

Die Rolle von IL-4 bei der durch Th-2-Zellen vermittelten Stimulation des
axonalen Auswachsens nach mechanischer Verletzung

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

Daniel Hechler
aus Berlin

Oktober 2009

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von September 2003 bis Mai 2008 im Institut für Zell- und Neurobiologie, Centrum für Anatomie, Charité-Universitätsmedizin unter der Leitung von Prof. Dr. Robert Nitsch angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Robert Nitsch
2. Gutachter: Prof. Dr. Thomas Blankenstein

Disputation am: 05.05.2010

„Die Definition von Wahnsinn ist, immer wieder das Gleiche zu tun und andere Ergebnisse zu erwarten.“

-Albert Einstein-

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	VII
Zusammenfassung	XI
Summary	XIII
1. Einleitung	1
1.1 Immunsystem	1
1.1.1 Aufbau und Funktion des Immunsystems.....	1
1.1.2 T-Lymphozyten.....	2
1.1.2.2 T-Helferzellen.....	4
1.1.3 Zytokine und Zytokinrezeptoren	6
1.1.3.2 IL-4 und IL-4-Rezeptor-Signalweg	10
1.2 Nervensystem.....	14
1.2.1 Aufbau und Funktion des Nervensystems	14
1.2.2 Hippocampus.....	16
1.2.2.1 Aufbau und Funktion des Hippocampus	16
1.2.2.2 Zytoarchitektur des Hippocampus.....	16
1.2.2.3 Projektionen des Hippocampus	18
1.2.2.4 Funktion, Neuropathologie und Neurogenese des Hippocampus	20
1.2.3 Das Rückenmark	21
1.2.3.1 Allgemeine Strukturen des Rückenmarks	21
1.2.3.2 Rückenmarkquerschnitt	21
1.2.4 Neuroregeneration.....	23
1.2.4.1 Neuroregeneration im ZNS	23
1.2.4.2 Neurotrophine	24
1.2.4.3 Neurotrophin-Rezeptoren.....	25
1.3 Wechselwirkung zwischen Immunsystem und ZNS.....	26
1.3.1 Rolle von T-Lymphozyten in der Neuroinflammation.....	26
1.3.2 Neuroprotektive Autoimmunität.....	29
1.3.3 Rolle von Th2-Zellen bei neuropathologischen Prozessen	30
1.4 Zielsetzung der Arbeit.....	32

2. Material und Methoden	33
2.1 Material	33
2.1.1 Tierstämme und Haltung	33
2.1.2 Zelllinien.....	34
2.1.3 rekombinante Proteine.....	34
2.1.4 Antikörper	34
2.1.5 Seren.....	35
2.1.6 Kits.....	35
2.1.7 Medien und Zusätze	36
2.1.8 Chemikalien.....	36
2.1.9 Geräte und Materialien	38
2.1.10 Primer.....	40
2.1.11 Lösungen und Puffer	41
2.2 Methoden.....	47
2.2.1 Zellkultur.....	47
2.2.1.1 Primäre Zellkultur.....	47
2.2.1.1.1 Präparation von primären Astrozyten und Mikrogliazellen.....	47
2.2.1.1.2 Präparation von primären Neuronen	47
2.2.1.1.3 Präparation von primären T-Zellen	48
2.2.1.1.4 Restimulation von T-Zellen.....	49
2.2.1.1.5 Aufreinigung der T-Zellen durch <i>Magnetic Activated Cell Sorting (MACS)</i>	50
2.2.1.1.6 Qualitätsüberprüfung der T-Zell-Seperation mittels Durchflußzytometrie.....	51
2.2.1.1.7 Auftauen von T-Zellen	53
2.2.1.1.8 Einfrieren von T-Zellen	53
2.2.1.1.9 Charakterisierung der T-Zellen mittels ELISA.....	53
2.2.1.1.10 IL-4-Depletions-Assay	53
2.2.1.1.11 CFSE-Markierung von T-Zellen.....	54
2.2.1.1.12 Kultivierung von J558-Zellen	54

2.2.1.2. Entorhinal-Hippocampale Schnittkulturen	55
2.2.1.2.1 Kokulturen	56
2.2.1.2.2 Präparation organotypischer entorhinal- hippocampaler Schnittkulturen	56
2.2.1.2.3 Kollagen-Kokulturen	56
2.2.1.2.4 Kollagen-Kokulturen mit blockierenden Antikörpern und Substanzen	58
2.2.1.2.5 Kollagen-Kokulturen mit rekombinanten Proteinen	59
2.2.1.2.6 Auswertung Kollagen-Kokulturen	59
2.2.1.2.7 GFP-Kokultur.....	60
2.2.1.2.8 Präparation der EGFP-Kokultur.....	61
2.2.1.2.9 Auswertung der EGFP-Kokulturen	63
2.2.2 Molekularbiologie.....	64
2.2.2.1 RNA-Isolation.....	64
2.2.2.2 cDNA-Synthese	65
2.2.2.3 DNA-Isolation.....	66
2.2.2.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	66
2.2.2.5 Polymerase-Kettenreaktion.....	67
2.2.2.5.1 PCR zum Genotypisieren von Mauslinien	67
2.2.2.5.2 PCR zum Nachweiß von β -Aktin und IL-4-Rezeptor.....	70
2.2.2.6 Native Agarose-Gelelektrophorese	70
2.2.2.7 Real-Time PCR.....	71
2.2.2.7.1 Relative Quantifizierung	73
2.2.3 Proteinchemie.....	73
2.2.3.1 Protein-Assay.....	73
2.2.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration über BCA-Test.....	75
2.2.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)	75
2.2.3.4 Western-Blot	76
2.2.3.5 Immuno-Blot.....	77
2.2.3.5.1 Immunologischer Nachweis.....	77
2.2.3.6 Beseitigen von Antikörper-Antigen Bindungen im Immuno-Blot.....	78

2.2.3.7	ELISA.....	78
2.2.4	<i>In vivo</i> Regenerationsmodell	79
2.2.4.1	Rückenmarkläsion (RML).....	79
2.2.4.2	DAB-Entwicklung	84
2.2.4.3	Auswertung der Rückenmarkläsion.....	85
2.2.4.4	Injektion von CFSE markierten Th2-Zellen	87
2.2.5	Statistische Analysen.....	87
3.	Ergebnisse	89
3.1	Charakterisierung der verwendeten Zellen	89
3.2	Th2-Zellen stimulieren das axonale Auswachsen von organotypisch entorhinalen Kortex-Schnittkulturen durch IL-4.....	91
3.3	Expression des IL-4-Rezeptors.....	98
3.4	Der stimulierende Effekt von Th2-Zellen auf das axonale Auswachsen von entorhinalen Kortex- Schnittkulturen wird über den IL-4-Rezeptor vermittelt	101
3.5	Akt- und MAP-Kinase sind an der durch Th2-Zellen vermittelten Stimulation des axonalen Auswachsens beteiligt	104
3.6	Th2-Zellen stimulieren das Einwachsen von Axonen	110
3.7	Zusammenhang zwischen der Th2-Zellen vermittelten Stimulation der axonalen Regeneration und Neurotrophin-Rezeptoren	113
3.8	IL-4 produzierende Zellen stimulieren die Axon-Regeneration <i>in vivo</i>	118
4.	Diskussion.....	123
4.1	Th2-Zellen stimulieren das axonale Auswachsen.....	123
4.2	Zusammenhang von IL-4 und Neurotrophinen beim axonalen Auswachsen	133
4.3	Th2-Zellen stimulieren das axonale Auswachsen im <i>in vivo</i> Model der Rückenmarkläsion	138
4.4	Th2-Zellen und IL-4 als Therapie nach mechanischen Verletzungen des ZNS.....	143

5. Literatur.....	147
Publikationsverzeichnis.....	165
Lebenslauf	167
Danksagung.....	169
Eidesstattliche Erklärung.....	171

Abkürzungsverzeichnis

Ak	Antikörper
APP	Akute-Phasen-Protein
APS	Ammonium-persulfat
APZ	Antigen-präsentierende Zelle
BDA	Dextran Biotin
BDNF	<i>Brain-derived neurotrophic factor</i>
BME	Basal Medium Eagle
bp	Basenpaare
BSA	bovine Serum Albumin
CA	Cornu ammonis
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CFSE	<i>carboxyfluorescein succinimidyl ester</i>
CST	Corticospinaler Trakt
CTL	cytotoxische T-Zelle
DAB	Diamino Benzidin
DEPC	Diethylen Pyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinacid
DNase	Desoxyribonuclease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EAE	Experimentelle Autoimmun-Enzephalomyelitis
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
EGTA	<i>ethylene glycol tetraacetic acid</i>
EK	entorhinaler Kortex
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent Assay</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FCS	fötale Kälberserum
FOXP3	Forkhead-Box-Protein
GD	Gyrus dentatus

GDP	Guanosin-5'-diphosphat
GM-CSF	Granulozyten- und Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
Grb	<i>Growth factor receptor-bound protein</i>
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
HBSS	<i>Hanks' Balanced salt Solution</i>
HRP	<i>horseraddish peroxidase</i>
HSP	<i>Heat shock protein</i>
IFA	inkomplettes Freundsches Adjuvants
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IGF	Insulin Wachstumsfaktor
IL	Interleukin
IP3	Inositoltriphosphat
IRS	Insulin-Rezeptor-Substrat
Jak	Janus-Familie von Proteinkinasen
kDa	Kilodalton
KSF	Kolonie-stimulierende Faktor
LT	Lymphotoxin
MACS	<i>magnetic activated cell sorting</i>
MAG	Myelin assoziiertes Glycoprotein
MBP	Myelin-basisches Protein
MEK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MEM	<i>Minimum Essential Medium</i>
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
MS	Multiple Sklerose
NBE	<i>Neuro Basal Medium</i>
NGF	<i>Nerve growth factor</i>
NHS	normales Pferdeserum
NK-Zellen	natürliche Killer-Zellen
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NO	Stickstoffmonoxid
NT	Neurotrophin
NTR	Neurotrophin-Rezeptor

