zur Rekrutierung ins ZNS fähig sind.

8 Literaturverzeichnis

1. Murphy KM, Travers P, Walport M (2012) Janeway Immunologie, 7. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag.
2. Mogensen TH (2009) Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clin Microbiol Rev.* 22: 240-273.
3. Zhao E, Xu H, Wang L, Kryczek I, Wu K, Hu Y, Wang G, Zou W (2012) Bone marrow and the control of immunity. *Cell Mol Immunol.* 9: 11-19.
4. Kreutzberg GW (1996) Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci.* 19:312-318.
5. Auffray C, Sieweke MH, Geissmann F (2009) Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu Rev Immunol.* 27: 669-692.
6. Ginhoux F, Jung S (2014) Monocytes and macrophages: development pathways and tissue homeostasis. *Nat Rev Immunol.* 14: 392-404.
7. Geissmann F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Merad M, Ley K (2010) Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science* 5: 656-661.
8. Akashi K, Traver D, Miyamoto T, Weissman IL (2000) A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* 404:193-197.
9. Auffray C, Fogg DK, Narni-Mancinelli E, Senecha B, Trouillet C, Saederup N, Leemput J, Bigot K, Campisi L, Abitbol M, Molina T, Charo I, Hume DA, Cumano A, Lauvau G, Geissmann F (2009) CX₃CR1⁺ CD115⁺ CD135⁺ common macrophage/DC precursors and the role of CX₃CR1 in their response to inflammation. *J Exp Med.* 206: 595-606.
10. Gabrilovich DI, Ostrand-Rosenberg S, Bronte V (2012) Coordinated regulation of myeloid cells by tumors. *Nat Rev Immunol.* 12: 253-268.
11. Gordon S, Taylor PR (2005) Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol.* 5: 953-964
12. Benakis C, Garcia-Bonilla L, Iadecola C, Anrather J (2015) The role of microglia and myeloid immune cells in acute cerebral ischemia. *Front Cell Neurosci.* 8: 461.
13. Kierdorf K, Erny D, Goldmann T, Sander V, Schulz C, Perdiguero EG, Wieghofer P, Heinrich A, Riemke P, Hölscher C, Müller DN, Luckow B, Brocker T, Debowski K, Fritz G, Opdenakker G, Diefenbach A, Biber K, Heikenwalder M, Geissmann F, Rosenbauer F, Prinz M. (2013) Microglia emerge from erythromyeloid precursors via Pu.1- and Irf8-dependent pathways. *Nat Neurosci.* 16: 273-280.
14. Liu K, Nussenzweig MC (2010) Origin and development of dendritic cells. *Immunol Rev.* 234: 45-54.
15. Geissmann F, Jung S, Littman DR (2003) Blood monocytes consist of two principle subsets with distinct migratory properties. *Immunity* 19: 71-82.

16. Sunderkötter C, Nikolic T, Dillon MJ, Van Rooijen N, Stehling M, Drevets DA, Leenen PJ (2004) Subpopulations of mouse blood monocytes differ in maturation and inflammatory response. *J Immunol.* 172: 4410-4417.
17. Grage-Griebenow E, Flad HD, Ernst M (2001) Heterogeneity of human peripheral blood monocyte subsets. *J Leukoc Biol.* 69: 11-20.
18. Boring L, Gosling J, Chensue SW, Kunkel SL, Farese RV Jr, Broxmeyer HE, Charo IF (1997) Impaired monocyte migration and reduced type 1 (Th1) cytokine responses in C-C chemokine receptor 2 knockout mice. *J Clin Invest.* 100: 2552-2561.
19. Lu B, Rutledge BJ, Gu L, Fiorillo J, Lukacs NW, Kunkel SL, North R, Gerard C, Rollins BJ (1998) Abnormalities in monocyte recruitment and cytokine expression in monocyte chemoattractant protein 1-deficient mice. *J Exp Med.* 187: 601-608.
20. Prinz M, Priller J (2010) Tickets to the brain: role of CCR2 and CX₃CR1 in myeloid cell entry in the CNS. *J Neuroimmunol.* 224: 80-84.
21. Serbina NV, Pamer EG (2006) Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. *Nat Immunol.* 7: 311-317.
22. Tsoi CL, Peters W, Si Y, Slaymaker S, Aslanian AM, Weisberg SP, Mack M, Charo IF (2007) Critical roles for CCR2 and MCP-3 in monocyte mobilization from bone marrow and recruitment to inflammatory sites. *J Clin Invest.* 117: 902-909.
23. Tacke F, Randolph GJ (2006) Migratory fate and differentiation of blood monocyte subsets. *Immunobiology* 211 :609-618.
24. Yrlid U, Jenkins CD, MacPherson GG (2006) Relationships between distinct blood monocyte subsets and migrating intestinal lymph dendritic cells in vivo under steady-state conditions. *J Immunol.* 176: 4155-4162.
25. Auffray C, Fogg D, Garfa M, Elain G, Join-Lambert O, Kayal S, Sarnacki S, Cumano A, Lauvau G, Geissmann F (2007) Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science* 317: 666-670.
26. Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S (2007) Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol.* 7: 678-689.
27. Ginhoux F, Tacke F, Angeli V, Bogunovic M, Loubreau M, Dai XM, Stanley ER, Randolph GJ, Merad M (2006) Langerhans cells arise from monocytes in vivo. *Nat Immunol.* 7: 265-273.
28. Jakubzick C, Tacke F, Ginhoux F, Wagers AJ, Van Rooijen N, Mack M, Merad M, Randolph GJ (2008) Blood monocyte subsets differentially give rise to CD103+ and CD103-pulmonary dendritic cell populations. *J Immunol.* 180: 3019-3027.
29. Landsman L, Varol C, Jung S (2007) Distinct differentiation potential of blood monocyte subsets in the lung. *J Immunol.* 178: 2000-2007.
30. Varol C, Landsman L, Fogg DK, Greenshtein L, Gildor B, Margalit R, Kalchenko V, Geissmann F, Jung S (2007) Monocytes give rise to mucosal, but not splenic, conventional dendritic cells. *J Exp Med.* 204:171-180.

31. Gordon S (2003) Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol.* 3: 23-35.
32. Martinez F, Sica A, Mantovani A, Locati M (2007) Macrophage activation and polarization. *Front Biosci.* 13: 453-461.
33. Biswas SK, Mantovani A (2010) Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat Immunol.* 11: 889-896.
34. Roca H, Varsos ZS, Sud S, Craig MJ, Ying C, Pienta KJ (2009) CCL2 and interleukin-6 promote survival of human CD11b+ peripheral blood mononuclear cells and induce M2-type macrophage polarization. *J Biol Chem.* 284: 34342-34354.
35. Sica A, Schioppa T, Mantovani A, Allavena P (2006) Tumour-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumour progression: potential targets of anti-cancer therapy. *Eur J Cancer* 42: 717-727.
36. Mantovani A, Biswas SK, Galdiero MR, Sica A, Locati M (2013) Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. *J Pathol.* 229: 176-185.
37. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M (2004) The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* 25: 677-686.
38. Verreck FA, de Boer T, Langenberg DM, Hoeve MA, Kramer M, Vaisberg E, Kastelein R, Kolk A, de Waal-Malefyt R, Ottenhoff TH (2004) Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10-producing type 2 macrophages subvert immunity to (myco)bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 4560-4565.
39. Kumar V, Sharma, A (2010) Neutrophils: Cinderella of innate immune system. *Int Immunopharmacol.* 10: 1325-1334.
40. Summers C, Rankin SM, Condliffe AM, Singh N, Peters AM, Chilvers ER (2010) Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends Immunol.* 31: 318-324.
41. Akuthota P, Wang HB, Spencer LA, Weller PF (2008) Immunoregulatory roles of eosinophils: a new look at a familiar cell. *Clin Exp Allergy* 38: 1254-1263.
42. Sullivan BM, Locksley RM (2009) Basophils: a nonredundant contributor to host immunity. *Immunity* 30: 12-20.
43. Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F (2005) Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* 308:1314-1318.
44. Streit WJ, Walter SA, Pennell NA (1999) Reactive microgliosis. *Prog Neurobiol.* 57: 563-581.
45. Tambuyzer BR, Ponsaerts P, Nouwen EJ (2009) Microglia: gatekeepers of central nervous system immunology. *J Leukoc Biol.* 85: 352-70.
46. Lambertsen KL, Clausen BH, Babcock AA, Gregersen R, Fenger C, Nielsen HH, Haugaard LS, Wirenfeldt M, Nielsen M, Dagnaes-Hansen F, Bluethmann H, Faergeman NJ, Meldgaard M, Deierborg T, Finsen B (2009) Microglia protect neurons against ischemia by synthesis of tumo necrosis factor. *J Neurosci.* 29: 1319-1330.

47. Neumann H, Kotter MR, Franklin RJ (2009) Debris clearance by microglia: an essential link between degeneration and regeneration. *Brain* 132: 288-295.
48. Banati RB, Gehrmann J, Schubert P, Kreutzberg GW (1993) Cytotoxicity of microglia. *Glia* 7: 111-118.
49. Chabot S, Williams G, Yong VW (1997) Microglial production of TNF-alpha is induced by activated T lymphocytes. Involvement of VLA-4 and inhibition by interferon beta-1b. *J Clin Invest.* 100: 604-612.
50. Beers DR, Henkel JS, Xiao Q, Zhao W, Wang J, Yen AA, Siklos L, McKercher SR, Appel SH (2006) Wild-type microglia extend survival in PU.1 knockout mice with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 16021-16026.
51. Boillée S, Yamanaka K, Lobsiger CS, Copeland NG, Jenkins NA, Kassiotis G, Kollias G, Cleveland DW (2006) Onset and progression in inherited ALS determined by motor neurons and microglia. *Science* 312: 1389-1392.
52. Jack C, Ruffini F, Bar-Or A, Antel JP (2005) Microglia and multiple sclerosis. *J Neurosci Res.* 81: 363-373.
53. Nau R, Brück W (2002) Neuronal injury in bacterial meningitis: mechanisms and implications for therapy. *Trends Neurosci.* 25: 38-45.
54. Graeber MB (2010) Changing face of microglia. *Science* 330: 783-788.
55. Hughes V (2012) Microglia: The constant gardeners. *Nature* 485: 570-572.
56. Pocock JM, Kettenmann H (2007) Neurotransmitter receptors on microglia. *Trends Neurosci.* 30: 527-535.
57. Roumier A, Béchade C, Poncer JC, Smalla KH, Tomasello E, Vivier E, Gundelfinger ED, Triller A, Bessis A (2004) Impaired synaptic function in the microglial KARAP/DAP12-deficient mouse. *J Neurosci.* 24: 11421-11428.
58. Harrison JK, Jiang Y, Chen S, Xia Y, Maciejewski D, McNamara RK, Streit WJ, Salafranca MN, Adhikari S, Thompson DA, Botti P, Bacon KB, Feng L (1998) Role for neuronally derived fractalkine in mediating interactions between neurons and CX₃CR1-expressing microglia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 10896-10901.
59. Hoshiko M, Arnoux I, Avignone E, Yamamoto N, Audinat E (2012) Deficiency of the microglial receptor CX₃CR1 impairs postnatal functional development of thalamocortical synapses in the barrel cortex. *J Neurosci.* 32: 15106-15111.
60. Kierdorf K, Katzmarski N, Haas CA, Prinz M (2013) Bone marrow cell recruitment to the brain in the absence of irradiation or parabiosis bias. *PLoS One* 8: e58544.
61. Kim KW, Vallon-Eberhard A, Zigmund E, Farache J, Shezen E, Shakhar G, Ludwig A, Lira SA, Jung S (2011) In vivo structure/function and expression analysis of the CX₃C chemokine fractalkine. *Blood* 118: e156-e167.
62. Lawson LJ, Perry VH, Dri P, Gordon S (1990) Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience* 39: 151-170.

63. Jeong HK, Ji K, Min K, Joe EH (2013) Brain inflammation and microglia: facts and misconceptions. *Exp Neurol.* 22: 59-67.
64. Sedgwick JD, Schwender S, Imrich H, Dorries R, Butcher GW, 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: 7438-7442.
65. Ginhoux F, Greter M, Leboeuf M, Nandi S, See P, Gokhan S, Mehler MF, Conway SJ, Ng LG, Stanley ER, Samokhvalov IM, Merad M (2010) Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science* 330:841-845.
66. Gautier EL, Shay T, Miller J, Greter M, Jakubzick C, Ivanov S, Helft J, Chow A, Elpek KG, Gordonov S, Mazloom AR, Ma'ayan A, Chua WJ, Hansen TH, Turley SJ, Merad M, Randolph GJ; Immunological Genome Consortium (2012) Gene-expression profiles and transcriptional regulatory pathways that underlie the identity and diversity of mouse tissue macrophages. *Nat Immunol.* 13: 1118-1128.
67. Liu K, Victora GD, Schwickert TA, Guermonprez P, Meredith MM, Yao K, Chu FF, Randolph GJ, Rudensky AY, Nussenzweig M (2009) In vivo analysis of dendritic cell development and homeostasis. *Science.* 324: 392-397.
68. Alliot F, Godin I, Pessac B (1999) Microglia derive from progenitors, originating from the yolk sac, and which proliferate in the brain. *Dev Brain Res.* 117:145-152.
69. Ginhoux F, Lim S, Hoeffel G, Low D, Huber T (2013) Origin and differentiation of microglia. *Front Cell Neurosci.* 7:45.
70. Schulz C, Gomez PE, Chorro L, Szabo-Rogers H, Cagnard N, Kierdorf K, Prinz M, Wu B, Jacobsen SE, Pollard JW, Frampton J, Lui KJ, Geissmann F (2012) A Lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells. *Science* 336: 86-90
71. Ajami B, Bennett JL, Krieger C, McNagny KM, Rossi FM (2011) Infiltrating monocytes trigger EAE progression, but do not contribute to the resident microglia pool. *Nat. Neurosci.* 14: 1142-1149.
72. Ajami B, Bennett JL, Krieger C, Tetzlaff W, Rossi FM (2007) Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life. *Nat Neurosci.* 10: 1538-1543.
73. Leong and ling 1992 Leong, S. K., and Ling, E. A. (1992). Amoeboid and ramified microglia: their interrelationship and response to brain injury. *Glia* 6: 39-47.
74. Ling EA (1976) Some aspects of amoeboid microglia in the corpus callosum and neighbouring regions of neonatal rats. *J Anat.* 121: 29-45.
75. Ling EA (1979) Transformation of monocytes into amoeboid microglia in the corpus callosum of postnatal rats, as shown by labelling monocytes by carbon particles. *J Anat.* 128: 847-858.
76. Ling EA, Penney D, Leblond CP (1980) Use of carbon labeling to demonstrate the role of blood monocytes as precursors of the 'ameboid cells' present in the corpus callosum of postnatal rats. *J Comp Neurol.* 193: 631-657.