Omgp	Oligodendrozyten-Myelin-Glycoprotein
OVA	Ovalbumin
PB	Phosphatpuffer
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PI3-K	Phosphoinositol-3-Kinase
PIP2	Phosphatidylinositol-bisphosphat
PLC	Phospholipase
PNS	peripheres Nervensystem
PTB	phosphotyrosin-bindende-Domäne
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	ribonucleic acid
rpm	Umdrehung
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SDS	Natriumdodecylsulfat
SH2	Src-homologe Domäne
SOP	<i>Standard Operating Procedure</i>
SOS	<i>Son of sevenless</i>
Stat	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
TBE	Trisbase-Borsäure-EDTA-Puffer
TBS	Trisgepufferte Salzlösung
TCR	T-Zell-Rezeptor
TGF	Transformierender Wachstumsfaktor
Thy-1	Thymozyten-Differenzierungs-Antigen-1
Th-Zelle	T-Helferzelle
TNF	Tumornekrosefaktor
TP	Tractus perforans
Treg Zelle	regulatorische T-Zelle
Trk	Tropomyosin-Rezeptor-Kinase
UV	Ultraviolett
ZNS	zentrales Nervensystem

Zusammenfassung

Die Rolle von T-Zellen in Prozessen nach einer Verletzung oder Erkrankung des Zentralen Nervensystems (ZNS) ist bisher nicht eindeutig aufgeklärt. Es gibt Hinweise, dass T-Helferzellen (Th-Zellen) sowohl neurodegenerative als auch neuroprotektive Eigenschaften haben können. Neuere Untersuchungen lassen den Schluss zu, dass die unterschiedlichen Ergebnisse aufgrund verschiedener Subpopulationen von Th-Zellen entstanden sind. Die Subpopulationen unterscheiden sich durch ihre Zytokin-Expression. Dabei scheinen die Th1-Zellen, die besonders viel Interferon- γ (IFN- γ) produzieren, eher an neurodegenerativen Effekten beteiligt zu sein. Demgegenüber stehen die Th2-Zellen, die viel Interleukin-4 (IL-4) produzieren und eher an neuroprotektiven Effekten beteiligt zu sein scheinen. Untersuchungen der Th2-Zellen konnten zeigen, dass sie nicht nur eine neuroprotektive Wirkung haben, sondern das Auswachsen von primär geschädigten Axonen positiv beeinflussen können. Somit konnte erstmals für Th2-Zellen eine neuroregenerative Wirkung nachgewiesen werden.

Unter Verwendung eines in der Arbeitsgruppe entwickelten Kollagen-Kokulturassays, in dem organotypische entorhinale Kortex-Schnittkulturen eingesetzt wurden, konnte erstmals gezeigt werden, dass Th2-Zellen das axonale Auswachsen durch ihr Markerzytokin IL-4 stimulieren. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass IL-4 nicht nur ein notwendiger Faktor der Th2-Zellen war, sondern auch allein ohne T-Zell-Kontext die Stimulation vermittelte. Die Verwendung von Schnittkulturen transgener Mäuse, in denen spezifisch Signalwege des IL-4 ausgeschaltet waren, zeigte, dass die IL-4-Rezeptoren in den Schnittkulturen notwendig waren, um eine IL-4-induzierte Stimulation zu beobachten. Darüber hinaus wurde eine Beteiligung der intrazellulären Signalmoleküle Akt- und MAP-Kinase an der IL-4-induzierten Stimulation des axonalen Auswachsens nachgewiesen. Diese Ergebnisse wurden durch den Einsatz von inhibierenden Substanzen der Akt- und MAP-Kinase bestätigt. Zusätzlich zu dem Kollagen-Kokulturassay, mit dem axonales Auswachsen untersucht werden konnte, wurde ein EGFP-Kokulturassay verwendet, der eine Untersuchung von axonalen Einwachsprozessen ermöglichte. Es konnte somit gezeigt werden, dass Th2-Zellen oder IL-4 eine stimulierende Wirkung auf die axonale Reinnervation haben. Aufgrund dieses Ergebnisses konnte erstmals eine Reinnervation bestätigt werden, die sich von dem Prozess des reaktiven Sproutings

unterscheidet. Dabei gibt es Hinweise auf eine Beeinflussung des intrazellulären Neurotrophin-Signalweges durch IL-4. Besonders eindrucksvoll waren die Ergebnisse der *in vivo* Analysen zum Einfluss von Th2-Zellen und IL-4 auf eine axonale Regeneration nach mechanischer Verletzung im Rückenmark. Dabei konnten die Th2-Zellen die Regeneration des verletzten Korticospinalen Traktes in einem Umfang stimulieren, den man aus Anti-Nogo-Therapien kannte. Lokal fixierte Plasmazytomzellen, die hohe Mengen an IL-4 produzierten, hatten ebenfalls eine unterstützende Wirkung, wenngleich diese nur in unmittelbarer Nähe der Zellen zu messen war.

Somit konnte IL-4 als ein Faktor identifiziert werden, der nicht nur als immunologisch wirkende Substanz eingesetzt werden kann, sondern möglicherweise seinen Einsatz zukünftig auch in der Behandlung von mechanischen Verletzungen des ZNS findet.

Summary

The role of T cells in processes after injury or illness of the central nervous system (CNS) is not cleared up unambiguously. There are references that T helper (Th) cells can have neurodegenerative as well as neuroprotective qualities. Newer investigations allow the speculation that the different results account of different T cell subpopulations. These subpopulations differ by their cytokine expression. Thereby the Th1 cells, which produce particularly high amounts of Interferon- γ (IFN- γ), seem to be involved rather in neurodegenerative effects. On the other hand the Th2 cells, which produce high Interleukin-4 (IL-4) level, seem to be involved rather in neuroprotective effects. Investigations of the Th2 cells could show that they not only influence neuroprotective effects but also the outgrowing of primarily injured axons therefore a neuroregenerative effect of Th2 cells could be proved for the first time. A collagen co-culture assays developed in the working group in which organotypic entorhinal cortex explants were used could demonstrate for the first time that Th2 cells stimulate axonal growth through their marker cytokin IL-4. What is more, it could be proven that IL-4 was not only a necessary factor of the Th2 cells, but could also mediate the stimulation alone without a T cell context. The use of cultivated explants of transgenic mice in which specific signal pathways of the IL-4 receptor were switched off, could demonstrate that the IL-4 receptors were necessary in the explants to observe an IL-4-induced stimulation. In addition, a participation of the intracellular signal molecules Akt- and MAP-Kinase was proven in the IL-4-induced stimulation of axonal outgrowth. These results were confirmed by the application of inhibitors of Akt- and MAP-Kinase. In addition to the collagen co-culture assays in which axonal outgrowth could be examined, an EGFP co-culture assay which allowed an investigation of axonal ingrowth/ reinnervation processes was used. It could be demonstrated that Th2 cells and IL-4 have a stimulating effect on axonal ingrowth/ reinnervation. On account of this result a reinnervation which differs from the process of reactive sprouting could be confirmed for the first time. In addition, there are results which indicate an influence of intracellular neurotrophin signaling by IL-4. The results of *in vivo* analyses on the influence of Th2 cells and IL-4 on axonal reinnervation after mechanical injury in the spinal cord were especially impressive. The Th2 cells could stimulate the regeneration of the injured corticospinal tract in an extent which is known from Anti-Nogo-A treatment. Locally attached plasmocytoma

cells which produced high amounts of IL-4 also had a supporting effect, though this was to be measured only in immediate proximity of the cells. Therefore IL-4 could be identified as a factor which not only can be used as an immunological active substance, but possibly finds his application in future also in the treatment of mechanical injuries of the CNS.

1 Einleitung

1.1 Immunsystem

1.1.1 Aufbau und Funktion des Immunsystems

Unser Immunsystem macht es möglich, dass wir in einer Umgebung mit pathogenen Mikroorganismen wie Viren, Bakterien, Pilzen und eukaryotischen Parasiten überleben können, ohne permanent krank zu sein oder an ihnen zu versterben. Es hat die Fähigkeit, zwischen selbst und fremd, harmlos und gefährlich zu unterscheiden. Das Immunsystem ist für die Eliminierung der Pathogene verantwortlich und besitzt ein Gedächtnis, was zu einer sogenannten Immunität gegen einige aber nicht alle Erreger führt. Die angeborene Immunität und die adaptive/erworbene Immunität sind die beiden Prinzipien, auf denen das Immunsystem basiert (für eine allgemeine Übersicht: [1]).

Die angeborene Immunität reagiert unspezifisch auf Erreger, hat sowohl humorale als auch zellvermittelte Komponenten und ist phylogenetisch der ältere Teil des Immunsystems. Zur zellulären Immunantwort gehören Neutrophile, Eosinophile, Basophile, Monozyten/Makrophagen sowie natürliche Killer-Zellen (NK-Zellen). Zur humoralen Immunantwort gehören das Komplement-System, Lektine, Zytokine und Defensine. Mithilfe dieser Komponenten ist das Immunsystem in der Lage, innerhalb von Minuten, auf einen eingedrungenen pathogenen Erreger zu reagieren und eine Abwehr einzuleiten [2]. Dabei kommt es nicht zu einer klonalen Expansion der spezifischen Abwehrzellen oder der Ausbildung eines immunologischen Gedächtnis [3]. Die Abwehrzellen exprimieren verschiedene Rezeptoren, die jeweils ein bestimmtes pathogenes Muster erkennen und somit die Immunzellen aktivieren. Diese Zellen werden durch die Aktivierung dazu angeregt, lösliche Botenstoffe (Zytokine) zu produzieren, welche die nachgeschaltete Immunantwort regulieren [4]. Die Zellen der angeborenen Immunität sind auf die Phagozytose oder direkte Zerstörung infizierter Zellen spezialisiert, wobei sie auf bestimmte Proteine wie das Akute-Phase-Protein (APP) oder Antikörper-Antigen-Komplexe reagieren [1].