77. Hess DC, Abe T, Hill WD, Studdard AM, Carothers J, Masuya M, Fleming PA, Drake CJ, Ogawa M (2004) Hematopoietic origin of microglial and perivascular cells in brain. *Exp Neurol.* 186:134-144.
78. Hickey WF, Kimura H (1988) Perivascular microglial cells of the CNS are bone marrow-derived and present antigen *in vivo*. *Science* 239: 290-292.
79. Hickey WF, 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: 246-256.
80. Priller J, Persons DA, Klett FF, Kempermann G, Kreutzberg GW, Dirnagl U (2001) Neogenesis of cerebellar Purkinje neurons from gene-marked bone marrow cells *in vivo*. *J Cell Biol.* 155: 733-738.
81. Simard AR, Rivest S (2004) Bone marrow stem cells have the ability to populate the entire central nervous system into fully differentiated parenchymal microglia. *FASEB J.* 18: 998-1000.
82. Priller J, Flügel A, Wehner T, Boentert M, Haas CA, Prinz M, Fernández-Klett F, Prass K, Bechmann I, De Boer BA, Frotscher M, Kreutzberg GW, Persons DA, Dirnagl U (2001) Targeting gene-modified hematopoietic cells to the central nervous system: Use of green fluorescent protein uncovers microglial engraftment. *Nat Medicine* 7: 1356-1361.
83. Capotondo A, Milazzo R, Politi LS, Quattrini A, Palini A, Plati T, Merella S, Nonis A, di Serio C, Montini E, Naldini L, Biffi A (2012) Brain conditioning is instrumental for successful microglia reconstitution following hematopoietic stem cell transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 15015-15023.
84. Mildner A, Schmidt H, Nitsche M, Merkler D, Hanisch UK, Mack M, Heikenwalder M, Brück W, Priller J, Prinz M (2007) Microglia in the adult brain arise from Ly6ChiCCR2+ monocytes only under defined host conditions. *Nat Neurosci.* 10: 1544-1553.
85. Diserbo M, Agin A, Lamproglou I, Mauris J, Staali F, Multon E, Amourette C (2002) Blood-brain barrier permeability after gamma whole-body irradiation: an *in vivo* microdialysis study. *Can J Physiol Pharmacol* 80: 670-678.
86. Li YQ, Chen P, Jain V, Reilly RM, Wong CS (2004) Early radiation-induced endothelial cell loss and blood-spinal cord barrier breakdown in the rat spinal cord. *Radiat Res.* 161: 143-152.
87. Ciurea SO, Andersson BS (2009) Busulfan in hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 15: 523-536.
88. Cortes JE, Talpaz M, Kantarjian H (1996) Chronic myelogenous leukemia: a review. *Am J Med.* 100: 555-570.
89. Lampron A, Lessard M, Rivest S (2012) Effects of myeloablation, peripheral chimerism, and whole-body irradiation on the entry of bone marrow-derived cells into the brain. *Cell Transplant.* 21: 1149-1159.

90. Down JD, Ploemacher RE (1993) Transient and permanent engraftment potential of murine hematopoietic stem cell subsets: differential effects of host conditioning with gamma radiation and cytotoxic drugs. *Exp Hematol.* 21: 913-921.
91. Wilkinson FL, Sergijenko A, Langford-Smith KJ, Malinowska M, Wynn RF, Bigger BW (2013) Busulfan conditioning enhances engraftment of hematopoietic donor-derived cells in the brain compared with irradiation. *Mol Ther.* 21: 868-876.
92. Böttcher C, Ulbricht E, Helmlinger D, Mack AF, Reichenbach A, Wiedemann P, Wagner HJ, Seeliger MW, Bringmann A, Priller J (2008) Long-term engraftment of systemically transplanted, gene-modified bone marrow-derived cells in the adult mouse retina. *Br J Ophthalmol.* 92: 272-275.
93. Eglitis MA, Mezey E (1997) Hematopoietic cells differentiate into both microglia and macroglia in the brains of adult mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 4080-4085.
94. Flügel A, Berkowicz T, Ritter T, Labeur M, Jenne DE, Li Z, Ellwart JW, Willem M, Lassmann H, Wekerle H (2001) Migratory activity and functional changes of green fluorescent effector cells before and during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Immunity* 14: 547-560.
95. Davoust N, Vuillat C, Androdias G, Nataf S (2008) From bone marrow to microglia: barriers and avenues. *Trends Immunol.* 29: 227-234.
96. Djukic M, Mildner A, Schmidt H, Czesnik D, Brück W, Priller J, Nau R, Prinz M (2006) Circulating monocytes engraft in the brain, differentiate into microglia and contribute to the pathology following meningitis in mice. *Brain* 129: 2394-2403.
97. Prinz M, Priller J, Sisodia SS, Ransohoff RM (2011) Heterogeneity of CNS myeloid cells and their roles in neurodegeneration. *Nat Neurosci.* 14: 1227-1235.
98. Hawkes CA, McLaurin J (2009) Selective targeting of perivascular macrophages for clearance of beta-amyloid in cerebral amyloid angiopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 1261-1266.
99. Michaud JP, Bellavance MA, Préfontaine P, Rivest S (2013) Real-time in vivo imaging reveals the ability of monocytes to clear vascular amyloid beta. *Cell Rep.* 5: 646-653.
100. Mildner A, Schlevogt B, Kierdorf K, Böttcher C, Erny D, Kummer MP, Quinn M, Brück W, Bechmann I, Heneka MT, Priller J, Prinz M (2011) Distinct and non-redundant roles of microglia and myeloid subsets in mouse models of Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 31: 11159-11171.
101. Simard AR, Soulet D, Gowing G, Julien JP, Rivest S (2006) Bone marrow-derived microglia play a critical role in restricting senile plaque formation in Alzheimer's disease. *Neuron* 49: 489-502.
102. Krabbe G, Halle A, Matyash V, Rinnenthal JL, Eom GD, Bernhardt U, Miller KR, Prokop S, Kettenmann H, Heppner FL (2013) Functional impairment of microglia coincides with Beta-amyloid deposition in mice with Alzheimer-like pathology. *PLoS ONE* 8: e60921.

103. Shechter R, London A, Varol C, Raposo C, Cusimano M, Yovel G, Rolls A, Mack M, Pluchino S, Martino G, Jung S, Schwartz M (2009) Infiltrating blood-derived macrophages are vital cells playing an anti-inflammatory role in recovery from spinal cord injury in mice. *PLoS Med.* 6: e1000113.
104. Kuziel WA, Morgan SJ, Dawson TC, Griffin S, Smithies O, Lay K, Maeda N (1997) Severe reduction in leukocyte adhesion and monocyte extravasation in mice deficient in CC chemokine receptor 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 12053-12058.
105. El Khoury J, Toft M, Hickman SE, Means TK, Terada K, Geula C, Luster AD (2007) Ccr2 deficiency impairs microglial accumulation and accelerates progression of Alzheimer-like disease. *Nat Med.* 13: 432-438.
106. Combadière C, Potteaux S, Rodero M, Simon T, Pezard A, Esposito B, Merval R, Proudfoot A, Tedqui A, Mallat Z (2008) Combined inhibition of CCL2, CX₃CR1, and CCR5 abrogates Ly6C(hi) and Ly6C(lo) monocytoysis and almost abolishes atherosclerosis in hypercholesterolemic mice. *Circulation* 117: 1649-1657.
107. Saederup N, Chan L, Lira SA, Charo IF (2008) Fractalkine deficiency markedly reduces macrophage accumulation and atherosclerotic lesion formation in CCR2^{-/-} mice: evidence for independent chemokine functions in atherogenesis. *Circulation* 117: 1642-1648.
108. Tacke F, Alvarez D, Kaplan TJ, Jakubzick C, Spanbroek R, Llodra J, Garin A, Liu J, Mack M, Van Rooijen N, Lira SA, Habenicht AJ, Randolph GJ (2007) Monocyte subsets differentially employ CCR2, CCR5, and CX₃CR1 to accumulate within atherosclerotic plaques. *J Clin Invest.* 117: 185-194.
109. Blinzinger K, Kreutzberg G (1968) Displacement of synaptic terminals from regenerating motoneurons by microglial cells. *Z Zellforsch Mikrosk Anat.* 85:145-57.
110. Streit WJ, Graeber MB, Kreutzberg GW (1988) Functional plasticity of microglia: a review. *Glia* 1: 301-307
111. Boucsein C, Kettenmann H, Nolte C (2000) Electrophysiological properties of microglial cells in normal and pathologic rat brain slices. *Eur J Neurosci.* 12: 2049-2058.
112. Moran LB, Graeber MB (2004) The facial nerve axotomy model. *Brain Res Rev.* 44: 154-178.
113. Raivich G, Moreno-Flores MT, Möller JC, Kreutzberg GW (1994) Inhibition of posttraumatic microglial proliferation in a genetic model of macrophage colony-stimulating factor deficiency in the mouse. *Eur J Neurosci.* 6:1615-1618.
114. Werner A, Kloss CUA, Walter J, Kreutzberg GW, Raivich G (1998) Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM1) in the regenerating mouse facial motor nucleus. *J Neurocytol.* 27: 219-232.
115. Möller JC, Klein MA, Haas S, Jones LL, Kreutzberg GW, Raivich G (1996) Regulation of thrombospondin in the regenerating mouse facial motor nucleus. *Glia* 17 :121-132

116. Raivich G, Bohatschek M, Werner A, Jones LL, Galiano M, Kloss CU, Zhu XZ, Pfeffer K, Liu ZQ (2003) Lymphocyte infiltration in the injured brain: role of proinflammatory cytokines. *J Neurosci Res.* 72: 726-733.
117. Raivich G, Jones LL, Kloss CU, Werner A, Neumann H, Kreutzberg GW (1998) Immune surveillance in the injured nervous system: T-lymphocytes invade the axotomized mouse facial motor nucleus and aggregate around sites of neuronal degeneration. *J Neurosci.* 18: 5804-5816.
118. Dailey AT, Avellino AM, Benthem L, Silver J, Kliot M (1998) Complement depletion reduces macrophage infiltration and activation during Wallerian degeneration and axonal regeneration. *J Neurosci.* 18: 6713-6722.
119. Werner A, Mayer U, Jones LL; Kreutzberg GW, Raivich G (2000) Impaired axonal regeneration in $\alpha 7$ -integrin deficient mice. *J Neurosci.* 20: 1822-1830.
120. Graeber MB, Kreutzberg GW (1988) Delayed astrocyte reaction following facial nerve axotomy. *J Neurocytol.* 17: 209-220.
121. Charo IF, Ransohoff RM (2006) The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N Engl J Med.* 354: 610-621.
122. Luster AD (1998) Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med.* 338: 436-445.
123. Viola A, Luster AD (2008) Chemokines and their receptors: drug targets in immunity and inflammation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 48: 171-197.
124. Liu L, Callahan MK, Huang D, Ransohoff RM (2005) Chemokine receptor CXCR3: an unexpected enigma. *Curr Top Dev Biol.* 68: 149-181.
125. Riemer C, Queck I, Simon D, Kurth R, Baier M (2000) Identification of upregulated genes in scrapie-infected brain tissue. *J Virol.* 74: 10245-10248.
126. Xia MQ, Bacskai BJ, Knowles RB, Qin SX, Hyman BT (2000) Expression of the chemokine receptor CXCR3 on neurons and the elevated expression of its ligand IP-10 in reactive astrocytes: in vitro ERK1/2 activation and role in Alzheimer's disease. *J Neuroimmunol.* 108: 227-235.
127. Loetscher M, Gerber B, Loetscher P, Jones SA, Piali L, Clark-Lewis I, Baggiolini M, Moser B (1996) Chemokine receptor specific for IP10 and mig: structure, function, and expression in activated T-lymphocytes. *J Exp Med.* 184: 963-969.
128. Coughlan CM, McManus CM, Sharron M, Gao Z, Murphy D, Jaffer S, Choe W, Chen W, Hesselgesser J, Gaylord H, Kalyuzhny A, Lee VM, Wolf B, Doms RW, Kolson DL (2000) Expression of multiple functional chemokine receptors and monocyte chemoattractant protein-1 in human neurons. *Neuroscience* 97: 591-600.
129. Biber K, Dijkstra I, Trebst C, De Groot CJ, Ransohoff RM, Boddeke HW (2002) Functional expression of CXCR3 in cultured mouse and human astrocytes and microglia. *Neuroscience* 112: 487-497.

130. Goldberg SH, van der Meer P, Hesselgesser J, Jaffer S, Kolson DL, Albright AV, González-Scarano F, Lavi E (2001) CXCR3 expression in human central nervous system diseases. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 27: 127-138
131. Nelson TE, Gruol DL (2004) The chemokine CXCL10 modulates excitatory activity and intracellular calcium signaling in cultured hippocampal neurons. *J Neuroimmunol.* 156: 74-87.
132. Rappert A, Biber K, Nolte C, Lipp M, Schubel A, Lu B, Gerard NP, Gerard C, Boddeke HW, Kettenmann (2002) Secondary lymphoid tissue chemokine (CCL21) activates CXCR3 to trigger a Cl⁻ current and chemotaxis in murine microglia. *J Immunol.* 168: 3221-3226.
133. Biber K, Sauter A, Brouwer N, Copray SC, Boddeke HW (2001) Ischemia-induced neuronal expression of the microglia attracting chemokine Secondary Lymphoid-tissue Chemokine (SLC). *Glia* 34: 121-133.
134. Cole KE, Strick CA, Paradis TJ, Osborne KT, Loetscher M, Gladue RP, Lin W, Boyd JG, Moser B, Wood DE, Sahagan BG, Neote K (1998) Interferon-inducible T cell alpha chemoattractant (I-TAC): a novel non-ELR CXC chemokine with potent activity on activated T cells through selective high affinity binding to CXCR3. *J Exp Med.* 187: 2009-2021.
135. Nakajima C, Mukai T, Yamaguchi N, Morimoto Y, Park WR, Iwasaki M, Gao P, Ono S, Fujiwara H, Hamaoka T (2002) Induction of the chemokine receptor CXCR3 on TCR-stimulated T cells: dependence on the release from persistent TCR-triggering and requirement for IFN-gamma stimulation. *Eur J Immunol.* 32: 1792-1801.
136. Janatpour MJ, Hudak S, Sathe M, Sedgwick JD, McEvoy LM (2001) Tumor necrosis factor-dependent segmental control of MIG expression by high endothelial venules in inflamed lymph nodes regulates monocyte recruitment. *J Exp Med.* 194: 1375-1384.
137. Katschke KJ Jr, Rottman JB, Ruth JH, Qin S, Wu L, LaRosa G, Ponath P, Park CC, Pope RM, Koch AE (2001) Differential expression of chemokine receptors on peripheral blood, synovial fluid, and synovial tissue monocytes/macrophages in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 44: 1022-1032.
138. Fife BT, Kennedy KJ, Paniagua MC, Lukacs NW, Kunkel SL, Luster AD, Karpus WJ (2001) CXCL10 (IFN-gamma-inducible protein-10) control of encephalitogenic CD4⁺ T cell accumulation in the central nervous system during experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* 166: 7617-7624.
139. Glabinski AR, Tani M, Strieter RM, Tuohy VK, Ransohoff RM (1997) Synchronous synthesis of alpha- and beta-chemokines by cells of diverse lineage in the central nervous system of mice with relapses of chronic experimental autoimmune encephalomyelitis. *Am J Pathol.* 150: 617-630.
140. Godiska R, Chantry D, Dietsch GN, Gray PW (1995) Chemokine expression in murine experimental allergic encephalomyelitis. *J Neuroimmunol.* 58: 167-176.
141. Klein RS, Izikson L, Means T, Gibson HD, Lin E, Sobel RA, Weiner HL, Luster AD (2004) IFN-inducible protein 10/CXC chemokine ligand 10-independent induction of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* 172: 550-559.

142. Liu L, Huang D, Matsui M, He TT, Hu T, Demartino J, Lu B, Gerard C, Ransohoff RM (2006) Severe disease, unaltered leukocyte migration, and reduced IFN-gamma production in CXCR3^{-/-} mice with experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* 176: 4399-4409.
143. Babcock AA, Kuziel WA, Rivest S, Owens T (2003) Chemokine expression by glial cells directs leukocytes to sites of axonal injury in the CNS. *J Neurosci.* 23: 7922-7930.
144. Rappert A, Bechmann I, Pivneva T, Mahlo J, Biber K, Nolte C, Kovac AD, Gerard C, Boddeke HW, Nitsch R, Kettenmann H (2004) CXCR3-dependent microglial recruitment is essential for dendrite loss after brain lesion. *J Neurosci.* 24: 8500-8509.
145. Dijkstra IM, Hulshof S, van der Valk P, Boddeke HW, Biber K (2004) Cutting edge: activity of human adult microglia in response to CC chemokine ligand 21. *J Immunol.* 172: 2744-2747.
146. Nagira M, Imai T, Hieshima K, Kusuda J, Ridanpää M, Takagi S, Nishimura M, Kakizaki M, Nomiyama H, Yoshie O (1997) Molecular cloning of a novel human CC chemokine secondary lymphoid-tissue chemokine that is a potent chemoattractant for lymphocytes and mapped to chromosome 9p13. *J Biol Chem.* 272: 19518-1924.
147. Rosenberg J, Galen BT (2017) Recurrent Meningitis. *Curr Pain Headache Rep.* 21: 33.
148. VanDemark M (2013) Acute bacterial meningitis: Current review and treatment update. *Crit Care Nurs Clin North Am.* 25: 351-361.
149. Van de Beek D, de Gans J, Spanjaard L, Weisfelt M, Reitsma JB, Vermeulen M (2004) Clinical features and prognostic factors in adults with bacterial meningitis. *N Engl J Med.* 351: 1849-1859.
150. McGill F, Heyderman RS, Panagiotou S, Tunkel AR, Solomon T (2016) Acute bacterial meningitis in adults. *Lancet* 388: 3036-3047.
151. Prager O, Friedman A, Nebenzahl YM (2017) Role of neural barriers in the pathogenesis and outcome of Streptococcus pneumoniae meningitis. *Exp Ther Med.* 13: 799-809.
152. Thigpen MC, Whitney CG, Messonnier NE, Zell ER, Lynfield R, Hadler JL, Harrison LH, Farley MM, Reingold A, Bennett NM, Craig AS, Schaffner W, Thomas A, Lewis MM, Scallan E, Schuchat A (2011) Bacterial meningitis in the United States 1998-2007. *N Engl J Med.* 364: 2016-2025.
153. Bohr V, Paulson OB, Rasmussen N (1984) Pneumococcal meningitis. Late neurologic sequelae and features of prognostic impact. *Arch Neurol.* 41: 1045-1049.
154. Christie D, Rashid H, El-Bashir H, Sweeney F, Shore T, Booy R, Viner RM (2017) Impact of meningitis on intelligence and development: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 12: e0175024.
155. Hoogman M, van de Beek D, Weisfelt M, de Gans J, Schmand B (2007) Cognitive outcome in adults after bacterial meningitis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 78: 1092-1096.

156. Schmidt H, Heimann B, Djukic M, Mazurek C, Fels C, Wallesch CW, Nau R (2006) Neuropsychological sequelae of bacterial and viral meningitis. *Brain* 129: 333-345.
157. Scheld WM, Park TS, Dacey RG, Winn HR, Jane JA, Sande MA (1979) Clearance of bacteria from cerebrospinal fluid to blood in experimental meningitis. *Infect Immun.* 24: 102-105.
158. Leib SL, Tauber MG (1999) Pathogenesis of bacterial meningitis. *Infect Dis Clin North Am.* 13: 527-548.
159. Schwerk C, Tenenbaum T, Kim KS, Schrotten H (2015) The choroid plexus-a multi-role player during infectious diseases of the CNS. *Front Cell Neurosci.* 9: 80.
160. Tuomanen E (1993) Entry of pathogens into the central nervous system. *FEMS Microbiol Rev.* 18: 289-299.
161. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O (2006) Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124: 783-801.
162. Zysk G, Bruck W, Huitinga I, Fischer FR, Flachsbarth F, van Rooijen N, Nau R (1997) Elimination of blood-derived macrophages inhibits the release of interleukin-1 and the entry of leukocytes into the cerebrospinal fluid in experimental pneumococcal meningitis. *J Neuroimmunol.* 73: 77-80.
163. Michael B, Menezes BF, Cunniffe J, Miller A, Kneen R, Francis G, Beeching NJ, Solomon T (2010) Effect of delayed lumbar punctures on the diagnosis of acute bacterial meningitis in adults. *Emerg Med J.* 27: 433-438.
164. Nau R, Soto A, Brück W (1999) Apoptosis of neurons in the dentate gyrus in humans suffering from bacterial meningitis. *J Neuropathol Exp Neurol.* 58: 265-274.
165. Østergaard C, Leib SL, Rowland I, Brandt CT (2010) Bacteremia causes hippocampal apoptosis in experimental pneumococcal meningitis. *BMC Infec Dis.* 10:1.
166. Hoffmann O, Mahrhofer C, Rueter N, Freyer D, Bert B, Fink H, Weber JR (2007) Pneumococcal cell wall-induced meningitis impairs adult hippocampal neurogenesis. *Infect Immun.* 75: 4289-4297.
167. Koedel U, Rupprecht T, Angele B, Heesemann J, Wagner H, Pfister HW, Kirschning CJ (2004) MyD88 is required for mounting a robust host immune response to *Streptococcus pneumoniae* in the CNS. *Brain* 127: 1437-1445.
168. Hoffmann O, Braun JS, Becker D, Halle A, Freyer D, Dagand E, Lehnardt S, Weber JR (2007) TLR2 mediated neuroinflammation and neuronal damage. *J Immunol.* 178: 6476-6481.
169. Cassan C, Liblau RS (2007) Immune tolerance and control of CNS autoimmunity: from animal models to MS patients. *J Neurochem.* 100: 883-892.
170. Noseworthy JH (2003) Management of multiple sclerosis: current trials and future options. *Curr Opin Neurol.* 16: 289-297.
171. Saruhan-Direskeneli G, Weber F, Meinl E, Pette M, Giegerich G, Hinkkanen A, Epplen JT, Hohlfeld R, Wekerle H (1993) Human T cell autoimmunity against myelin basic

- protein: CD4⁺ cells recognizing epitopes of the T cell receptor beta chain from a myelin basic protein-specific T cell clone. *Eur J Immunol.* 23: 530-536.
172. Butcher EC, Picker LJ (1996) Lymphocyte homing and homeostasis. *Science* 272: 60-66.
173. Holman DW, Klein RS, Ransohoff RM (2011) The blood-brain barrier, chemokines and multiple sclerosis. *Biochim Biophys Acta.* 1812: 220-230.
174. Junker A, Brück W (2012) Autoinflammatory grey matter lesions in humans: cortical encephalitis, clinical disorders, experimental models. *Curr Opin Neurol.* 25: 349-357.
175. Lassmann H, Brück W, Lucchinetti CF (2007) The immunopathology of multiple sclerosis: an overview. *Brain Pathol.* 17: 210-218.
176. Hemmer B, Archelos JJ, Hartung HP (2002) New concepts in the immunopathogenesis of multiple sclerosis. *Nat Rev Neurosci.* 3: 291-301.
177. Lucchinetti CF, Brück W, Rodriguez M, Lassmann H (1996) Distinct patterns of multiple sclerosis pathology indicates heterogeneity on pathogenesis. *Brain Pathol.* 6: 259-274.
178. Zipp F, Aktas O (2006) The brain as a target of inflammation: common pathways link inflammatory and neurodegenerative diseases. *Trends Neurosci.* 29: 518-527.
179. Brück W, Kuhlmann T, Stadelmann C (2003) Remyelination in multiple sclerosis. *J Neurol Sci.* 206: 181-185.
180. Ferguson B, Matyszak MK, Esiri MM, Perry VH (1997) Axonal damage in acute multiple sclerosis lesions. *Brain* 120: 393-399.
181. McFarlin DE, McFarland HF (1982) Multiple sclerosis (first of two parts). *N Engl J Med.* 307: 1183-1188.
182. McFarlin DE, McFarland HF (1982) Multiple sclerosis (second of two parts). *N Engl J Med.* 307: 1246-1251.
183. Janardhan V, Bakshi R (2002) Quality of life in patients with multiple sclerosis: the impact of fatigue and depression. *J Neurol Sci.* 205: 51-58.
184. Lobentanz IS, Asenbaum S, Vass K, Sauter C, Klösch G, Kollegger H, Kristoferitsch W, Zeitlhofer J (2004) Factors influencing quality of life in multiple sclerosis patients: disability, depressive mood, fatigue and sleep quality. *Acta Neurol Scand.* 110: 6-13.
185. Noseworthy JH, Lucchinetti C, Rodriguez M, Weinshenker BG (2000) Multiple sclerosis. *N Engl J Med.* 343: 938-952.
186. Frohman EM, Filippi M, Stuve O, Waxman SG, Corboy J, Phillips JT, Lucchinetti C, Wilken J, Karandikar N, Hemmer B, Monson N, De Keyser J, Hartung H, Steinman L, Oksenberg JR, Cree BA, Hauser S, Racke MK (2005) Characterizing the mechanisms of progression in multiple sclerosis: evidence and new hypotheses for future directions. *Arch Neurol.* 62, 1345-1356.

187. Hauser SL, Oksenberg JR (2006) The neurobiology of multiple sclerosis: genes, inflammation, and neurodegeneration. *Neuron* 52: 61-76.
188. Comi G, Filippi M, Wolinsky JS (2001) European/Canadian multicenter, double-blind, randomized, placebo-controlled study of the effects of glatiramer acetate on magnetic resonance imaging--measured disease activity and burden in patients with relapsing multiple sclerosis. European/Canadian Glatiramer Acetate Study Group. *Ann Neurol*. 49: 290-297.
189. Jacobs LD, Cookfair DL, Rudick RA, Herndon RM, Richert JR, Salazar AM, Fischer JS, Goodkin DE, Granger CV, Simon JH, Alam JJ, Bartoszak DM, Bourdette DN, Braiman J, Brownschidle CM, Coats ME, Cohan SL, Dougherty DS, Kinkel RP, Mass MK, Munschauer FE 3rd, Priore RL, Pullicino PM, Scherokman BJ, Weinstock-Guttman MD, Whitham RH (1996): Intramuscular interferon beta-1a for disease progression in relapsing multiple sclerosis. The Multiple Sclerosis Collaborative Research Group (MSCRG). *Ann Neurol*. 39: 285-294.
190. Sospedra M, Martin R (2005) Immunology of multiple sclerosis. *Annu Rev Immunol*. 23: 683-747.
191. Arnon R, Aharoni R (2004) Mechanism of action of glatiramer acetate in multiple sclerosis and its potential for the development of new applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 14593-14598.
192. Buck D, Hemmer B (2011) Treatment of multiple sclerosis: current concepts and future perspectives. *J Neurol*. 258: 1747-1762.
193. Gentile A, Rossi S, Studer V, Motta C, De Chiara V, Musella A, Sepman H, Fresegna D, Musumeci G, Grasselli G, Haji N, Weiss S, Hayardeny L, Mandolesi G, Centonze D (2013) Glatiramer acetate protects against inflammatory synaptopathy in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmune Pharmacol*. 8: 651-663.
194. Weber MS, Prod'homme T, Youssef S, Dunn SE, Rundle CD, Lee L, Patarroyo JC, Stüve O, Sobel RA, Steinman L, Zamvil SS (2007) Type II monocytes modulate T cell-mediated central nervous system autoimmune disease. *Nat Med*. 13: 935-943.
195. Burton JM, O'Connor PW, Hohol M, Beyene J (2009) Oral versus intravenous steroids for treatment of relapses in multiple sclerosis. *Cochrane Database Syst Rev*. 12: CD006921.
196. Durelli L, Cocito D, Riccio A, Barile C, Bergamasco B, Baggio GF, Perla F, Delsedime M, Gusmaroli G, Bergamini L (1986) High-dose intravenous methylprednisolone in the treatment of multiple sclerosis: clinical-immunologic correlations. *Neurology* 36: 238-243
197. Oliveri RL, Valentino P, Russo C, Sibilgia G, Aguglia U, Bono F, Fera F, Gambardella A, Zappia M, Pardatscher K, Quattrone A (1998) Randomized trial comparing two different high doses of methylprednisolone in MS: a clinical and MRI study. *Neurology* 50: 1833-1836.
198. Kappos L, Radue EW, O'Connor P, Polman C, Hohlfeld R, Calabresi P, Selmaj K, Agoropoulou C, Leyk M, Zhang-Auberson L, Burtin P, FREEDOMS Study Group

- (2010) A placebo-controlled trial of oral fingolimod in relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med.* 36: 387-401.
199. Killestein J, Rudick RA, Polman CH (2011) Oral treatment for multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* 10: 1026-1034.
200. Coyle PK (2010) The role of natalizumab in the treatment of multiple sclerosis. *Am J Manag Care* 16: S164-170.
201. Siffrin V, Brandt AU, Herz L, Zipp F (2007) New insights into adaptive immunity in chronic neuroinflammation. *Adv Immunol.* 96: 1-40.
202. Miller SD, Karpus WJ (2007) Experimental autoimmune encephalomyelitis in the mouse. *Curr Protoc Immunol. Chapter 15, Unit 15.1.*
203. Sallusto F, Impellizzieri D, Basso C, Laroni A, Uccelli A, Lanzavecchia A, Engelhardt B (2012) T-cell trafficking in the central nervous system. *Immunol Rev.* 248: 216-227.
204. Zamvil S, Nelson P, Trotter J, Mitchell D, Knobler R, Fritz R, Steinman L (1985) T-cell clones specific for myelin basic protein induce chronic relapsing paralysis and demyelination. *Nature* 317: 355-358.
205. Kibler RF, Fritz RB, Chou F, Jen Chou C-H, Peacocke NY, Brown NM, McFarlin DE (1977) Immune response of Lewis rats to peptide C1 (residues 68-88) of guinea pig and rat myelin basic proteins. *J Exp Med.* 146: 1323-1331.
206. Chou CH, Fritz RB, Chou FC, Kibler RF (1979) The immune response of Lewis rats to peptide 68-88 of guinea pig myelin basic protein. I. T cell determinants. *J Immunol.* 123: 1540-1543.
207. Lyman WD, Abrams GA, Raine CS (1989) Experimental autoimmune encephalomyelitis: isolation and characterization of inflammatory cells from the central nervous system. *J Neuroimmunol.* 25: 195-201.
208. Kipp M, Nyamoya S, Hochstrasser T, Amor S (2017) Multiple sclerosis animal models: a clinical and histopathological perspective. *Brain Pathol.* 27: 123-137.
209. Casserly CS, Nantes JC, Whittaker Hawkins RF, Vallières L (2017) Neurophil perversion in demyelinating autoimmune disease: mechanism to medicine. *Autoimmun Rev.* 16: 294-307.
210. Schweingruber N, Haine A, Tiede K, Karabinskaya A, Van den Brandt J, Wüst S, Metselaar JM, Gold R, Tuckermann JP, Reichardt HM, Lühder F (2011) Liposomal encapsulation of glucocorticoids alters their mode of action in the treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* 187: 4310-4318.
211. Schweingruber N, Reichardt SD, Lühder F, Reichardt HM (2012) Mechanisms of glucocorticoids in the control of neuroinflammation. *J Neuroendocrinol.* 24: 174-182.
212. Billiau A, Matthys F (2001) Modes of action of Freund's adjuvants in experimental models of autoimmune diseases. *J Leukoc Biol.* 70: 849-860.
213. Lassmann H, Bradl M (2017) Multiple sclerosis: experimental models and reality. *Acta Neuropathol.* 133: 223-244.

214. Ferber IA, Brocke S, Taylor-Edwards C, Ridgway W, Dinisco C, Steinman L, Dalton D, Fathman CG (1996) Mice with a disrupted IFN-gamma gene are susceptible to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *J Immunol.* 156: 5-7.
215. Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD, McClanahan T, Kastelein RA, Cua DJ (2005) IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med.* 201: 233-240.
216. Kebir H, Kreymborg K, Ifergan I, Dodelet-Devillers A, Cayrol R, Bernard M, Giuliani F, Arbour N, Becher B, Prat A (2007) Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nat Med.* 13: 1173-1175.
217. Abdul-Majid KB, Stefferl A, Bourquin C, Lassmann H, Linington C, Olsson T, Kleinau S, Harris RA (2002) Fc receptors are critical for autoimmune inflammatory damage to the central nervous system in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Scand J Immunol.* 55: 70-81.
218. Kigerl KA, Gensel JC, Ankeny DP, Alexander JK, Donnelly DJ, Popovich PG (2009) Identification of two distinct macrophage subsets with divergent effects causing either neurotoxicity or regeneration in the injured mouse spinal cord. *J Neurosci.* 29: 13435-13444.
219. Baldwin AS (2012) Regulation of cell death and autophagy by IKK and NF- κ B: critical mechanisms in immune function and cancer. *Immunol Rev.* 246: 327-345.
220. Liu F, Xia Y, Parker AS, Verma IM (2012) IKK biology. *Immunol Rev.* 246: 239-253.
221. Chen LF, Greene WC (2004) Shaping the nuclear action of NF-kappaB. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 5: 392-401.
222. Ghosh G, Wang VY, Huang DB, Fusco A (2012) NF- κ B regulation: lessons from structures. *Immunol Rev.* 246: 36-58.
223. Ghosh S, Hayden MS (2012) Celebrating 25 years of NF- κ B research. *Immunol Rev.* 246: 5-13.
224. Schmitz ML, Baeuerle PA (1991) The p50 subunit is responsible for the strong transcription activating potential of NF-kappa B. *EMBO J.* 10: 3805-3817.
225. Hinz M, Arslan SC, Scheidereit C (2012) It takes two to tango: I κ Bs, the multifunctional partners of NF- κ B. *Immunol Rev.* 246:59-76.
226. Yamauchi S, Ito H, Miyajima A (2010) IkappaBeta, a nuclear IkappaB protein, positively regulates the NF-kappaB-mediated expression of proinflammatory cytokines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 11924-11929.
227. Karin M, Yamamoto Y, Wang QM (2004) The IKK NF-kappa B system: a treasure trove for drug development. *Nat Rev Drug Discov.* 3: 17-26.
228. Hayden MS, Ghosh S (2012) NF- κ B, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions. *Genes Dev.* 26: 203-234.
229. Pahl HL (1999) Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 18: 6853-6866.