Die erworbene Immunität kommt erst verzögert zum Zug, ist pathogen-spezifisch und besteht ebenfalls aus einem humoralen und einen zellulären Teil. Bei der adaptiven Immunität ist das wichtigste Prinzip die klonale Selektion von Immunzellen, durch eine spezifische Antigen-Rezeptorbindung [2]. Der humorale Teil der erworbenen Immunität wird durch Antikörper-bildende B-Lymphozyten abgedeckt [5].

Bei Säugetieren erfolgt die Reifung der B-Lymphozyten im Knochenmark. Dabei führt eine somatische Rekombination der Immunglobulin-Gene zur Bildung eines Immunglobulin-Rezeptors, der spezifisch für ein Antigen ist. Nachdem die reife B-Zelle mit ihrem Antigen über Rezeptor-Antigen-Bindung in Kontakt gekommen ist, vermehrt sie sich stark und schüttet Antikörper aus, die dem Immunglobulin-Rezeptor auf der Zelloberfläche entsprechen. Die Antikörper helfen durch Bindung an ihre Antigene, wie z. B. Toxine, diese zu inaktivieren oder markieren Pathogene für das angeborene Immunsystem als fremd. Einige B-Zellen werden nach erfolgter Aktivierung zu Gedächtniszellen, die zwischen Monaten und Jahren überleben können. Diese Gedächtniszellen garantieren eine schnelle Immunantwort nach erneutem Kontakt mit demselben Pathogen.

1.1.2 T-Lymphozyten

Die T-Lymphozyten bilden den zellulären Anteil des erworbenen Immunsystems [6]. Wie B-Lymphozyten entstehen sie im Knochenmark und auch bei ihnen führt somatische Rekombination der Gene zur Ausbildung eines Antigen-spezifischen Rezeptors. Die endgültige Reifung der Zellen findet im Thymus und nicht im Knochenmark statt. Ein weiterer Unterschied ist, dass T-Lymphozyten ihr Antigen nur dann erkennen, wenn es durch körpereigene Moleküle, den *Major Histocompatibility Complex* (MHC), präsentiert wird. In ihrem Reifungsprozess werden T-Lymphozyten positiv selektioniert, wenn sie die eigenen MHC-Moleküle erkennen. Danach werden sie negativ selektioniert, wenn sie körpereigene Proteine erkennen, d. h. sie werden durch Apoptose eliminiert. Alle reifen T-Lymphozyten tragen als Erkennungszeichen den CD3-Rezeptor. Innerhalb der Population werden zwei weitere Untergruppen unterschieden. Es gibt T-Lymphozyten die einen CD8-Rezeptor tragen, sogenannte zytotoxische T-Killer-Zellen und andere, die den CD4-Rezeptor tragen. Die CD4⁺-Zellen werden auch T-Helferzellen (Th-Zellen) genannt. Sowohl die CD8⁺- als auch die CD4⁺-Zellen haben denselben Ursprung, erfüllen aber innerhalb des Immunsystems völlig unterschiedliche Aufgaben. Beiden gemein ist die Tatsache, dass sie zunächst durch spezialisierte Zellen aktiviert werden müssen, wobei neben der Rezeptor-Antigen-Bindung noch ein weiteres kostimulatorisches Signal benötigt wird. Bei diesem zweiten kostimulatorischen Molekül handelt es sich z. B. um B7.1 und B7.2, die beide durch den CD28-Rezeptor auf der Oberfläche der T-Lymphozyten erkannt werden. Die spezialisierten Zellen werden professionelle

Antigen-präsentierende Zellen (APZs) genannt und besitzen neben MHC-I- und MHC-II-Molekülen auch die anderen benötigten Oberflächenmoleküle (Adhäsionsmoleküle). Es gibt drei Hauptklassen von spezialisierten APZs in den peripheren lymphatischen Organen: Dendritische Zellen, Makrophagen und B-Lymphozyten. CD8⁺-Zellen werden durch Antigen-präsentierende MHC-Moleküle der Klasse I und CD4⁺-Zellen durch Antigen-präsentierende MHC-Moleküle der Klasse II aktiviert. Das kostimulatorische Signal ist notwendig, damit die T-Lymphozyten verstärkt Interleukin-2 (IL-2) synthetisieren und ausschütten [1]. Gleichzeitig werden sie dazu angeregt, vermehrt IL-2 Rezeptoren an der Oberfläche zu präsentieren. Das IL-2 wirkt dabei sowohl auf benachbarte Zellen (parakrin) als auch auf die Ursprungszelle (autokrin) und regt die Proliferation und auch die Reifung in eine Effektorzelle an. Die Aktivierung der T-Lymphozyten zu Effektorzellen verändert das Expressionsmuster diverser Oberflächenrezeptoren und ermöglicht, dass die Funktionen der Zelle auch ohne weitere kostimulierende Signale ausgeführt werden können. Naive CD8⁺-Zellen sind schon sehr früh in ihrer Entwicklung dazu bestimmt, zytotoxische Zellen zu werden und können nach ihrer Reifung im Thymus auf zwei Arten aktiviert werden. Entweder durch eine potente APZ, die neben dem Antigen/MHC-I-Komplex auch noch das kostimulatorische Signal liefert, oder durch eine CD4⁺-Zelle. Dazu müssen sowohl eine CD4⁺- als auch eine CD8⁺-Zelle an dieselbe APZ gebunden sein. Die aktivierte CD4⁺-Zelle kann die APZ dazu anregen, vermehrt B7.1 oder B7.2 zu präsentieren. Gleichzeitig sezerniert die CD4⁺-Zelle vermehrt IL-2, was bei der Proliferation und Differenzierung der CD8⁺-Zelle hilft [7]. Die Aufgabe der CD8⁺-Zellen ist es, körpereigene Zellen wie z. B. Makrophagen, die durch intrazelluläre Pathogene wie Viren befallen sind, abzutöten. Damit soll eine weitere Verbreitung der Erreger verhindert werden. Das Abtöten erfolgt entweder durch die Aktivierung von Fas/Apo-1 auf der befallenen Zelle und somit der Einleitung der Apoptose oder die CD8⁺-Zelle schüttet Zytotoxine aus. Zu den Zytotoxinen gehören Perforin, das transmembrane Poren verursacht, oder Granzyme, die als Serinproteasen an der intrazellulären Aktivierung der Apoptose beteiligt sind. Außerdem produzieren die zytotoxischen T-Lymphozyten die Zytokine Interferon- γ (IFN- γ) und Tumornekrosefaktor- α und - β . IFN- γ hat einen direkten inhibitorischen Effekt auf die virale Replikation und induziert die vermehrte Expression von MHC-I, wodurch die Wahrscheinlichkeit erhöht wird, dass die infizierte Zelle von CD8⁺-Zellen als befallen erkannt wird. Außerdem aktiviert IFN- γ Makrophagen und rekrutiert diese

zu Infektionsstellen, um dort sowohl als Effektorzelle als auch als APZ zu fungieren. TNF- α und $-\beta$ haben einen synergistischen Effekt mit IFN- γ bei der viralen Inhibition oder der Makrophagenaktivierung. Wie wichtig CD8⁺-Zellen bei der Kontrolle von Infektionen sind, wird z. B. bei der HIV-Infektion deutlich. Die CD8⁺-Zellen sind für die anfängliche Kontrolle der Virämie verantwortlich [8]. Während das Schicksal der CD8⁺-Zellen als zytotoxische Zellen von vornherein festgelegt ist, findet bei den CD4⁺-Zellen eine frühe aber entscheidende Prägung in verschiedene Richtungen statt.

1.1.2.2 T-Helferzellen

Die unreifen Th0-Effektor T-Lymphozyten können entweder eine Th1-Zelle, Th2-Zelle oder Treg-Zelle werden (siehe Abbildung 1.1) [9-12]. Welche genauen Mechanismen für die Prägung verantwortlich sind, ist nicht vollständig geklärt, aber das Zytokinmilieu, durch infektiöse Substanzen und andere Zellen verursacht, hat einen wichtigen Einfluss [13, 14]. Die T-Helferzellen werden durch Präsentation ihres Antigens durch MHC-II-Moleküle aktiviert, die anders als die MHC-I-Moleküle nicht auf allen Körperzellen vorkommen. MHC-I-Moleküle sind entscheidend an Abstoßungsreaktionen nach Transplantationen beteiligt. Die Th1-Zellen, die auch als inflammatorische T-Helferzellen bezeichnet werden, sind durch eine hohe Produktion der Zytokine IFN- γ , IL-2 und IL-12 gekennzeichnet und stehen durch Makrophagenaktivierung im Dienst der zellulären Immunantwort. Die Th2-Zellen hingegen produzieren vor allem IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13 und steuern die humorale Immunantwort, indem sie B-Lymphozyten dazu anregen Antikörper zu produzieren, insbesondere der Klasse IgE [9]. Die Zytokine der Th2-Zellen, besonders IL-4 und IL-10 hemmen die Entstehung von Th1-Zellen und somit auch die Aktivierung von Makrophagen und Entzündungen, weshalb sie auch „anti-inflammatorische“ T-Helferzellen heißen. Innerhalb des Immunsystems spielen sie eine sehr wichtige Rolle bei der Bekämpfung von extrazellulären Pathogenen, da diese durch vermehrt gebildeten Antikörper gebunden werden können. Außerdem haben sie eine wichtige Rolle bei allergischen Reaktionen durch die Anregung der IgE-Produktion und Aktivierung von Mastzellen [11, 15].