230. Scheidereit C (2006) IkappaB kinase complexes: gateways to NF-kappaB activation and transcription. *Oncogene* 25: 6685-6705.
231. Bonizzi G, Karin M (2004) The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol.* 25: 280-288.
232. Oeckinghaus A, Hayden MS, Ghosh S (2011) Crosstalk in NF-κB signaling pathways. *Nat Immunol.* 12: 695-708.
233. Sakurai H, Suzuki S, Kawasaki N, Nakano H, Okazaki T, Chino A, Doi T, Saiki I (2003) Tumor necrosis factor-alpha-induced IKK phosphorylation of NF-kappaB p65 on serine 536 is mediated through the TRAF2, TRAF5, and TAK1 signaling pathway. *J Biol Chem.* 278: 36916-36923.
234. Walsh MC, Lee J, Choi Y (2015) Tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6) regulation of development, function, and homeostasis of the immune system. *Immunol Rev.* 266: 72-92.
235. Liu Z, Hsu H, Goeddel DV, Karin M (1996) Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF-kappaB activation prevents cell death. *Cell* 87: 565-578.
236. Rudolph D, Yeh WC, Wakeham A, Rudolph B, Nallainathan D, Potter J, Elia AJ, Mak TW (2000) Severe liver degeneration and lack of NF-kappaB activation in NEMO/IKKgamma-deficient mice. *Genes Dev.* 14: 854-862.
237. Senftleben U, Li ZW, Baud V, Karin M (2001) IKKbeta is essential for protecting T cells from TNFalpha-induced apoptosis. *Immunity* 14: 217-230.
238. Alcamo E, Mizgerd JP, Horwitz BH, Bronson R, Beg AA, Scott M, Doerschuk CM, Hynes RO, Baltimore D (2001) Targeted mutation of TNF receptor I rescues the RelA-deficient mouse and reveals a critical role for NF-kappa B in leukocyte recruitment. *J Immunol.* 167: 1592-1600.
239. Beg AA, Sha WC, Bronson RT, Ghosh S, Baltimore D (1995) Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the RelA component of NF-kappa B. *Nature* 376: 167-170.
240. Doi TS, Marino MW, Takahashi T, Yoshida T, Sakakura T, Old LJ, Obata Y (1999) Absence of tumor necrosis factor rescues RelA-deficient mice from embryonic lethality. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 2994-2999.
241. Sha WC, Liou HC, Tuomanen EI, Baltimore D (1995) Targeted disruption of the p50 subunit of NF-kappa B leads to multifocal defects in immune responses. *Cell* 80: 321-330.
242. Sternberg N, Hamilton D, Hoess R (1981) Bacteriophage P1 site-specific recombination. II. Recombination between loxP and the bacterial chromosome. *J Mol Biol.* 150: 487-507.
243. Clausen BE, Burkhardt C, Reith W, Renkawitz R, Förster I (1999) Conditional gene targeting in macrophages and granulocytes using LysMcre mice. *Transgenic Res.* 8: 265-277.

244. Faust N, Varas F, Kelly LM, Heck S, Graf T (2000) Insertion of enhanced green fluorescent protein into the lysozyme gene creates mice with green fluorescent granulocytes and macrophages. *Blood* 96: 719-726.
245. Markart P, Faust N, Graf T, Na CL, Weaver TE, Akinbi HT (2004) Comparison of the microbicidal and muramidase activities of mouse lysozyme M and P. *Biochem.* 380: 385-392.
246. Pasparakis M, Courtois G, Hafner M, Schmidt-Supprian M, Nenci A, Toksoy A, Krampert M, Goebeler M, Gillitzer R, Israel A, Krieg T, Rajewsky K, Haase I (2002) TNF-mediated inflammatory skin disease in mice with epidermis-specific deletion of IKK2. *Nature* 417: 861-866.
247. Li Q, Van Antwerp D, Mercurio F, Lee KF, Verma IM (1999) Severe liver degeneration in mice lacking the IkappaB kinase 2 gene. *Science* 284: 321-325.
248. Tanaka M, Fuentes ME, Yamaguchi K, Durnin MH, Dalrymple SA, Hardy KL, Goeddel DV (1999) Embryonic lethality, liver degeneration, and impaired NF-kappaB activation in IKK-beta-deficient mice. *Immunity* 10: 421-429.
249. Pasparakis M, Schmidt-Supprian M, Rajewsky K (2002) IkappaB signaling is essential for maintenance of mature B cells. *J Exp Med.* 196: 743-752.
250. Schmidt-Supprian M, Courtois G, Tian J, Coyle AJ, Israel A, Rajewsky K, Pasparakis M (2003) Mature T cells depend on signaling through the IKK complex. *Immunity* 19: 377-389.
251. Greten FR, Arkan MC, Bollrath J, Hsu LC, Goode J, Miething C, Göktuna SI, Neuenhahn M, Fierer J, Paxian S, Van Rooijen N, Xu Y, O'Cain T, Jaffee BB, Busch DH, Duyster J, Schmid RM, Eckmann L, Karin M (2007) NF-kappaB is a negative regulator of IL-1beta secretion as revealed by genetic and pharmacological inhibition of IKKbeta. *Cell* 130: 918-931.
252. Park JM, Greten FR, Li ZW, Karin M (2002) Macrophage apoptosis by anthrax lethal factor through p38 MAP kinase inhibition. *Science* 297: 2048-2051.
253. Park JM, Greten FR, Wong A, Westrick RJ, Arthur JS, Otsu K, Hoffmann A, Montminy M, Karin M (2005) Signaling pathways and genes that inhibit pathogen-induced macrophage apoptosis--CREB and NF-kappaB as key regulators. *Immunity* 23: 319-329.
254. Wong JY, Liu A, Schultheiss T, Popplewell L, Stein A, Rosenthal J, Essensten M, Forman S, Somlo G (2006) Targeted total marrow irradiation using three-dimensional image-guided tomographic intensity-modulated radiation therapy: an alternative to standard total body irradiation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 12: 306-315.
255. Hui S, Takahashi Y, Holtan SG, Azimi R, Seelig D, Yagi M, Ingvalson J, Alaei P, Sharkey L, Kodali B, Peterson N, Meyer C, Godin L, Ehrhardt M, Storme G, Zhou D, Panoskaltsis-Mortari A. (2017) Early assessment of dosimetric and biological differences of total marrow irradiation versus total body irradiation in rodents. *Radiother Oncol.* 124: 468-474.

256. Okabe M, Ikawa M, Kominami K, Nakanishi T, Nishimune Y (1997) 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Letters* 407: 313-319.
257. Luche H, Weber O, Nageswara Rao T, Blum C, Fehling HJ (2007) Faithful activation of an extra-bright red fluorescent protein in „knock-in“ Cre-reporter mice ideally suited for lineage tracing studies. *Eur J Immunol.* 37: 43-53.
258. Huck JH, Freyer D, Böttcher C, Mladinov M, Muselmann-Genschow C, Thielke M, Gladow N, Bloomquist D, Mergenthaler P, Priller J (2015) *De novo* expression of dopamine D2 receptors on microglia after stroke. *J Cereb Blood Flow Metab.* 35: 1804-1811.
259. Franklin KBJ, Paxinos G (2008) Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates, 3. Auflage, *Academic Press*.
260. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA (1992) Identification of programmed cell death in situ via labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol.* 119: 493-501.
261. Scheibe F, Gladow N, Mergenthaler P, Tucker AH, Meisel A, Prockop DJ, Priller J (2012) Nonviral gene delivery of erythropoietin by mesenchymal stromal cells. *Gene Ther.* 19: 550-560.
262. Chen R, Lowe L, Wilson JD, Crowther E, Tzeggai K, Bishop JE, Varro R (1999) Simultaneous quantification of six human cytokines in a single sample using microparticle-based flow cytometric technology. *Clin Chem.* 45:1693-1694.
263. Heim N, Garaschuk O, Friedrich MW, Mank M, Milos RI, Kovalchuk Y, Konnerth A, Griesbeck O (2007) Improved calcium imaging in transgenic mice expressing a troponin C-based biosensor. *Nat Methods* 4: 127-129.
264. Bettelli E, Pagany M, Weiner HL, Linington C, Sobel RA, Kuchroo VK (2003) Myelin oligodendrocyte glycoprotein-specific T cell receptor transgenic mice develop spontaneous autoimmune optic neuritis. *J Exp Med.* 197: 1073-1087.
265. Hancock WW, Lu B, Gao W, Csizmadia V, Faia K, King JA, Smiley ST, Ling M, Gerard NP, Gerard C (2000) Requirement of the chemokine receptor CXCR3 for acute allograft rejection. *J Exp Med.* 192: 1515-1520.
266. Dissertation von Katja Blazej (2013) Role of inflammatory cells in verebral ischemia. *Vorgelegt an der Medizinischen Fakultät der Charité-Universitätsmedizin Berlin*.
267. Cravens PD, Hussain RZ, Zacharias TE, Ben LH, Herndon E, Vinnakota R, Lambracht-Washington D, Nessler S, Zamvil SS, Eagar TN, Stüve O (2011) Lymph node-derived donor encephalitogenic CD4⁺ T cells in C57BL/6 mice adoptive transfer experimental autoimmune encephalomyelitis highly express GM-CSF and T-bet. *J Neuroinflammation* 8: 73.
268. Stromnes IM, Goverman JM (2006) Passive induction of experimental allergic encephalomyelitis. *Nat Protoc.* 1: 1952-1960.
269. Kanters E, Pasparakis M, Gijbels MJ, Vergouwe MN, Partouns-Hendriks I, Fijneman RJ, Clausen BE, Förster I, Kockx MM, Rajewsky K, Kraal G, Hofker MH, de Winther

- MP (2003) Inhibition of NF-kappaB activation in macrophages increases atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *J Clin Invest.* 112: 1176-1185.
270. Cho IH, Hong J, Suh EC, Kim JH, Lee H, Lee JE, Lee S, Kim CH, Kim DW, Jo EK, Lee KE, Karin M, Lee SJ (2008) Role of microglial IKKbeta in kainic acid-induced hippocampal neuronal cell death. *Brain* 131: 3019-3033.
271. Greten FR, Eckmann L, Greten TF, Park JM, Li ZW, Egan LJ, Kagnoff MF, Karin M (2004) IKKbeta links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. *Cell* 118: 285-296.
272. Ferrero I, Held W, Wilson A, Tacchini-Cottier F, Radtke F, MacDonald HR (2002) Mouse CD11c(+) B220(+) Gr1(+) plasmacytoid dendritic cells develop independently of the T-cell lineage. *Blood* 100: 2852-2857.
273. Kusmartsev SA, Li Y, Chen SH (2000) Gr-1+ myeloid cells derived from tumor-bearing mice inhibit primary T cell activation induced through CD3/CD28 costimulation. *J Immunol.* 165: 779-785.
274. Nakano H, Yanagita M, Gunn MD (2001) CD11c(+)B220(+)Gr-1(+) cells in mouse lymph nodes and spleen display characteristics of plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med.* 194: 1171-1178.
275. Ganz T, Gabayan V, Liao HI, Liu L, Oren A, Graf T, Cole AM (2003) Increased inflammation in lysozyme M-deficient mice in response to *Micrococcus luteus* and its peptidoglycan. *Blood* 101: 2388-2392.
276. Markart P, Korfhagen TR, Weaver TE, Akinbi HAT (2004) Mouse lysozyme M is important in pulmonary host defense against *Klebsiella pneumoniae* infection. *Am J Respir Crit Care Med.* 169: 454-458.
277. Shimada J, Moon SK, Lee HY, Takeshita T, Pan H, Woo JI, Gellibolian R, Yamanaka N, Lim DJ (2008) Lysozyme M deficiency leads to an increased susceptibility to *Streptococcus pneumoniae*-induced otitis media. *BMC Infect Dis.* 8: 134.
278. Araki K, Imaizumi T, Okuyama K, Oike Y, Yamamura K (1997) Efficiency of recombination by Cre transient expression in embryonic stem cells: comparison of various promoters. *J Biochem.* 122: 977-982.
279. Ye M, Iwasaki H, Laiosa CV, Stadtfeld M, Xie H, Heck S, Clausen B, Akashi K, Graf T (2003) Hematopoietic stem cells expressing the myeloid lysozyme gene retain long-term, multilineage repopulation potential. *Immunity* 19: 689-699.
280. Hilliard BA, Mason N, Xu L, Sun J, Lamhamedi-Cherradi SE, Liou HC, Hunter C, Chen YH (2002) Critical roles of c-Rel in autoimmune inflammation and helper T cell differentiation. *J Clin Invest.* 110: 843-850.
281. Hilliard B, Samoiloa EB, Liu TS, Rostami A, Chen Y (1999) Experimental autoimmune encephalomyelitis in NF-kappa B-deficient mice: Roles of NF-kappa B in the activation and differentiation of autoreactive T cells. *J Immunol.* 163: 2937-2943.
282. Greve B, Weissert R, Hamdi N, Bettelli E, Sobel RA, Coyle A, Kuchroo VK, Rajewsky K, Schmidt-Supprian M (2007) I kappa B kinase 2/beta deficiency controls expansion

- of autoreactive T cells and suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* 179: 179-185.
283. Van Loo G, De Lorenzi R, Schmidt H, Huth M, Mildner A, Schmidt-Supprian M, Lassmann H, Prinz MR, Pasparakis M (2006) Inhibition of transcription factor NF-kappaB in the central nervous system ameliorates autoimmune encephalomyelitis in mice. *Nat Immunol.* 7: 954-961.
284. Kolls JK, Lindén A (2004) Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity* 21: 467-476.
285. Nakae S, Saijo S, Horai R, Sudo K, Mori S, Iwakura Y (2003) IL-17 production from activated T cells is required for the spontaneous development of destructive arthritis in mice deficient in IL-1 receptor antagonist. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 5986-5990.
286. Fierz W, Endler B, Reske K, Wekerle H, Fontana A (1985) Astrocytes as antigen-presenting cells. I. Induction of Ia antigen expression on astrocytes by T cells via immune interferon and its effect on antigen presentation. *J Immunol.* 134: 3785-3793.
287. Cheng Y, Sun L, Xie Z, Fan X, Cao Q, Han J, Zhu J, Jin T (2017) Diversity of immune cell types in multiple sclerosis and its animal model: Pathological and therapeutic implications. *J Neurosci Res.* 95: 1973-1983.
288. Willenborg DO, Fordham S, Bernard CC, Cowden WB, Ramshaw IA (1996) IFN-gamma plays a critical down-regulatory role in the induction and effector phase of myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* 157: 3223-3227.
289. Duhon R, Glatigny S, Arbelaez CA, Blair TC, Oukka M, Bettelli E (2013) Cutting edge: the pathogenicity of IFN- γ -producing Th17 cells is independent of T-bet. *J Immunol.* 190: 4478-4482.
290. Barin JG, Talor MV, Schaub JA, Diny NL, Hou X, Hoyer M, Archer NK, Gebremariam ES, Davis MF, Miller LS, Rose NR, Čiháková D (2016) Collaborative Interferon- γ and Interleukin-17 Signaling Protects the Oral Mucosa from *Staphylococcus aureus*. *Am J Pathol.* 186: 2337-2352.
291. Guiton R, Vasseur V, Charron S, Arias MT, Van Langendonck N, Buzoni-Gatel D, Ryffel B, Dimier-Poisson I (2010) Interleukin 17 receptor signaling is deleterious during *Toxoplasma gondii* infection in susceptible BL6 mice. *J Infect Dis.* 202: 427-435.
292. Kezic JM, Glant TT, Rosenbaum JT, Rosenzweig HL (2012) Neutralization of IL-17 ameliorates uveitis but damages photoreceptors in a murine model of spondyloarthritis. *Arthritis Res Ther.* 14: R18.
293. O'Connor W Jr, Kamanaka M, Booth CJ, Town T, Nakae S, Iwakura Y, Kolls JK, Flavell RA (2009) A protective function for interleukin 17A in T cell-mediated intestinal inflammation. *Nat Immunol.* 10: 603-609.
294. Ransohoff RM (2007) Microgliosis: the questions shape the answers. *Nat Neurosci.* 10: 1507-1509.

295. Shemer A, Jung S (2015) Differential roles of resident microglia and infiltrating monocytes in murine CNS autoimmunity. *Semin Immunopathol.* 3: 613-623.
296. Menzel F, Kaiser N, Haehnel S, Rapp F, Patties I, Schöneberg N, Haimon Z, Immig K, Bechmann I (2017) Impact of X-irradiation on microglia. *Glia.* 66: 15-33.
297. Bruttger J, Karram K, Wörtge S, Regen T, Marini F, Hoppmann N, Klein M, Blank T, Yona S, Wolf Y, Mack M, Pinteaux E, Müller W, Zipp F, Binder H, Bopp T, Prinz M, Jung S, Waisman A (2015) Genetic Cell Ablation Reveals Clusters of Local Self-Renewing Microglia in the Mammalian Central Nervous System. *Immunity.* 43: 92-106.
298. Elmore MR, Najafi AR, Koike MA, Dagher NN, Spangenberg EE, Rice RA, Kitazawa M, Matusow B, Nguyen H, West BL, Green KN (2014) Colony-stimulating factor 1 receptor signaling is necessary for microglia viability, unmasking a microglia progenitor cell in the adult brain. *Neuron.* 82: 380-397.
299. Clift RA, Buckner CD, Appelbaum FR, Bearman SI, Petersen FB, Fisher LD, Anasetti C, Beatty P, Bensinger WI, Doney K (1990) Allogeneic marrow transplantation in patients with acute myeloid leukemia in first remission: a randomized trial of two irradiation regimens. *Blood* 76: 1867-1871.
300. Clift RA, Buckner CD, Appelbaum FR, Bryant E, Bearman SI, Petersen FB, Fisher LD, Anasetti C, Beatty P, Bensinger WI (1991) Allogeneic marrow transplantation in patients with chronic myeloid leukemia in the chronic phase: a randomized trial of two irradiation regimens. *Blood* 77: 1660-1665.
301. Linard C, Marquette C, Mathieu J, Pennequin A, Clarençon D, Mathé D (2004) Acute induction of inflammatory cytokine expression after gamma-irradiation in the rat: effect of an NF-kappaB inhibitor. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 58: 427-434.
302. Böttcher C, Fernández-Klett F, Gladow N, Rolfes S, Priller P (2013) Targeting myeloid cells to the brain using non-myeloablative conditioning. *PLoS One* 8: e80260.
303. Lewis CA, Manning J, Barr C, Peake K, Humphries RK, Rossi F, Krieger C (2013) Myelosuppressive conditioning using busulfan enables bone marrow cell accumulation in the spinal cord of a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS One* 8: e60661.
304. Zhou J, Tang P, Qin L, Gayed PM, Li W, Skokos EA, Kyriakides TR, Pober JS, Tellides G (2010) CXCR3-dependent accumulation and activation of perivascular macrophages is necessary for homeostatic arterial remodeling to hemodynamic stresses. *J Exp Med.* 207: 1951-1966.
305. Tanuma N, Sakuma H, Sasaki A, Matsumoto Y (2006) Chemokine expression by astrocytes plays a role in microglia/macrophage activation and subsequent neurodegeneration in secondary progressive multiple sclerosis. *Acta Neuropathol.* 112: 195-204.
306. Van Weering HR, Boddeke HW, Vinet J, Brouwer N, de Haas AH, van Rooijen N, Thomsen AR, Biber KP (2011) CXCL10/CXCR3 signaling in glia cells differentially affects NMDA-induced cell death in CA and DG neurons of the mouse hippocampus. *Hippocampus* 21: 220-232.

307. Lee J, Breton G, Oliveira TY, Zhou YJ, Aljoufi A, Pühr S, Cameron MJ, Sékaly RP, Nussenzweig MC, Liu K (2015) Restricted dendritic cell and monocyte progenitors in human cord blood and bone marrow. *J Exp Med.* 212: 385-399

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Myeloide Zelldifferenzierung	5
Abbildung 2	Schematische Darstellung der NF- κ B- und I κ B Proteinfamilie	20
Abbildung 3	Vereinfachtes Schema zur Aktivierung von NF- κ B durch den kanonischen Signalweg am Beispiel von TNF	22
Abbildung 4	Schematische Darstellung der Generierung des LysMCre Lokus	24
Abbildung 5	Schematische Darstellung der Generierung von IKK2 Knockout-Mäusen.	25
Abbildung 6	PCR-Programme für die Genotypisierung von <i>LysM</i> , <i>Cre</i> , <i>Ikk2</i> , <i>tdRFP</i> , <i>Cxcr3-wt</i> und <i>Cxcr3-ko</i>	38
Abbildung 7	Genotypisierung der LysMCre IKK2, LysMCre Rosa26 ^{tdRFP} , CX ₃ CR3-WT und -KO Tiere	39
Abbildung 8	Durchflusszytometrische Kontrolle der retroviralen GFP-Transduktion von Knochenmarkzellen	46
Abbildung 9	Schematische Übersicht eines Mausgehirns mit für diese Arbeit relevanten Gehirnstrukturen.....	48
Abbildung 10	Durchflusszytometrische Typisierung transgener C57BL/6 <i>2d2</i> tdRFP Mäuse.....	52
Abbildung 11	Gatingstrategie der tdRFP-exprimierenden myeloiden (CD45 ⁺ CD11b ⁺) und nicht-myeloiden (CD45 ⁺ CD11b ⁻) Zellkompartimente.....	53
Abbildung 12	Schematische Darstellung der genetischen Veränderungen zur Generierung von tdRFP Reportertieren	58
Abbildung 13	Frequenz tdRFP-exprimierender Zellen in LysM ^{tdRFP} - und Kontrolltieren mittels FACS im Blut, Knochenmark, Milz und ZNS.....	65
Abbildung 14	Frequenzen tdRFP-exprimierender Zellen in naiven LysM ^{tdRFP} Mäusen und unter inflammatorischen Bedingungen (EAE) in CerTN L15 LysM ^{tdRFP} Mäusen.....	67
Abbildung 15	Klinischer EAE-Verlauf der IKK2 Mäuse.....	69
Abbildung 16	Immunzellinfiltrate und Demyelinisierungen im Rückenmark von IKK2 ^{mye} und IKK2 ^{wt} Tieren 30 Tage nach Immunisierung mit MOG ₃₅₋₅₅ Peptid.....	70
Abbildung 17	Zytokinkonzentration im Serum der IKK2 Mäuse an Tag 30 nach Immunisierung	71

Abbildung 18	Durchflusszytometrische Kontrolle der intrazellulären Zytokinproduktion von <i>in vitro</i> generierten CD4 ⁺ Th17-Zellen	72
Abbildung 19	Klinischer Verlauf der passiven EAE in IKK2 ^{mye} - und IKK2 ^{wt} Knochenmarkchimäre.....	73
Abbildung 20	Pam ₃ Cys-induzierte Meningitis in IKK2 ^{mye} - und Kontrollmäusen.	75
Abbildung 21	Fotografische Aufnahmen zeigen die 3cm dicke Bleiabschirmung, die die selektive Bestrahlung des Kopfes ermöglicht.....	76
Abbildung 22	Genexpressionsprofile ausgewählter Chemokine im Gehirn nach HI.....	78
Abbildung 23	Genexpressionsprofile ausgewählter Zytokine/Chemokine im Gehirn nach HI bzw. TBI	80
Abbildung 24	Einwanderung Knochenmark-abgeleiteter GFP ⁺ Zellen ins Gehirn 16 Wochen nach HI/TBI.....	82
Abbildung 25	Schema der experimentellen Konditionierungsprotokolle.....	84
Abbildung 26	Konditionierungsabhängige, selektive Einwanderung Knochenmark-abgeleiteter Zellen ins Gehirn	85
Abbildung 27	Einwanderung Knochenmark-abgeleiteter Zellen in den läsionierten Fazialiskern nach TBI bzw. HI (11 Gy) + FNA und KMT	86
Abbildung 28	Zytokinexpression im Hirnstamm mit Fazialiskernen nach HI, HI + FNA und Busulfan + FNA.....	88
Abbildung 29	Charakterisierung und Quantifizierung GFP-exprimierender Zellen im peripheren Blut von HI-, Busulfan-, TBI- und unbestrahlten Mäusen nach FNA	89
Abbildung 30	Einwanderung KM-abgeleiteter, retroviral transduzierter Zellen ins Gehirn von CXCR3-Chimäre.....	91
Abbildung 31	Durchflusszytometrische Analyse der CXCR3-Expression im Gehirn, Knochenmark, Blut, Milz und Lymphknoten von C57/BL6 (WT) bzw. CXCR3-KO Tieren	93

10 Tabellenverzeichnis

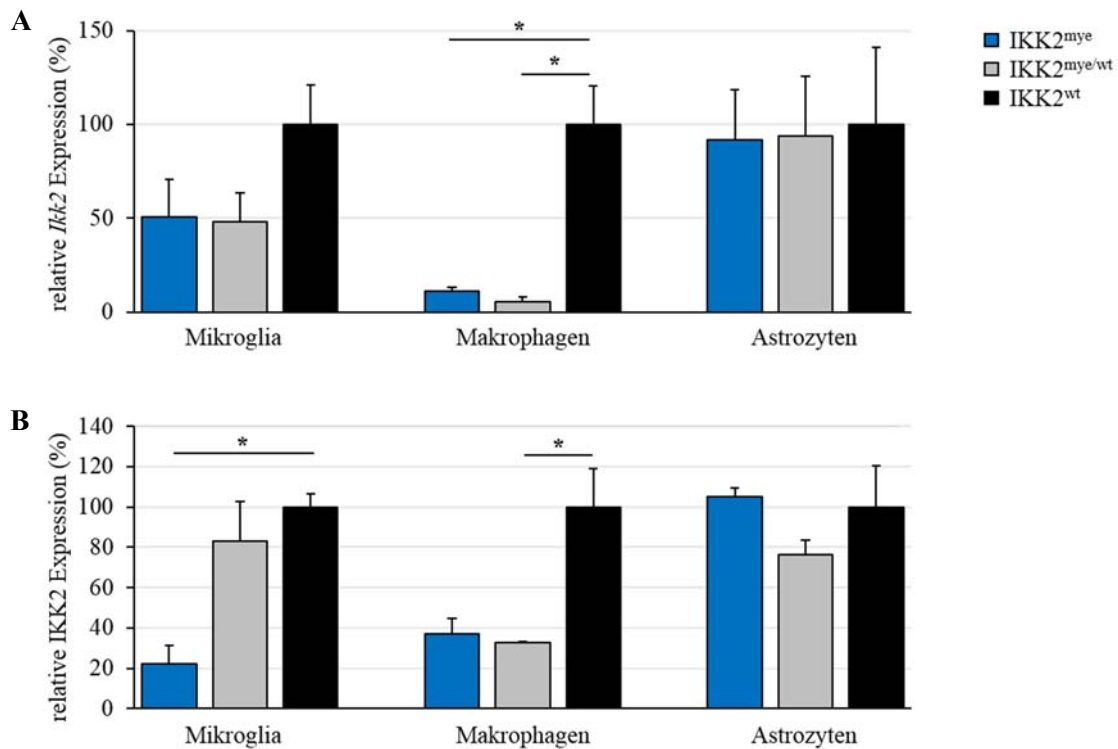
Tabelle 1	Ansatz und Thermocycler-Programm für die GAPDH-PCR.....	40
Tabelle 2	Reaktionsansatz für die quantitative RT-PCR	41
Tabelle 3	Light-Cycler Reaktionsbedingungen und MgCl ₂ -Konzentrationen in der qRT-PCR.....	42
Tabelle 4	Bewertungsparameter für die klinischen Symptome der EAE.....	60

11 Lebenslauf

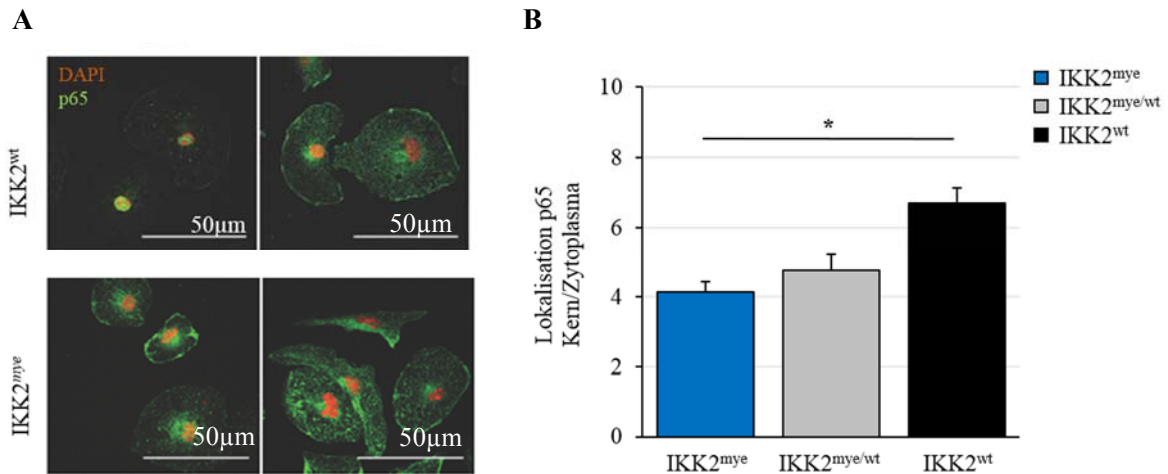
Der Lebenslauf ist in der Online-Version
aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

Der Lebenslauf ist in der Online-Version
aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