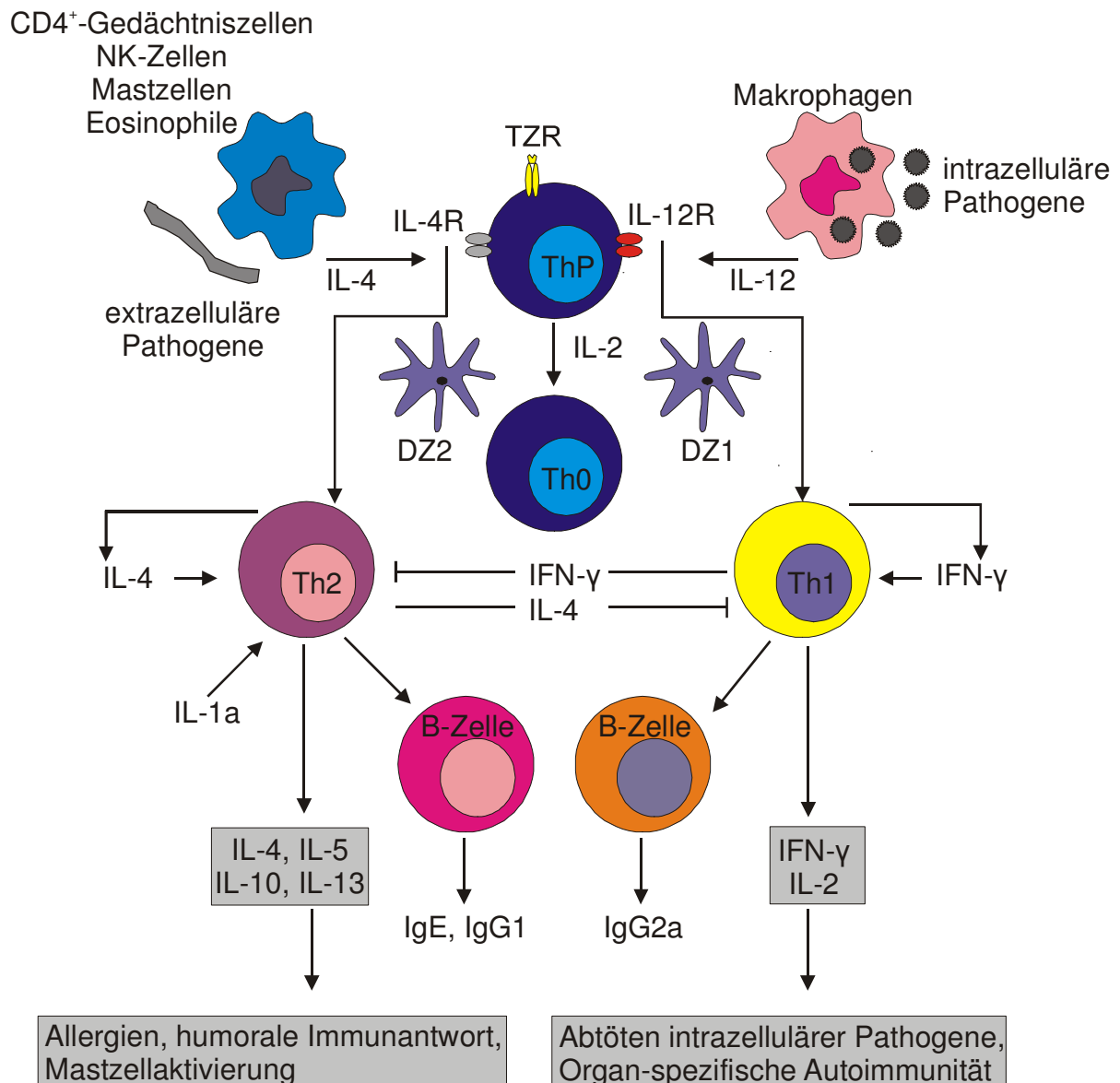


Abb. 1.1 Schematische Darstellung der Induzierung und Regulation von Th1- und Th2-Zellen nach [9]

ThP= Vorläufer-T-Helferzelle; Th0= aktivierte, unpolarierte T-Helferzelle; TZR= T-Zell-Rezeptor; IL= Interleukin; IL-R= Interleukin-Rezeptor; DZ= Dendritische Zelle; Ig= Immunglobulin

Mittlerweile sind noch weitere T-Lymphozyten charakterisiert worden, die weder dem Th1- noch dem Th2-Phänotyp entsprechen und so das Th1/Th2-Paradigma beendeten [16, 17]. Die so genannten Th17-Zellen sezerniert Th17, IL-6 und TNF- α [18] und kommen vermehrt in der Haut und dem Gastrointestinaltrakt vor, also an Schnittstellen zwischen Körper und Umwelt [19-21]. Sie bekämpfen Bakterien durch eine entzündliche Reaktion, indem sie Defensine produzieren und Neutrophile anlocken. Die durch Th17-Zellen vermittelte Entzündungsreaktion kann negative

Folgen haben, was bei chronisch-entzündlichen Erkrankungen wie z. B. der rheumatoiden Arthritis, Morbus Crohn oder der Psoriasis vulgaris beobachtet werden kann [18, 22, 23]. Th17-Zellen werden bei allen genannten Erkrankungen in dem jeweiligen Gewebe gefunden und das IL-17 induziert und verstärkt proinflammatorische Mediatoren, wie z. B. IL-1, Cyclooxygenase-2 und Matrixmetalloproteinasen. Außerdem inhibiert IL-17 z. B. die Proteoglykan-Synthese und induziert gleichzeitig den Proteoglykan-Abbau, was besonders bei der Rheumatoiden Arthritis für einen Teil der Beschwerden verantwortlich ist.

Eine weitere wichtige Lymphozyten Subpopulation sind die regulatorischen T-Zellen (Treg-Zellen), die früher als Suppressor-T-Zellen bezeichnet wurden. Ihre Funktion besteht darin, die Aktivierung des Immunsystems zu unterdrücken und dadurch die Selbsttoleranz des Immunsystems zu regulieren, wodurch die Entstehung von Autoimmunkrankheiten verhindert wird [24, 25]. Zu den Treg-Zellen gehören CD4⁺-CD25⁺-Treg-Zellen, TR1-Zellen und Th3-Zellen, die sich aufgrund ihrer Funktion, Oberflächenmoleküle und sezernierten Proteine unterscheiden lassen. Die natürlich vorkommenden CD4⁺-CD25⁺-Treg-Zellen können über die Expression des Transkriptionsfaktors Forkhead-Box-Protein-3 (FOXP3) bestimmt werden und produzieren die Zytokine IL-4, IL-10 und TGF- β [26]. Zusätzlich exprimieren sie nur wenige IL-7-Rezeptoren auf ihrer Zelloberfläche. Es gibt zudem noch zwei Antigen-induzierbare Treg-Zellen. Die TR1-Zellen sezernieren IL-10, IFN- γ , TGF- β und IL-15 aber kein IL-2 oder IL-4, was sie in dieser Kombination deutlich von Th1- oder Th2-Zellen unterscheidet [16]. Die Th3-Lymphozyten produzieren TGF- β , IL-4 und IL-10 [27].

1.1.3 Zytokine und Zytokinrezeptoren

Zytokine sind Proteine, die regulierend auf Wachstum und Differenzierung von Körperzellen wirken. Es werden fünf 5 Gruppen von Zytokinen unterschieden: Kolonie-stimulierende Faktoren (KSF), Chemokine, Tumornekrosefaktoren, Interferone und Interleukine [1].

Zu den KSF gehören Wachstumsfaktoren der Erythrozyten und Leukozyten wie z. B. das Erythropoetin (EPO), das normalerweise von der Niere produziert wird, um Erythrozyten zu bilden. Es findet seinen Einsatz als Medikament [28], wird aber auch als Dopingmittel in Ausdauersportarten missbraucht [29]. Ein Wachstumsfaktor der

Leukozyten ist z. B. der Granulozyten-KSF, der unter anderen bei Schäden des Knochenmarks nach einer Chemotherapie eingesetzt wird [30].

Chemokine fungieren chemotaktisch und veranlassen Zellen, mit passenden Rezeptoren zur Quelle der Chemokine zu wandern (Chemotaxis). Aufgrund der Anzahl und Position von Cystein (Aminosäure) und Disulfidbrücken, lässt sich eine Einteilung in vier Klassen durchführen: CC-Familie, CXC-Familie, CX3C-Familie und C-Familie.

Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) ist ein multifunktionseller Botenstoff des Immunsystems, welcher bei lokalen und systemischen Entzündungsreaktionen beteiligt ist. TNF- α wird hauptsächlich von Makrophagen aber auch von Lymphozyten, Mastzellen, Endothelzellen, Herzmuskelzellen, Fibroblasten und neuronalen Zellen ausgeschüttet und regelt die Aktivität verschiedener Immunzellen. TNF kann Apoptose, Zellproliferation, Zelldifferenzierung oder die Ausschüttung anderer Zytokine induzieren. Außerdem löst es Fieber aus und hat einen Effekt auf den Fettstoffwechsel, die Koagulation und die Insulinresistenz.

Interferone (IFN) sind Zytokine, die Zellen dazu anregen, Proteine zu bilden, die sie gegen virale Infektionen widerstandsfähiger machen oder Tumore bekämpfen. Es wird differenziert zwischen IFN- α , - β und - γ , die von Monozyten/Makrophagen, Th1-Zellen oder Fibroblasten gebildet werden. IFN wird auch als Medikament bei verschiedenen Krankheiten eingesetzt z. B. IFN- β bei Multipler Sklerose (MS) [31] und IFN- α bei einer Hepatitis-C Infektion [32].

Die Interleukine haben eine sehr große Anzahl an Untergruppen und dienen Leukozyten als Kommunikationsmittel, wodurch die Abwehr von Erregern oder Tumorzellen koordiniert wird. Besonders die T-Lymphozyten verwenden Interleukine zur Kommunikation.

Für alle Zytokine gilt, dass sie nie von nur einem Zelltyp produziert werden und nur auf einen Zelltyp wirken, sind also pleiotrop. Dabei kann ihre Wirkung in Abhängigkeit vom Typ der Zielzelle sehr unterschiedlich ausfallen und verschiedene Interleukine können auf eine Zelle denselben Effekt haben, d. h. sie sind ebenfalls redundant. In der Tabelle 1.1 sind die wichtigsten Zytokine mit ausgewählten Funktionen aufgelistet.

Tab 1.1 Übersicht der häufigsten Zytokine und ihr Effekt auf verschiedene Zellen aus [1]

Zytokine	T-Zellen Quelle	Effekt auf				
		B-Zellen	T-Zellen	Makrophagen	hämatopoetische Zellen	Somatische Zellen
IL-2	Th0,Th1 CTL*	Wachstum ↑ J-Ketten Synthese	Wachstum ↑	-	NK –Zell Wachstum ↑	-
IFN-γ	Th1, CTL	Differenzierung IgG2a Synthese	inhibiert Th2-Zell- Wachstum	Aktivierung ↑ MHC I + II	aktiviert NK-Zellen	antiviral, ↑ MHC I + II
LT, TNF-β	Th1,CTL*	inhibiert	tötet	Aktivierung, NO ↑	aktiviert Neutrophile	tötet Fibroblasten und Tumorzellen
IL-4	Th2	Aktivierung, Wachstum IgG1, IgE MHC II ↑	Wachstum, Überleben	inhibiert Makrophagen Aktivierung	↑ Wachstum Mastzellen	-
IL-5	Th2	Differenzierung IgA Synthese	-	-	↑ Diff. und Wachstum Eosinophile	-
IL-10	Th2	MHC II ↑	inhibiert Th1-Zellen	inhibiert Zytokin Freisetzung	stimuliert Mastzellen Wachstum	-
IL-3	Th1,Th2 CTL*	-	-	-	Wachstumsfaktor für Hämatopoetische Vorläufer-Zellen	-
TNF-α	Th1, Th2* CTL*	-	-	Aktivierung, NO ↑	-	aktiviert mikrovaskuläres Endothelium
GM-KSF	Th1, Th2* CTL*	Differenzierung	inhibiert Wachstum	Aktiviert Diff. in Dendritischen Zellen	↑ Produktion von Granulozyten und Makrophagen	-
TGF-β	CD4+ Zellen	Wachstum ↓, IgA ↑	-	Aktivierung ↓	aktiviert Neutrophile	inhibiert/ stimuliert Zellwachstum

CTL= cytotoxische T-Zelle; IL= Interleukin; Ig= Immunglobulin; LT= Lymphotoxin;

TNF= Tumornekrosefaktor; TGF= Transformierender Wachstumsfaktor; ↑= stimuliert; ↓= inhibiert;

GM-CSF= Granulozyten- und Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor; *= nicht alle

Alle Zytokine funktionieren über Rezeptoren, die aufgrund von genetischen, strukturellen oder funktionellen Eigenschaften in vier Gruppen eingeteilt werden können: Immunglobulin-Superfamilie, TNF-Rezeptor-Familie, Chemokin-Rezeptor-Familie und Hämatopoietin-Rezeptor-Familie.

Die Rezeptoren der Immunglobulin-Superfamilie haben strukturelle Ähnlichkeit mit den Immunglobulinen (Antikörpern). Dazu gehören z. B. T-Zell-Rezeptor (TCR), die

Antigen-präsentierenden Moleküle MHC-I und -II, Korezeptoren wie CD4 und CD8, kostimulatorische Rezeptoren wie B7.1 und B7.2, Adhäsionsmoleküle wie VCAM, Zytokin- und Wachstumsrezeptoren, der Mastzellen-Wachstumsrezeptor c-kit oder das Thymozyten-Differenzierungs-Antigen-1 (Thy-1) [1].

Zu den Mitglieder der TNF-Rezeptor Familie gehören die beiden Rezeptoren TNF-RI und TNF-RII, der FAS/Apo-1-Rezeptor, der Trail-Rezeptor sowie die Rezeptoren der Nervenwachstums-Faktoren. Beide TNF-Rezeptoren aktivieren über Zwischenschritte die Transkriptionsfaktorn NF- κ B und c-jun-Kinase (JNK) und beeinflusst so Zelldifferenzierung, Zytokinproduktion oder die Apoptose, wobei die Apoptose sowohl induziert als auch inhibiert werden kann [33]. Über den TNF-R1 wird die Apoptose induziert, indem spezifische Caspasen aktiviert werden. Auch Fas/Apo-1 oder der Trail-Rezeptor aktivieren die Apoptose über Caspasen, wobei der Trail-Rezeptor dies hauptsächlich in Tumorzellen vermittelt [34].

Es sind 19 Chemokin-Rezeptoren bekannt, die alle 7 transmembrane Strukturen besitzen und über G-Proteine die Signalweitergabe steuern. Die G-Protein Untereinheiten aktivieren z. B. die Phospholipase-C (PLC), was zur Bildung von *Second Messengers* wie Inositoltriphosphat (IP₃) führt. IP₃ führt häufig zu einem intrazellulären Ca⁺-Einstrom, der z. B. die MAP-Kinase aktiviert. Als Folge kommt es zu Chemotaxis, Degranulierung, Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies oder einer Änderung der Bindungsfähigkeit (Avidität) von Adhäsionsmolekülen der Integrin-Familie. Wie auch die Chemokine können die Chemokin-Rezeptoren in vier Chemokin-Rezeptor-Klassen aufgeteilt werden: CXC-Rezeptoren, CC-Rezeptoren, CX3C-Rezeptoren und XC-Rezeptoren [35].

Zu der Hämatoepoetin-Rezeptor-Familie gehören die meisten Interleukin-Rezeptoren wie IL-2 und IL-4 Rezeptor oder der Erythropoetin Rezeptor [36]. Diese Rezeptoren sind meist kleine, die Membran nur einmal durchspannende Rezeptoren, ohne eigene Kinase-Aktivität. Durch die Bindung ihres Liganden findet die Bildung eines dimeren Membran-Komplexes statt. Dieser Komplex wird entweder mit zwei gleichen Rezeptoren (Homodimer) oder mit zwei verschiedenen Rezeptoren (Heterodimer) gebildet. Dieser dimere Komplex ist in der Lage, Tyrosin-Kinasen (JAK-Kinasen) zu aktivieren, die ihrerseits durch Phosphorylierung weitere Moleküle der Signalkaskade aktivieren.

1.1.3.2 IL-4 und IL-4-Rezeptor-Signalweg

Die Interleukine zählen zu den Zytokinen und sind körpereigene Botenstoffe, die vor allem von Immunzellen verwendet werden. Sie sind in der Reihenfolge ihrer Entdeckung in mehrere Untergruppen unterteilt. Die Wirkung der Interleukine kann sehr unterschiedlich ausfallen. Während ein Interleukin den einen Zelltyp aktiviert und somit Wachstum, Reifung oder Teilung bewirkt, kann es einen anderen Zelltyp hemmen. Interleukine vermitteln ihre Funktion über spezifische Interleukinrezeptoren, die meist aus mehreren Untereinheiten bestehen.

Das IL-4 agiert ähnlich wie IL-10 und IL-13 als ein anti-inflammatorisches Zytokin, indem überschießende Entzündungsreaktionen verhindert werden. Bei dem IL-4 handelt es sich um ein Glycoprotein von 20 kDa, dessen Struktur dem IL-2 und IL-13 sehr ähnlich ist und dessen globuläre Struktur aus 4 kurzen Alpha-Helices besteht. Es wird hauptsächlich von Mastzellen, Basophilen und Th2-Zellen produziert. Eine wichtige Funktion von IL-4 ist es, naive Th0-Zellen zu Th2-Zellen ausdifferenzieren zu lassen und die Proliferation von T-Zellen, B-Zellen und Mastzellen zu fördern [1]. Es bewirkt bei B-Zellen eine vermehrte Produktion von IgE-Immunglobulinen [37] und sorgt für eine Hochregulation von MHC-II-Molekülen an der Zelloberfläche. Die anti-inflammatorische Wirkung wird durch Hemmung von z. B. Th1-Zellen vermittelt, da diese über eine Produktion von IFN- γ Makrophagen aktivieren können. Neben der klassischen immunologischen Wirkung von IL-4 wurde auch eine Hemmung der spontanen Apoptose von B- und T-Zellen nachgewiesen [38] sowie eine Hemmung der durch Immunglobulin-Behandlung [39], Fas-Ligand [40] bzw. Glucocorticoid-induzierten Apoptose festgestellt [41]. Der Zelltod einiger Lymphome und Zelllinien konnte ebenfalls verhindert werden [42]. Da IL-4 eine Steigerung der IgE-Produktion und eine erhöhte Expression von MHC-II-Molekülen bewirkt, hat es eine Schlüsselfunktion bei der Entstehung von hypersensitiven Reaktionen wie z. B. Allergisches Asthma [43, 44]. Mittlerweile findet es auch seine Anwendung in der Behandlung der Psoriasis vulgaris (Schuppenflechte) [45].

Die Wirkung von IL-4 wird hauptsächlich über den IL-4-Rezeptor (siehe Abbildung 1.2) vermittelt [46, 47]. Dieser Rezeptor ist ein heterodimerer Komplex aus einer 140 kDa α -Untereinheit (IL-4R α) und der γ c-Kette (24 kDa), die als Untereinheit auch in anderen Zytokinrezeptoren wie z. B. dem IL-2-Rezeptor vorkommt [48]. Lediglich die aus 785 Aminosäuren bestehende IL-4R α -Untereinheit ist für die Bindung von IL-4 und der Induzierung von Zellwachstum und Transkriptions-Aktivierung verantwortlich

[46]. Während auf hämatopoetischen Zellen die IL-4R α -Untereinheit nur mit der γ c-Kette einen Komplex bildet, kommt es auf nicht-hämapoetischen Zellen sowohl mit der γ c-Kette als auch mit der IL-13R α 1-Untereinheit zur Bildung eines Komplexes. Der Rezeptor, der aus der IL-4R α - und der IL-13R α 1-Untereinheit besteht, kann sowohl durch IL-4 als auch durch IL-13 aktiviert werden [49].