12 Anhang

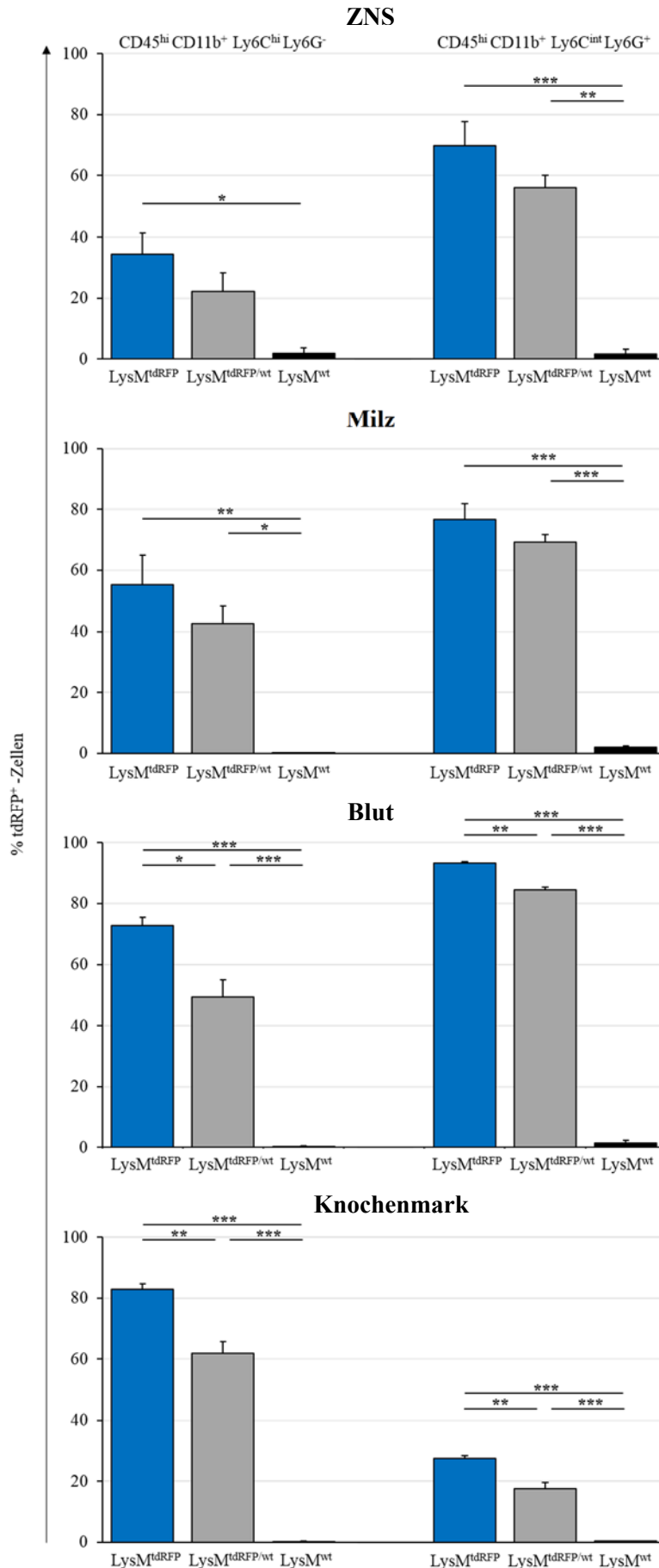


Anhang 1 **IKK2 mRNA- und Proteinlevel in primären Mikrogliazellen, peritonealen Makrophagen und Astrozyten.** **A)** Die *IkK2* mRNA-Expressionslevel wurden über qRT-PCR bestimmt, wobei die Werte gegen GAPDH normalisiert wurden (n=6). **B)** Die Proteinlevels von IKK2 wurden über einen Western Blot analysiert, wobei Aktin als Ladekontrolle diente und dessen Werte zur Normalisierung herangezogen wurden (n = 3). Die Ergebnisse der mRNA- und Proteinlevel sind als relative Expressionsraten gegenüber IKK2^{wt} Mäusen dargestellt und stammen aus der Dissertation von Dr. Katja Blatzej, 2013.^[266] MW ± SEM; *p<0,05 (One-way ANOVA mit dem Bonferroni Posthoc-Test)

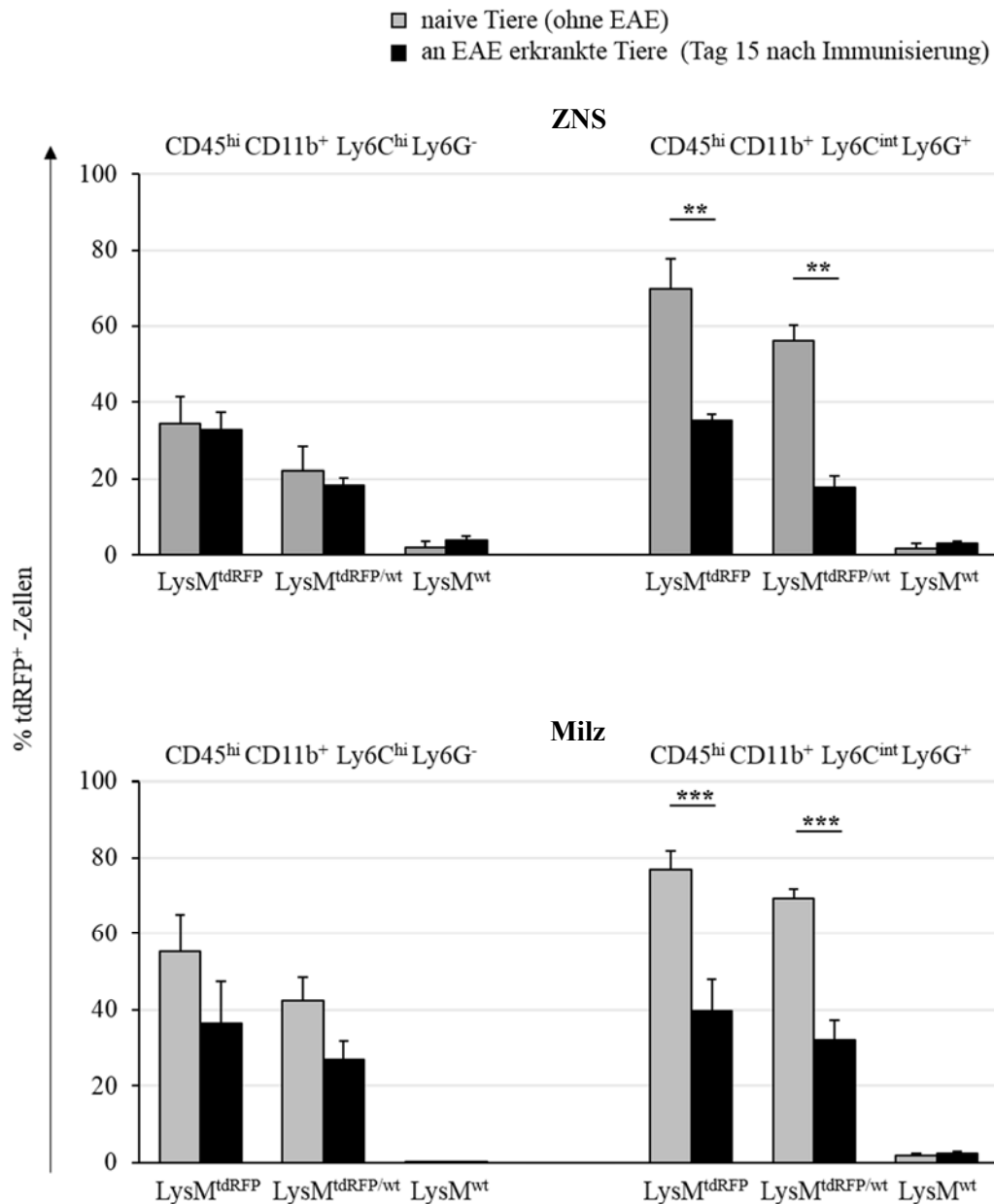


Anhang 2 Kerntranslokation der NF- κ B Untereinheit p65 in primären Mikrogliazellen.

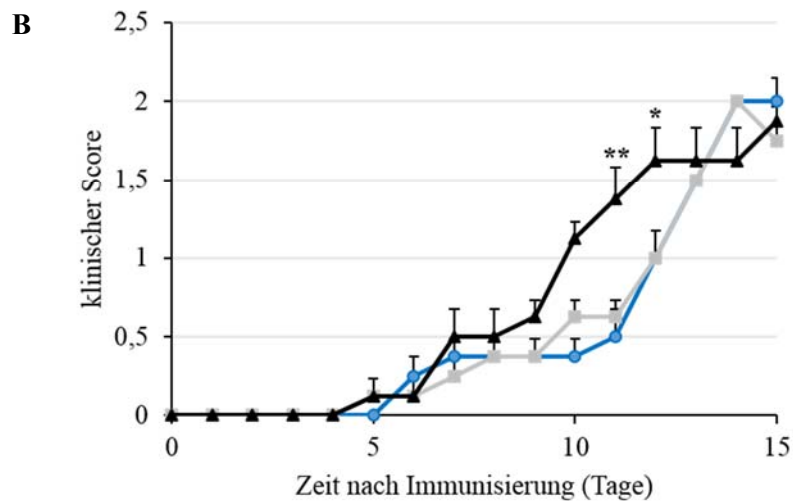
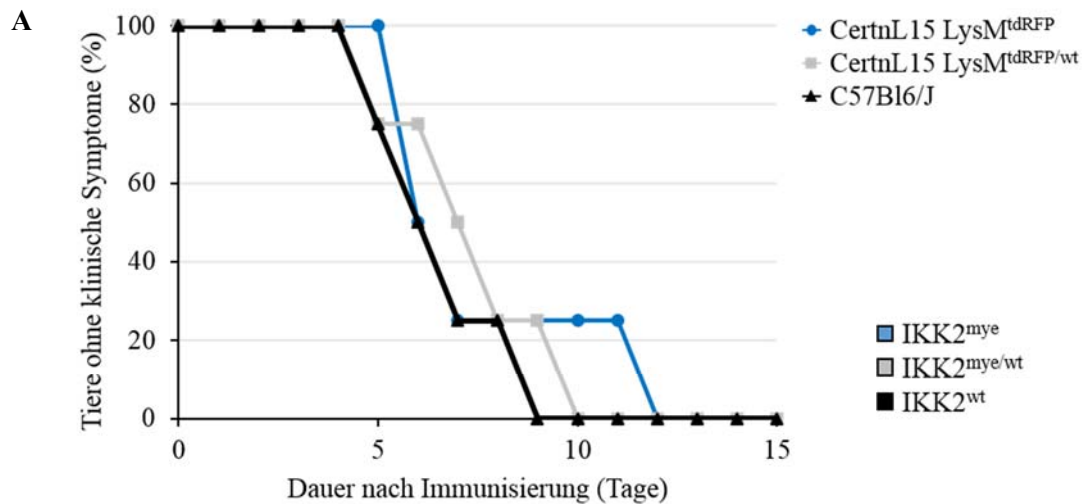
A) Lokalisation der p65 Untereinheit (grün) im Nukleus oder dem Zytoplasma nach 30-minütiger Stimulation der primären Mikrogliazellen mit 1 μ g/ml LPS. Die Zellkerne sind mit DAPI gefärbt (rot); 360-fache Vergrößerung im Konfokalmikroskop. **B)** Quantitative Analyse der p65-Lokalisation im Zytoplasma verglichen mit der Zellkerntranslokation mit Hilfe der Software MATLAB. Die Ergebnisse stammen aus der Dissertation von Dr. Katja Blatzej, 2013.^[266] n = 3. MW \pm SEM; *p<0,05 (One-way ANOVA mit dem Bonferroni Posthoc-Test)



Anhang 3 **Frequenz tdRFP-exprimierender Monozyten (CD45^{hi}CD11b⁺Ly6C^{hi}Ly6G⁻) und Granulozyten (CD45^{hi}CD11b⁺Ly6C^{int}Ly6G⁺) im ZNS, der Milz, dem Blut und dem Knochenmark von LysM^{tdRFP}- und Kontrollmäusen mittels FACS. n=3-4. Die Ergebnisse stammen aus vier unabhängigen Versuchen und wurden zusammen mit Dr. Helena Radbruch generiert. MW ± SEM; *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 (One-way ANOVA mit dem Bonferroni Posthoc-Test)**



Anhang 4 Frequenzen tdRFP-exprimierender Monozyten (CD45^{hi}CD11b⁺Ly6C^{hi}Ly6G⁻) und Granulozyten (CD45^{hi}CD11b⁺Ly6C^{int}Ly6G⁺) im ZNS und der Milz naiver LysM^{tdRFP} Mäuse (graue Balken) und unter inflammatorischen Bedingungen (EAE) in CerTN L15 LysM^{tdRFP} Tieren (hier auch als LysM^{tdRFP} bezeichnet, schwarze Balken). Die Ergebnisse der naiven Tiere stammen aus vier unabhängigen Versuchen (n=3-4), während die Ergebnisse der mit MOG₃₅₋₅₅ Peptid immunisierten Tiere aus einem Versuch stammen (n=3). MW ± SEM; **p<0,01; ***p<0,001 (Two-way ANOVA mit dem Bonferroni Posthoc-Test)