Nach der Bindung von IL-4 an die IL-4R α -Untereinheit kommt es zu einer Dimerisierung mit der γ c-Kette und der Aktivierung von Mitgliedern der Janus-Familie von Proteinkinasen (Jak1-3) [46]. Die Aktivierung von Jak1-3 führt wiederum zur Phosphorylierung des zytoplasmatischen Teils von IL-4R α an konservierten Tyrosinen: Diese Phosphotyrosine sind Andockstellen für Src-homologe Domänen (SH2) und phosphotyrosin-bindende-Domänen (PTB) enthaltende Signalmoleküle. Diese Tyrosine haben in der Aminosäurekette von IL-4R α die Positionen Y497, Y575, Y603, Y631 und Y713 [47]. Die Tyrosine Y575-Y631 liegen in einem Motiv der IL-4R α Untereinheit, welches mit der IgE- und MHC-II-Expression assoziiert ist.

Die Bindung von IL-4 an den Rezeptor führt zu einer Bindung von Jak-3 an die γ c-Kette, was wiederum zu einer Phosphorylierung der drei Tyrosine führt. An diese Phosphotyrosine bindet das c-terminale SH2-Motiv von *Signal transducer and activator of transcription-6* (Stat6), welches selbst phosphoryliert wird. Zwei phosphorylierte Stat6-Moleküle bilden ein Homodimer, das als Transkriptionsfaktor im Nukleus fungiert. Das Tyrosin Y497 liegt in dem Motiv ⁴⁸⁸PL-(x)₄-NPxYxSxSD⁵⁰², das eine hohe Homologie mit der cytoplasmatischen Region des Insulin- und IGF-1 Rezeptors hat und deshalb Insulin-IL-4-Rezeptor (I4R)-Motiv genannt wird [50]. Nachdem das Tyrosin durch Jak-1 und -2 phosphoryliert wurde, bindet es an das Insulin-Rezeptor-Substrat-1 und -2 (IRS-1/2) oder Shc [47]. Zu den Molekülen, die mit IRS-1/2 interagieren, gehören die so genannten Adaptormoleküle Phosphoinositol-3-Kinase (PI3-K) und Grb-2. PI3-K besitzt eine 85 kDa regulatorische Untereinheit (p85), die über eine SH2-Domäne an die phosphorylierte Form von IRS-1/2 bindet und so die 110 kDa katalytische Untereinheit (p110) von PI3-K aktiviert.

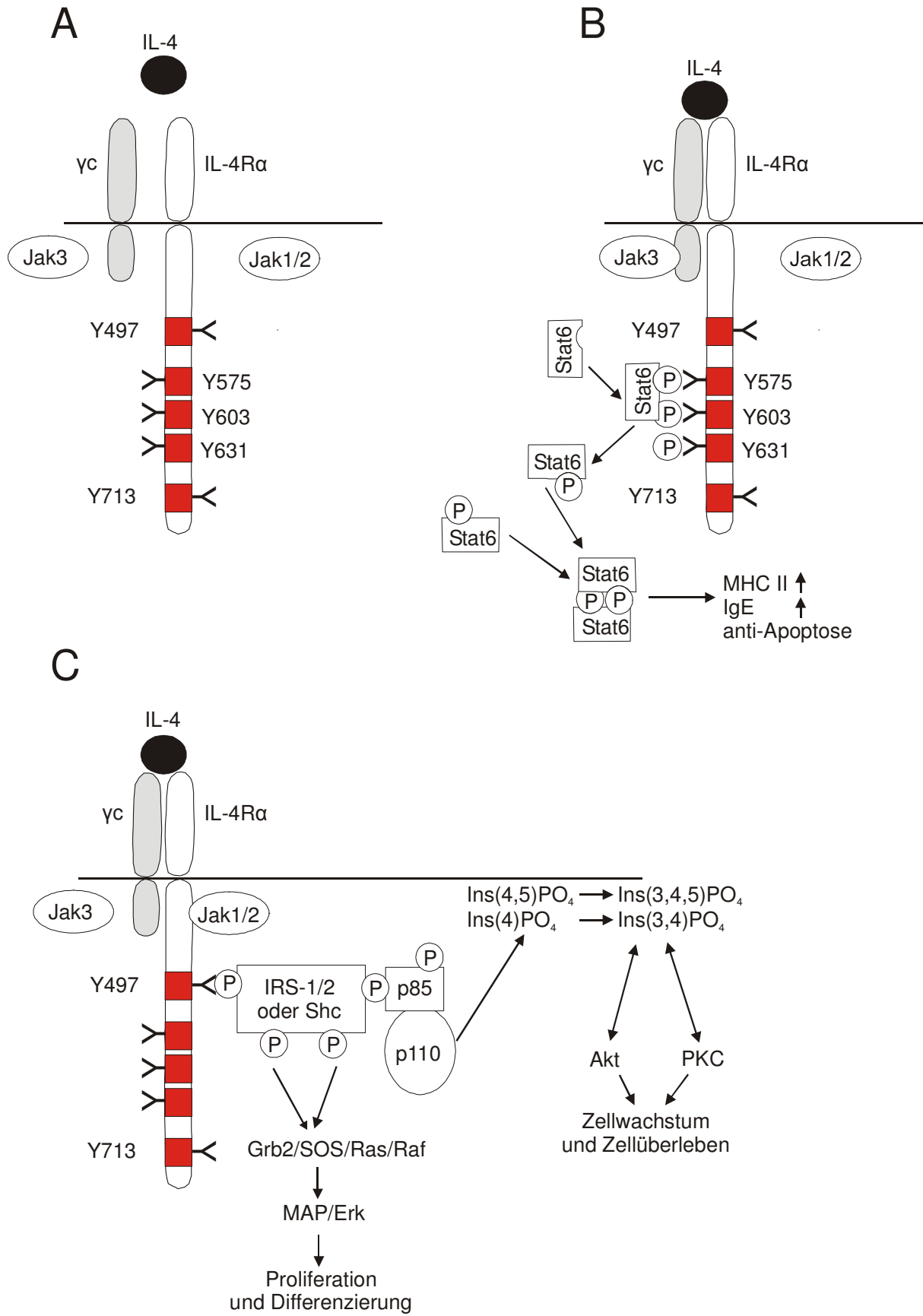


Abb. 1.2 Schematische Darstellung des IL-4-Signalweges nach [47]

A) Darstellung des IL-4 Rezeptor Komplex, der aus einer IL-4R α - und einer γ C-Rezeptoruntereinheit besteht. IL-4 bindet an die IL-4R α -Untereinheit, wonach es zur Bildung des IL-4-Rezeptor-Heterodimer kommt. Die IL-4R α -Untereinheit hat fünf Tyrosine, die durch Jak1-3 phosphoryliert werden können.

B) Darstellung des Stat6-Signalweges, wobei Jak3 an die γ C-Untereinheit bindet und die Tyrosine Y575-Y631 phosphoryliert. An die Phosphatgruppen bindet Stat6, das dann selber phosphoryliert wird. Zwei Phospho-Stat6-Moleküle bilden einen homodimeren Komplex und aktivieren Gene für die MHC-II- und IgE-Synthese und Gene die anti-apoptotisch wirken.

C) Darstellung der Aktivierung des Tyrosins (Y497) in dem IL-4R-Motiv durch Jak1/2 und nachfolgender Aktivierung verschiedener Adaptormoleküle. Diese Adaptormoleküle können z. B. die Kinasen Akt, PKC und MAP aktivieren, die zu Zellwachstum, Zellüberleben, Proliferation oder Differenzierung der Zelle beitragen.

Jak= Janus Familie von Proteinkinasen, (P)= Phosphatgruppe, Y= Tyrosin, IRS= Insulin Rezeptor Substrat, Ins= Inositol, PKC= Proteinkinase-C

Die katalytische Domäne ist in der Lage, Membranlipide zu phosphorylieren, wodurch z. B. Phosphoinositol-(3,4,5)-triphosphat und Phosphoinositol-(4,5)-bisphosphat entstehen [46, 47]. Diese beiden Moleküle aktivieren „downstream“ gelegene Kinasen wie Proteinkinase-C und Akt-Kinase, die unter anderen beim Überleben von Zellen eine wichtige Rolle spielen aber auch beim Auswachsen von Axonen [51, 52]. Die Aktivierung von Grb-2 führt dazu, dass entweder der assoziierte Guanin-Austauschfaktor *Son of Sevenless* (SOS) aktiviert wird oder PI3-K. Das Protein SOS sorgt nun für den Austausch von GDP durch GTP in dem membranständigen Molekül Ras. Das aktivierte Ras ist anschließend in der Lage, an die Ser/Thr-Kinase Raf zu binden. Die Bindung führt zu einer Konformationsänderung von Raf, wodurch es befähigt wird, die Kinase MEK zu phosphorylieren. Das letzte Molekül in der Signalkaskade ist die MAP-Kinase/Erk, die nachdem sie durch MEK aktiviert wurde, in dem Zellkern zahlreiche Transkriptionsfaktoren wie c-fos durch Phosphorylierung aktivieren kann [53]. C-fos kann mit z. B. Jun dimerisieren und den Transkriptionsfaktor AP-1 bilden, der Gene zur Proliferation und Differenzierung aktiviert [54]. Untersuchungen haben gezeigt, dass IL-4 in nicht-hämatopoetischen Zellen vor allem den IRS-1/2-Signalweg aktiviert aber auch den Grb2/Sos und den Shc/Grb-2/Sos-Signalweg [55, 56]. In einer Mauslinie mit einer Punktmutation des Tyrosins Y457 in Phenylalanin der IL-4R α -Untereinheit wird die Aktivierung von Akt- und MAP-Kinase verhindert, nicht aber die Aktivierung von Stat6 [57].