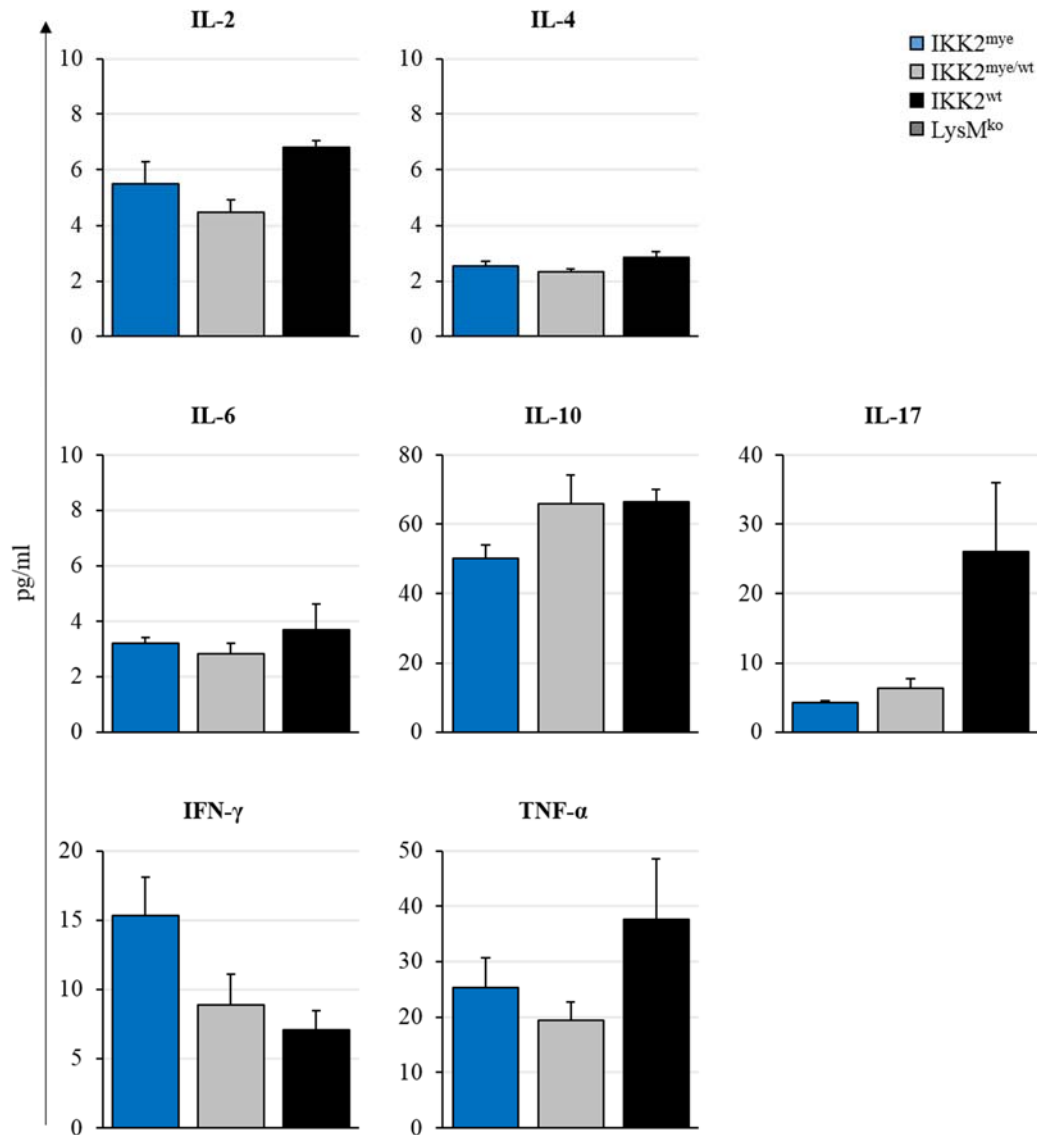


C

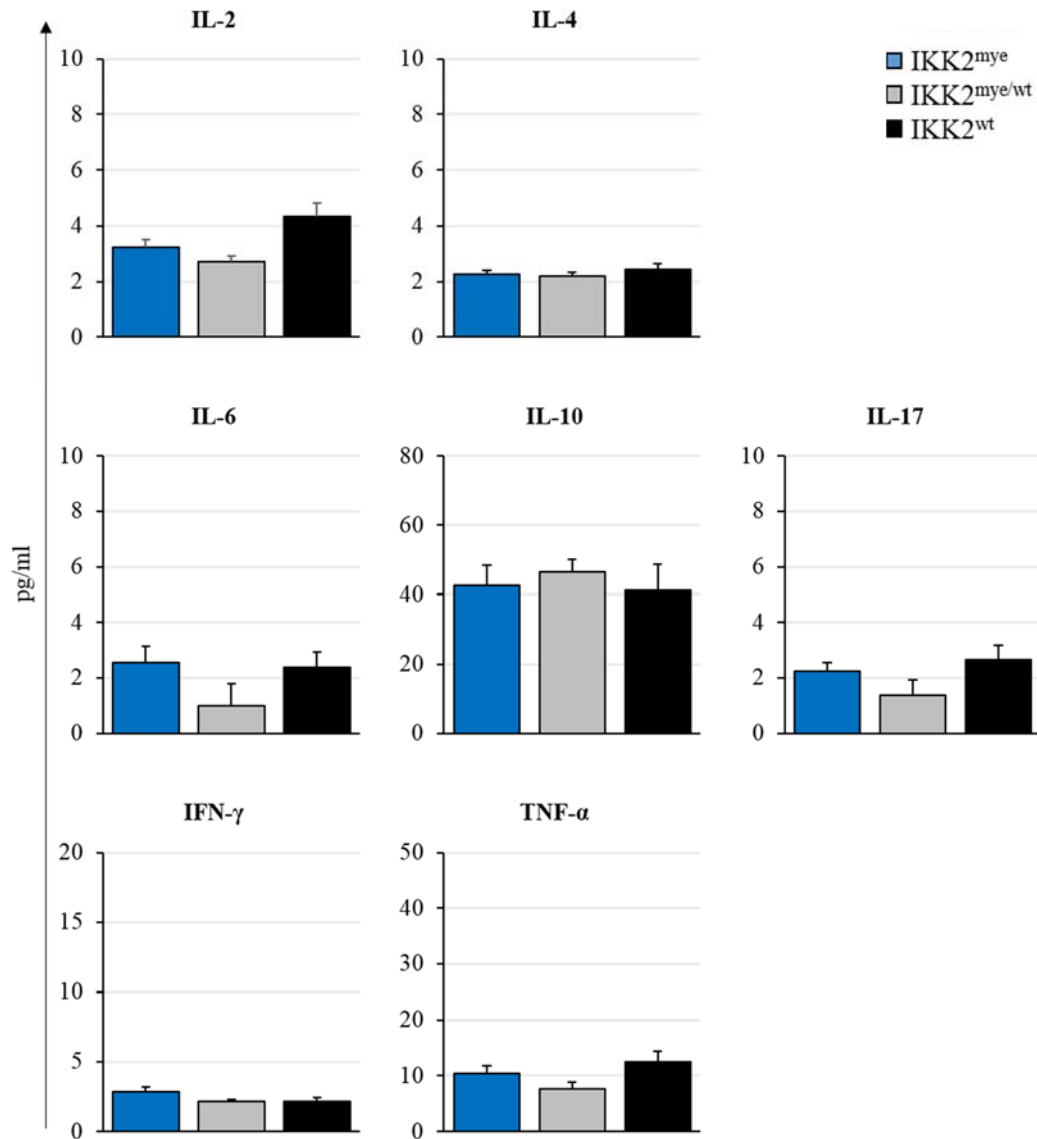
Genotyp	CertnL15 ^{RFP}	CertnL15 ^{RFP/wt}	C57Bl6/J
Inzidenz	4/4	4/4	4/4
AUC	7,8 ± 0,8	7,9 ± 0,8	10,2 ± 1,2
maximaler Score erkrankter Mäuse	2 ± 0	2 ± 0	1,9 ± 0,3
Tag erster klinischer Symptome	7 ± 1	7 ± 1	7 ± 1

Anhang 5 Klinischer Verlauf der aktiven EAE in CertN L15 LysM^{tdRFP}- und Kontrolltieren

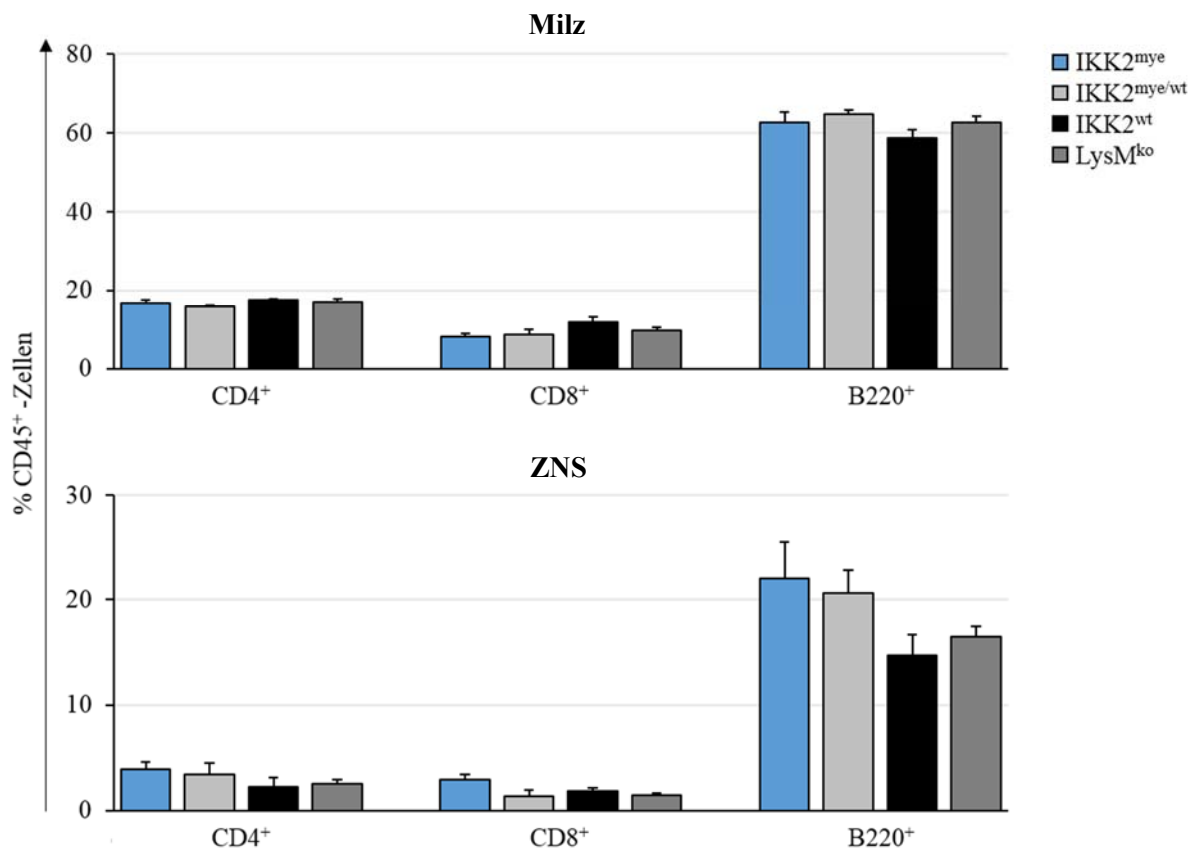
A) EAE-Inzidenz; **B)** Klinischer Score; **C)** Übersicht über Inzidenz, *Area under the curve* (AUC), maximaler Score sowie den Tag erster klinischer Symptome. n=4. MW ± SEM; *p<0,05; **p<0,01; (Two-way ANOVA mit dem Bonferroni Posthoc-Test)



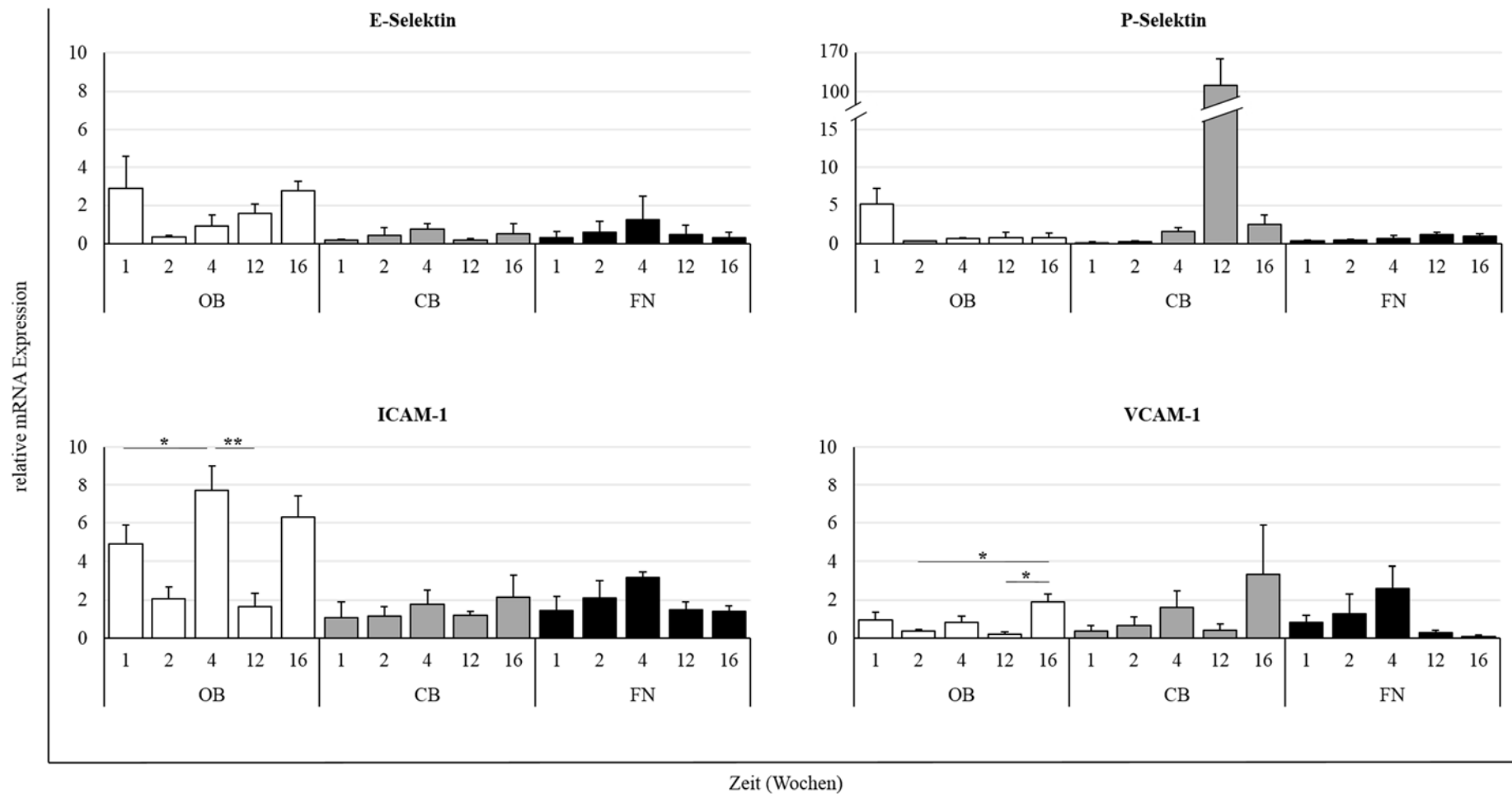
Anhang 6 Zytokinsekretion von *ex vivo* stimulierten Milzzellen mit anti-CD3/anti-CD28. Die Zellen wurden an Tag 30 nach Immunisierung mit MOG₃₅₋₅₅ Peptid aus IKK2^{mye} und Kontrollmäusen isoliert und mit anti-CD3/anti-CD28 stimuliert. Die Konzentration von IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IFN- γ und TNF- α wurde über einen Cytometric Bead Array (CBA) bestimmt. n=3-5. MW \pm SEM; nicht signifikant (One-way ANOVA mit dem Bonferroni Posthoc-Test)



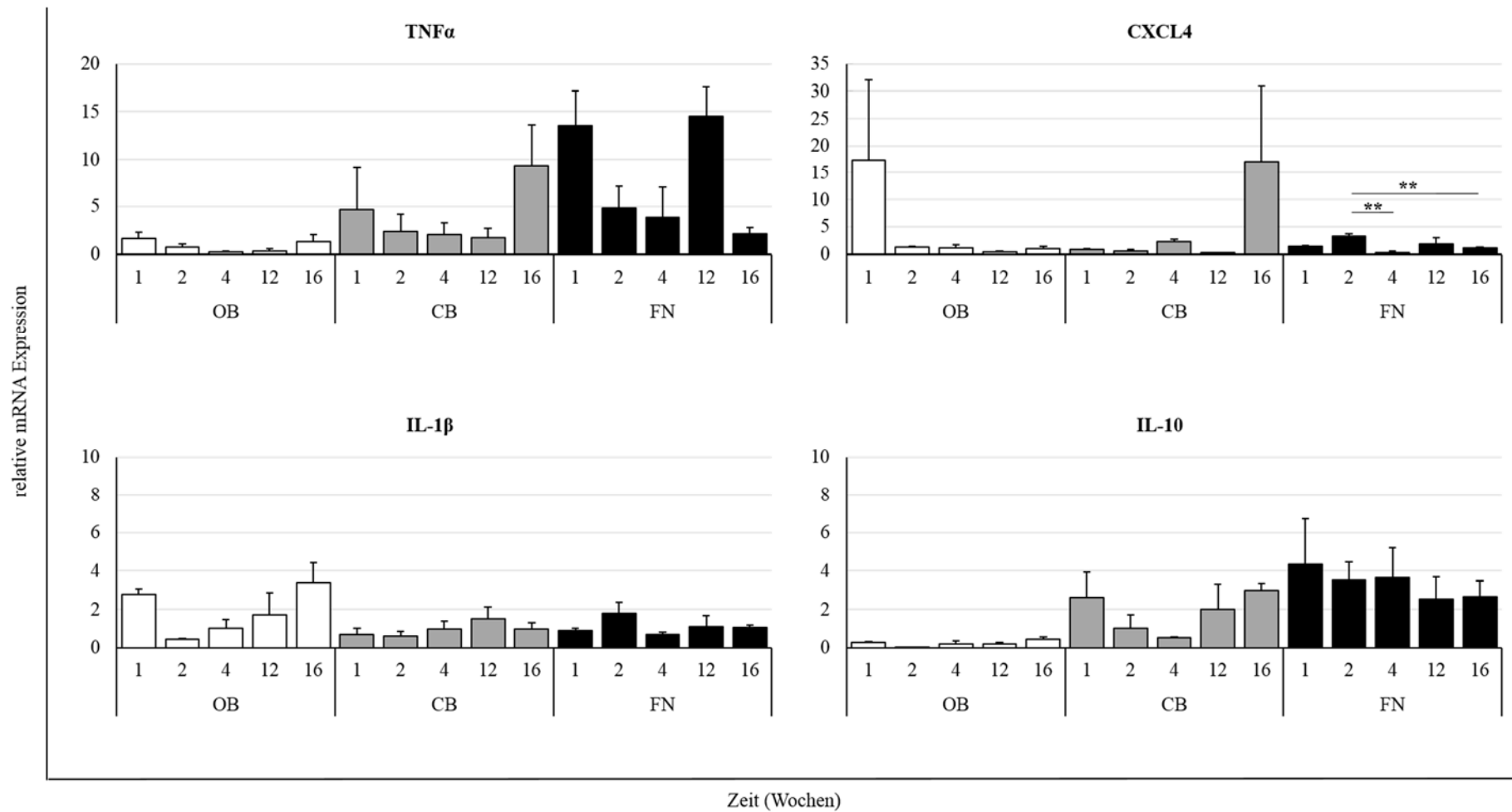
Anhang 7 Zytokinsekretion von *ex vivo* stimulierten Milzzellen mit MOG₃₅₋₅₅. Die Zellen wurden an Tag 30 nach Immunisierung mit MOG₃₅₋₅₅ Peptid aus IKK2^{mye} und Kontrollmäusen isoliert und mit MOG₃₅₋₅₅ Peptid stimuliert. Die Konzentration von IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IFN- γ und TNF- α wurde über einen Cytometric Bead Array (CBA) bestimmt. n=3-5. MW \pm SEM; nicht signifikant (One-way ANOVA mit dem Bonferroni Posthoc-Test)



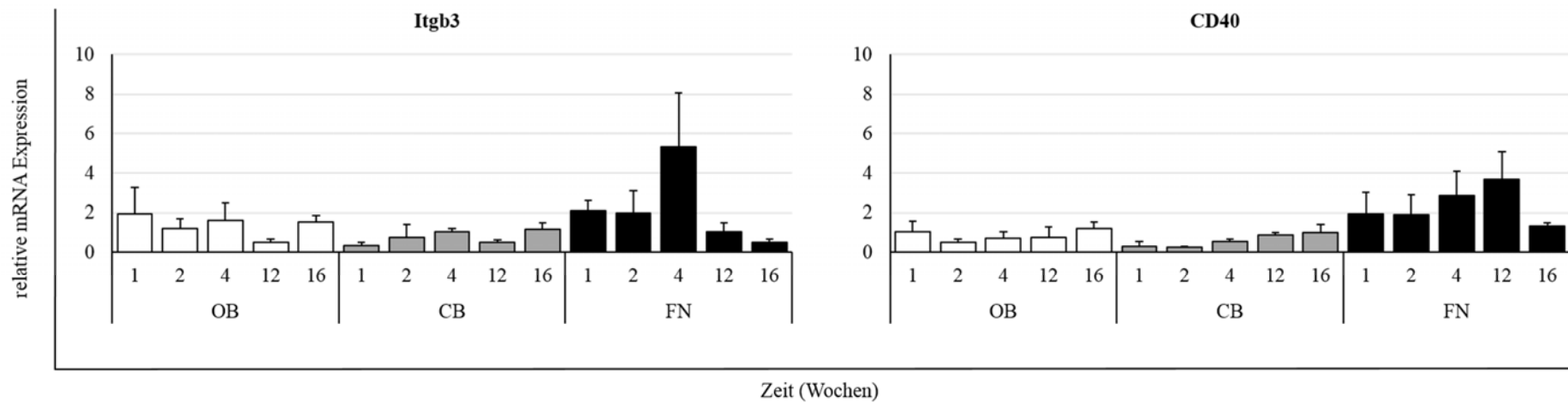
Anhang 8 Durchflusszytometrische Analyse der Lymphozyten in IKK2^{mye}- und Kontrollmäusen nach Meningitis. Dargestellt sind die Frequenzen der B220⁺ B-Zellen, CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen (gegattet auf CD45⁺ lebende Zellen) in der Milz und dem ZNS 24 h nach Meningitisinduktion in IKK2^{mye}- (blaue Balken) und Kontrollmäusen (graue bzw. schwarze Balken). n=4-8. MW ± SEM; nicht signifikant (One-way ANOVA mit dem Bonferroni Posthoc-Test)



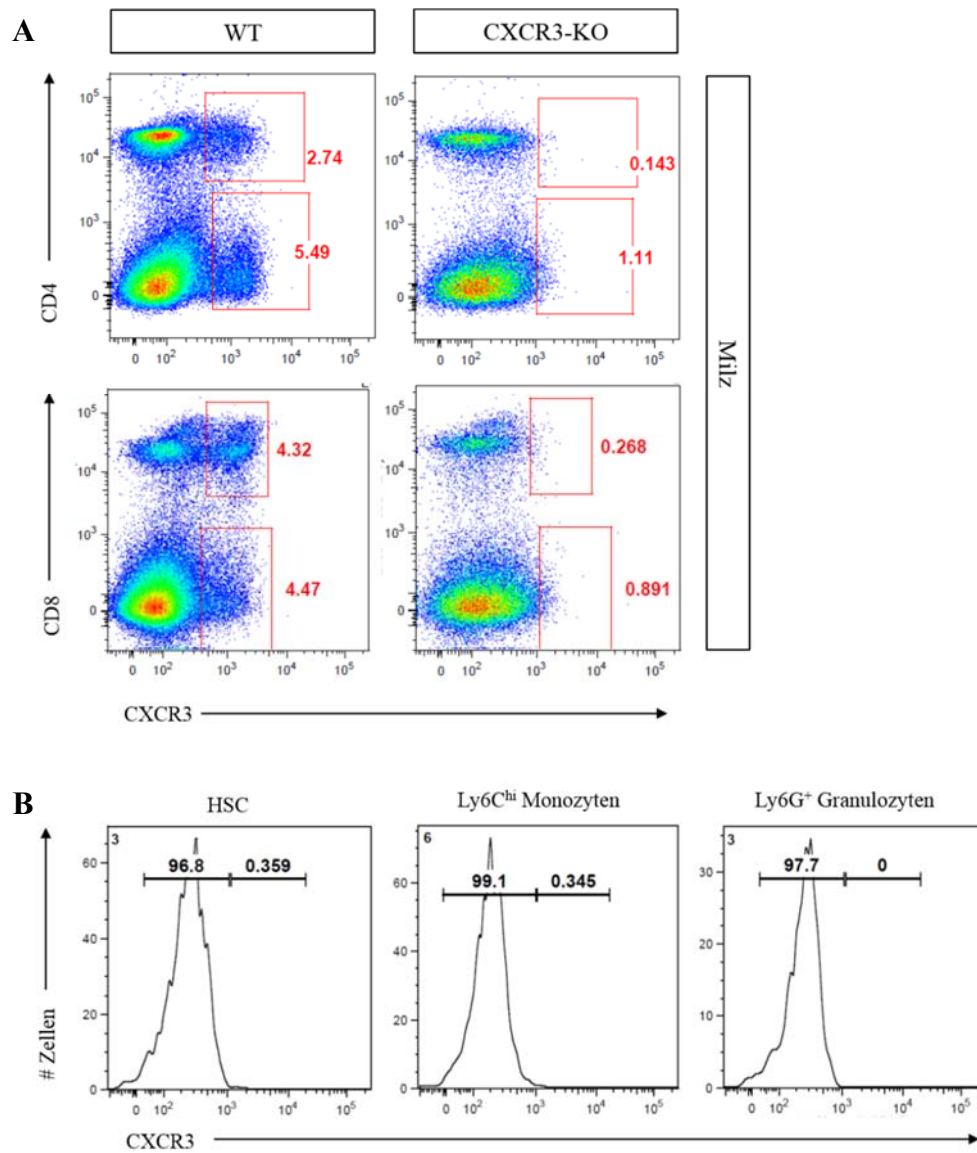
Anhang 9 Genexpressionsprofile von Zelladhäsions- und kostimulatorischen Molekülen im Gehirn nach HI. qRT-PCR von E-Selektin, P-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 im Bulbus olfactorius (OB, weiße Balken), Cerebellum (CB, graue Balken) und Fazialiskernen (FN, schwarze Balken) 1, 2, 4, 12 und 16 Wochen nach Kopfbestrahlung (HI 11 Gy). Die mRNA-Expressionslevel wurden gegen GAPDH normalisiert und sind als Induktionswerte gegenüber unbestrahlten Tieren dargestellt. n=3-4. MW ± SEM; *p<0,05; **p<0,01 (One-way ANOVA mit dem Bonferroni Posthoc-Test)



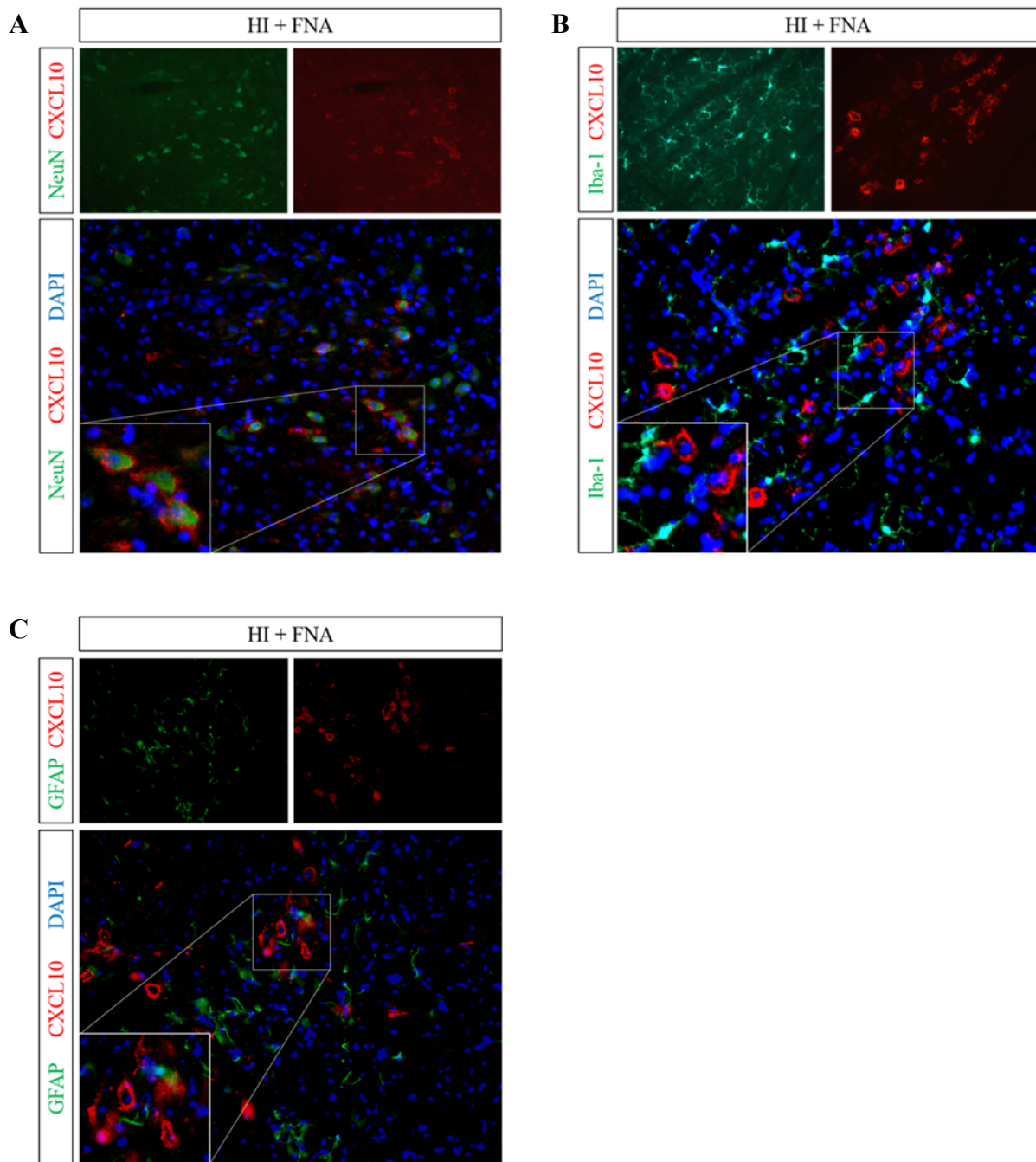
Anhang 10 Genexpressionsprofile von Zytokinen und Chemokinen im Gehirn nach HI. qRT-PCR von TNF- α , CXCL4, IL-1 β und IL-10 im Bulbus Olfactorius (OB, weiße Balken), Cerebellum (CB, graue Balken) und Fazialiskernen (FN, schwarze Balken) 1, 2, 4, 12 und 16 Wochen nach Kopfbestrahlung (HI 11 Gy). Die mRNA-Expressionslevel wurden gegen GAPDH normalisiert und sind als Induktionswerte gegenüber unbestrahlten Tieren dargestellt. n=3-4. MW \pm SEM; **p<0,01 (One-way ANOVA mit dem Bonferroni Posthoc-Test)



Anhang 11 Genexpressionsprofile von Zelladhäsions- und kostimulatorischen Molekülen im Gehirn nach HI. qRT-PCR von Itgb3 und CD40 im Bulbus olfactorius (OB, weiße Balken), Cerebellum (CB, graue Balken) und Hirnstamm mit Fazialiskernen (FN, schwarze Balken) 1, 2, 4, 12 und 16 Wochen nach Kopfbestrahlung (HI 11 Gy). Die mRNA-Expressionslevel wurden gegen GAPDH normalisiert und sind als Induktionswerte gegenüber unbestrahlten Tieren dargestellt. n=3-4; MW ± SEM; nicht signifikant (One-way ANOVA mit dem Bonferroni Posthoc-Test)



Anhang 12 Charakterisierung CXCR3-exprimierender Zellpopulationen in Milz (A) und Knochenmark (B) von C57/BL6 (WT) bzw. CXCR3 Tieren. B) HSCs, Ly6C^{hi}-Monozyten und Ly6G⁺-Granulozyten exprimieren im Knochenmark von WT Tieren kein CXCR3. HSCs, Ly6C^{hi}-Monozyten und Ly6G⁺-Granulozyten wurden nach der in Abbildung 29 dargestellten Gatingstrategie (ohne GFP-Gating) identifiziert.



Anhang 13 Histologische Schnitte des Faziliskerns nach HI (11 Gy) + FNA zeigen die Colokalisation von CXCL10 (rot) und NeuN (grün; A), während CXCL10 nicht mit Mikroglia (Iba-1, grün; B) oder Astrozyten (GFAP, grün; C) colokalisiert ist.

13 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen herzlich bedanken, die mit Rat und Tat zum Anfertigen dieser Doktorarbeit maßgeblich beigetragen haben.

Für die Überlassung des Promotionsthemas und die langjährige Betreuung meiner Doktorarbeit möchte ich Herrn Prof. Dr. Josef Priller sehr herzlich danken. Die fachlichen Diskussionen mit ihm haben mich stets motiviert meine Ergebnisse kritisch zu hinterfragen und mein wissenschaftliches Interesse von neuem belebt.

Bei Herrn Prof. Dr. Stephan Siegmann bedanke ich mich für seine Tätigkeit als Gutachter der Doktorarbeit.

Dr. Chotima Böttcher und Dr. Helena Radbruch danke ich für ihre fachliche Unterstützung beim Erlernen der verwendeten Methoden, der Hilfestellung bei der Planung sowie der Durchführung der Experimente. Beide zeigten mit ihren fundierten wissenschaftlichen Kenntnissen und ihrer Diskussionsbereitschaft stets neue Perspektiven auf.

Bei allen Mitarbeitern der AG Priller und der Experimentellen Neurologie möchte ich mich für die wundervolle Arbeitsatmosphäre am Institut bedanken, die mir auch an langen Versuchstagen ein Durchhalten erleichtert hat. Besonders hervorheben möchte ich in diesem Zusammenhang Dr. Francisco Fernández-Klett, Dr. Jojanneke Huck, Christian Böttcher, Jasmin Jamal El-Din und Peggy Mex, die mir methodisch und organisatorisch immer mit Rat und Tat zur Seite standen.

Für die Einarbeitung in die durchflusszytometrischen Techniken gilt ein besonderer Dank Dr. Desiree Kunkel, der Leiterin des durchflusszytometrischen Labors am BCRT.

Zu guter Letzt möchte ich meiner ganzen Familie danken, die mich während der Zeit der Doktorarbeit immer unterstützt haben und für ihr Verständnis in den letzten Jahren.

Vor allem meinem Mann und meinen beiden wundervollen Kindern danke ich für ihre Geduld und die ruhigen Momente in den letzten Monaten und Jahren, die es mir ermöglichten, diese Arbeit zur Vollendung zu bringen. Darüber hinaus danke ich meinen Eltern für ihre liebevolle Unterstützung und ihren steten Ermutigungen.

14 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass die vorliegende Dissertation selbständig und ohne unerlaubte Hilfsmittel angefertigt habe.

Bei der Verfassung der Dissertation wurden keine anderen als die im Text aufgeführten Hilfsmittel verwendet.

Ein Promotionsverfahren wurde zu keinem früheren Zeitpunkt an einer anderen Hochschule oder bei einem anderen Fachbereich beantragt.

Ort, Datum

Unterschrift