1.2 Nervensystem

1.2.1 Aufbau und Struktur des Nervensystems

Das Nervensystem ist ein komplexes System mit vielfältigen Aufgaben wie Aufnahme, Verarbeitung und Reaktion auf innere und äußere Reize, sowie Denken und Fühlen. Es lässt sich in ein zentrales Nervensystem (ZNS) und in ein peripheres Nervensystem (PNS) gliedern (zur Übersicht: [58, 59]). Das PNS dient dabei als Aufnahme- und Ausführungsorgan des ZNS mit sensiblen Nervenbahnen (Peripherie zum ZNS) und motorischen Nervenbahnen (ZNS zur Peripherie). Das ZNS umfasst das Gehirn und das Rückenmark, die beide von den Hirn- bzw. Rückenmarkshäuten (Meningen) ummantelt sind und so eine Hülle für das Hirn- bzw. Nervenwasser (Liquor cerebrospinalis) bilden. Das ZNS lässt sich in eine graue Substanz mit den Zellkernen der Zentralnerven und eine weiße Substanz mit den Fortsätzen der Nerven und dem Gliagewebe einteilen. Sowohl ZNS als auch das PNS bestehen hauptsächlich aus zwei verschiedenen Zelltypen, den Neuronen als funktionelle Grundeinheit und den Gliazellen, die verschiedene Funktionen ausüben.

Die Neurone sind auf Aufnahme, Verarbeitung und Weiterleitung von Signalen spezialisiert und stammen von Neuroepithelzellen ab. Der Zellkörper (Soma) enthält den Zellkern, das raue endoplasmatische Retikulum und den Golgi-Apparat, was das Soma unter anderen als Ort der Zellkontrolle und Proteinsynthese identifiziert. Jedes Neuron besitzt nur ein Axon (Neurit), das zur Weiterleitung von elektrischen Signalen befähigt ist. Der Ort der Signalübertragung wird Synapse genannt und besteht aus einem präsynaptischen und einen postsynaptischen Teil, sowie dem dazwischen gelegenen synaptischen Spalt. Hier wird das Signal in Form chemischer Botenstoffe (Neurotransmitter) übertragen. Die letzte Komponente sind die Dendriten, die meist zahlreich aus dem Soma hervorgehen. An den Dendriten finden sich morphologisch heterogene Ausstülpungen, so genannte *Spines* (Dornen). An ihnen enden Axone anderer Neurone und übertragen meist exzitatorische (erregende) Signale, wohingegen inhibitorische Signale meist direkt am Soma übertragen werden.

Die Gliazellen des ZNS können von denen des PNS unterschieden werden, da PNS-Gliazellen meist nur einem Zelltyp mit verschiedenen Differenzierungsformen entsprechen. Im ZNS gibt es mehrer Typen von Gliazellen, die aufgrund ihrer Funktion und Morphologie völlig unterschiedlich sind. Sie werden als Astrozyten, Oligodendrozyten, Mikroglia und Ependymzellen bezeichnet.

Astrozyten ähneln in ihrer Morphologie den Neuronen und lassen sich in wenig verzweigte (fibrilläre) und reichlich verzweigte (protoplasmatische) Astrozyten unterteilen. Astrozyten werden meist im Zusammenhang mit ihrer generellen, Struktur gebenden Funktion beschrieben. Somit ähneln sie in ihrer Funktion den Bindegewebszellen im restlichen Körper. Dem Bindegewebe analog wird abgestorbenes Gewebe im ZNS durch sich stark proliferierende Astrozyten ersetzt, wodurch die so genannte Glienarbe entsteht. Zusätzlich haben Astrozyten eine sehr wichtige Funktion bei der physiologischen Steuerung der Neurone. Sie nehmen z. B. Neurotransmitter aus ihrer Umgebung auf oder beeinflussen die neuronale extrazelluläre Matrix durch Änderung des Ionenmilieus, was zu Änderung der Erregbarkeit von Neuronen führt. Astrozyten sind auch an immunologischen Abwehrreaktionen beteiligt, indem antioxidative Substanzen gebildet werden, und fördern durch Ausschüttung von Wachstumsfaktoren direkt das Axonenwachstum. Die perivaskulären Fortsätze sind außerdem entscheidend an der Ausbildung der Blut-Hirn-Schranke beteiligt, wodurch ein gesteuerter Stoffaustausch ins ZNS ermöglicht wird.

Die Oligodendrozyten sind diejenigen Zellen im ZNS, die an der Ausbildung der Myelinscheide (Markscheide) der Axone beteiligt sind, indem ihre Fortsätze diese umhüllen. Im PNS erfüllen die Schwann-Zellen diese Funktion. Die Myelinschicht der Axone ermöglicht eine rasche Informationsweiterleitung und eine Demyelinisierung führt zum Funktionsverlust der betroffenen Nervenzellfortsätzen. Dieser Umstand ist besonders bei der Autoimmunerkrankung Multiplen Sklerose (MS) von Bedeutung, da dort eine krankhafte Autoimmunreaktion gegen Oligodendrozyten zum Verlust der Markscheide führt und eine gleichzeitige Entzündungsreaktion weitere Schäden wie Lähmung oder Sensibilitätsverlust verursacht. Nach Abklingen der Entzündung kann es zur Teilregeneration der Markscheide durch Zellteilung der Oligodendrozyten kommen.

Die Mikrogliazellen haben die größte Formvariation abhängig ihres Aktivierungszustandes und sind nicht ortständig sondern wandern durch das Gewebe. Es handelt sich bei Mikrogliazellen um ehemals ins ZNS eingewanderte Makrophagen und nicht um Abkömmlinge des Neuralrohrs. Die Funktion der Mikrogliazellen ähnelt der Funktion von Makrophagen. Sie dienen der Abwehr und des Abräumens, indem sie Antigen-Antikörper-Komplexe und Reste von untergegangenen Zellen phagozytieren und so eingedrungene Mikroorganismen

zerstören, wie z. B. bei der bakterielle Meningitis. Das macht die Mikrogliazellen bedeutend für das ZNS, da es ansonsten immunologisch schlecht versorgt ist. Es fehlen Lymphgefäße oder lymphatisches Gewebe.

Die Ependymzellen ähneln Epithelzellen und kleiden die inneren Liquorräume (Ventrikel) mit einer Zellschicht aus, wodurch der Liquor vom Hirngewebe getrennt wird. Die Ependymzellen haben eine starke Sekretions- oder Resorptionstätigkeit und transportieren durch ihre an der Oberfläche gelegenen Kinozilien den Liquor.

1.2.2 Hippocampus

1.2.2.1 Aufbau und Funktion des Hippocampus

Das limbische System besteht größtenteils aus allocorticalen (= paleo- und archicorticalen) Strukturen und wurde ursprünglich als Begriff geprägt, um ein bestimmtes Gehirnareal topographisch zu identifizieren. Dieses Gehirnareal liegt wie ein Saum um den Balken, den Basalganglien und dem Zwischenhirn und bildet eine Übergangszone zwischen NeoKortex und Hirnstamm. Seither hat sich der Begriff limbisches System weiterentwickelt und bezeichnet das Gebiet im Gehirn, indem die Emotionen lokalisiert sind [58]. Ein Teil dieses Systems ist der Hippocampus, der den größten Teil des ArchiKortex ausmacht und eine besondere mikroskopische Rindenstruktur aufweist, da er nicht wie der NeoKortex sechsschichtig sondern nur dreischichtig ist. Der Hippocampus hat großen Anteil an Gedächtnisleistung, Verhalten, Orientierung, Bewusstsein und Motivation [58]. In beiden Temporallappen der Großhirnhemisphären ist eine Hippocampusformation lokalisiert, die sich längs vom septilen Kerngebiet des basalen Vorderhirns bis zum ventrokaudalen Pol des Temporallappens erstreckt. Die Hippocampusformation besteht aus dem Hippocampus mit den Bereichen Gyrus dentatus, Cornu ammonis, Subiculum, Präsubiculum, Parasubiculum und dem entorhinalen Kortex [60].

1.2.2.2 Zytoarchitektur des Hippocampus

Ein senkrechter Querschnitt durch die Längsachse des Hippocampus zeigt zwei u-förmig gebogene, ineinandergreifende Strukturen: Gyrus dentatus und Cornu ammonis. Der Gyrus dentatus ist die wichtigste Stelle von eingehenden Signalen für den Hippocampus. Die Nervenzellen des Gyrus dentatus sind so angeordnet, dass die Nervenzellkörper im Körnerband (Stratum granulare) liegen und ihre Dendriten in die Molekularschicht (Stratum moleculare) nach außen entsenden. Bei den meisten

Zellen handelt es sich um erregende, glutaminerge Körnerzellen. Es finden sich aber auch eine Reihe unterschiedlicher, hemmender GABAerge Interneurone, so genannte Korbzellen, die durch ihre Morphologie und ihre jeweils kennzeichnenden Proteine unterschieden werden können. Die zellarme Molekularschicht enthält kaum Zellkörper sondern nur Nervenfasern und lässt sich in eine äußere, eine mittlere und eine innere Schicht unterteilen. Sie ist eine wichtige Kommunikationsschnittstelle von Neuronen innerhalb und außerhalb des Hippocampus. Innerhalb des Bogens der Körnerzellschicht findet sich der Hilus, auch Lamina multiformis genannt, der Interneurone und vor allem die Axone der Körnerzellen, die so genannten Moosfasern, enthält.

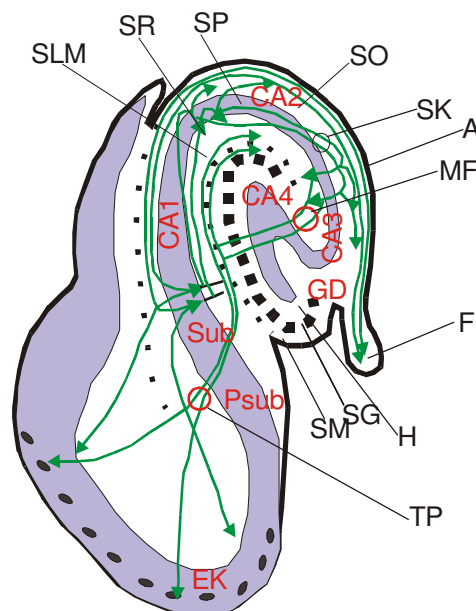


Abb. 1.3 Schematische Darstellung der Hauptverbindungen zwischen verschiedenen Abschnitten der Hippocampusformation nach [61]

A= Alveus, CA= Cornu ammonis, EC= entorhinaler Kortex, F= Fimbria, GD= Gyrus dentatus, H= Hilus, MF= Moosfasern, PM= Pia mater, Psub= Parasubiculum, SG= Stratum granulosum, SK= Schaffer-Kollateralen, SLM= Stratum lacunosum moleculare, SM= Stratum moleculare, SO= Stratum oriens, SP= Stratum pyramidale, SR= stratum radiatum, Sub= Subiculum, TP= Tractus perforans

Im dreischichtigen Hippocampus liegen die Nervenzellkörper der Pyramidenzellen wie beim Gyrus dentatus in einer Schicht (Stratum pyramidale) und sind größtenteils große glutamerge Neurone mit basalen und apikalen Dendriten. Als Eingangsschicht

gliedert sich nach Außen an die Pyramidenzellschicht das breite Stratum radiatum und das schmalere Stratum lacunosum-moleculare an. In der inneren Schicht befinden sich die Zellkörper von hemmenden Korbzellen im sogenannten Stratum oriens. Der Teil des Hippocampus, der als Cornu ammonis bezeichnet wird, gliedert sich aufgrund unterschiedlicher Morphologie und Verschaltungen der enthaltenen Neurone in die Regionen CA1 bis CA4.

Das Subiculum ist eine Übergangsschicht vom dreischichtigen, archicorticalen Hippocampus zum sechschichtigen Neokortex. Es liegt zwischen der CA1-Region und dem entorhinalen Kortex (zur Übersicht: [60, 62]).

1.2.2.3 Projektionen des Hippocampus

Die erregenden Neurone sind in der Hippocampusformation in einer Kette hintereinander geschaltet [63]. Die Haupteingangsstelle für cortikale Signale ist die äußere Molekularschicht des Gyrus dentatus, wo die Axone des entorhinalen Kortex als Tractus perforans eintreffen [62, 64]. Der Tractus perforans projiziert aus den Schichten II und III des entorhinalen Kortex und endet im Hilus, wobei die Axone vom medialen entorhinalen Kortex in die mittlere Molekularschicht und die Axone vom lateralen entorhinalen Kortex in die äußere Molekularschicht sowie dem Stratum lacunosum-moleculare der CA-1 Region projizieren [65]. Die Axone verschalten dabei nicht nur auf die erregenden Körnerzellen sondern auch auf einige der verschiedenen Klassen von hemmenden Interneuronen, was zu einer Vorwärtshemmung führt. Innerhalb des Gyrus dentatus bewirken die so genannten Korb- und Kerzenleuchterzellen eine Rückwärtshemmung, indem sie durch die Körnerzellen innerviert werden und auf deren Somata bzw. Axonhügel zurückschalten. In der inneren Molekularschicht werden die Körnerzellen durch andere Körnerzellen, sowie durch assoziative Fasern aus der CA4-Region innerviert. Über die Moosfasern projizieren die Körnerzellen des Gyrus dentatus auf die Pyramidenzellen in dem inneren Stratum radiatum der CA3-Region, die ebenfalls erregend sind [66]. Interneurone sind hier sowohl an einer Vorwärts- als auch Rückwärtshemmung beteiligt. Weitere Afferenzen werden durch die CA3-Regionen der beiden Hemisphären ausgetauscht. Die Pyramidenzellen erreichen Kerne in den Corpora mamillaria, der Substantia nigra oder dem Locus coeruleus durch eine Projektion über den Fornix. Dieselben Axone, die in den Fornix projizieren, haben auch Abzweigungen, die an Pyramidenzellen in der CA1-Region enden und

Schaffer-Kollateralen genannt werden [66]. Außerdem führen Axone aus dem entorhinalen Kortex in die CA1-Region und innervieren Zellen im Stratum lacunosum-moleculare. Der Fornix enthält sowohl Axone aus der CA3-Region, als auch Axone der Pyramidenzellen der CA1-Region und projiziert insgesamt in das Subiculum, welches so seine Hauptsignale erhält und seinerseits zurück zum entorhinalen Kortex in die Schichten V und VI projiziert [60, 62].

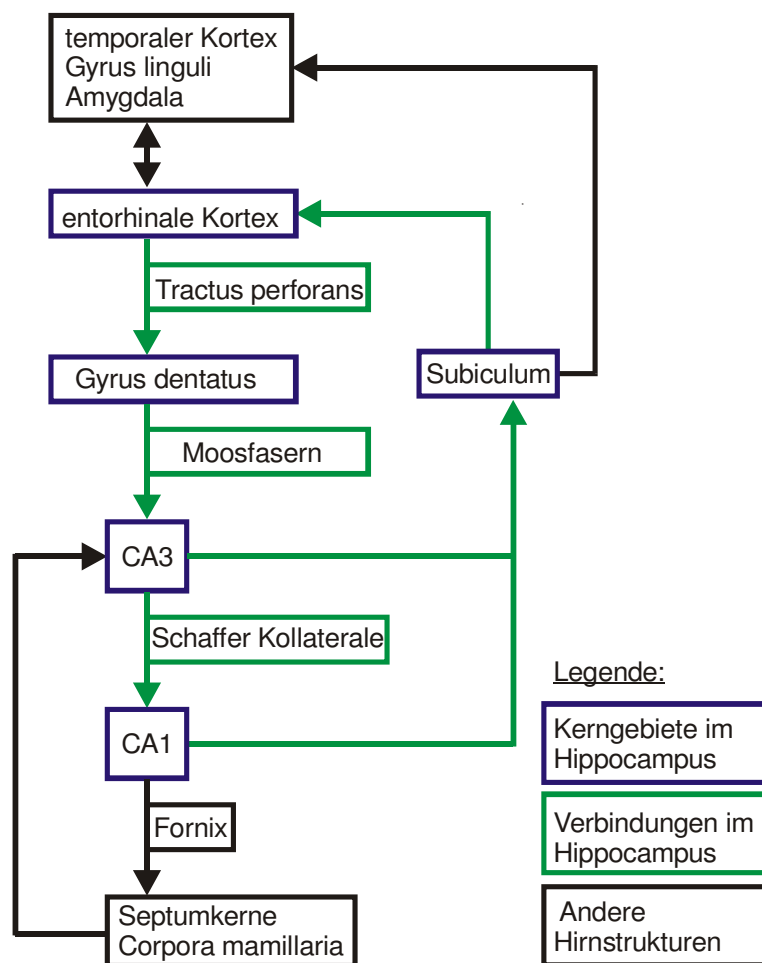


Abb. 1.4 Vereinfachtes Schema der Verschaltungen im Hippocampus

Das Subiculum entsendet Informationen in die Großhirnrinde beider Seiten und zusätzlich in den Nucleus accumbens, die Amygdala, den präfrontalen Kortex und den Hypothalamus.

Der Hippocampus ist durch die Projektion über den Fornix in den so genannten Papez-Kreis eingebunden. Der Papez-Kreis projiziert vom Hippocampus über die

Corpora mamillaria, den Thalamus, den Gyrus cinguli in den entorhinalen Kortex und schließt sich im Hippocampus. Er wurde 1937 erstmals von James W. Papez beschrieben und als neuronale Grundlage von Emotionen postuliert [67]. Afferente neuromodulatorische Bahnen wie cholinerge Neuronen aus dem Septum, serotonerge Neuronen der Medialen Raphe und Noradrenalin-haltige Neurone aus dem Locus coeruleus enden ebenfalls im Hippocampus [58, 59].

1.2.2.4 Funktion, Neuropathologie und Neurogenese im Hippocampus

Der Hippocampus bekommt Informationen verschiedener sensorischer System. Nachdem die Informationen verarbeitet wurden, werden sie zurück zum Kortex geschickt. Somit ist der Hippocampus essenziell für die Gedächtniskonsolidierung, also der Überführung von Gedächtnisinhalten aus dem Kurzzeit- in das Langzeitgedächtnis [58, 68]. Menschen mit einem zerstörten oder entfernten Hippocampus können alte Erinnerungen abrufen aber keine neuen mehr bilden, leiden also unter einer anterograden Amnesie [58]. Man könnte also sagen, dass der Hippocampus Erinnerungen generiert, während Gedächtnisinhalte an anderen Stellen der Großhirnrinde gespeichert werden. Bei Tieren hat der Hippocampus einen wichtigen Anteil an der Fähigkeit zur räumlichen Orientierung [69].

Der Hippocampus spielt bei einigen neurologischen und psychiatrischen Erkrankungen eine Rolle. Bei Demenzkranken finden häufig Abbauprozesse im Hippocampus statt [70], die genauso zum Verlust der Merkfähigkeit oder zeitlichen und örtlichen Orientierung führen wie auch Bewusstseinsstörungen hervorrufen können. Dieselben Symptome können auch durch eine von Herpesviren induzierte Enzephalitis, die den Hippocampus komprimiert, entstehen [71, 72]. Bei Erkrankten des schizophrenen Formenkreis findet man nicht nur eine Überaktivität dopaminerger Zentren im Mittelhirn, sondern auch eine verminderte Aktivität inhibitorischer, dopaminerger Neuronen im Gyrus parahippocampalis und im Hippocampus [58].

Der Gyrus dentatus des Hippocampus ist neben der Subventrikulären Zone (SVZ) eine der beiden Strukturen im gesunden Säugetiergehirn, die zeitlebens neue Nervenzellen bilden [73]. Die Funktion der fortbestehenden Bildung neuer Neurone ist noch nicht vollständig verstanden, könnte aber mit einer Stabilisierung des Hippocampus gegen äußere Einflüsse und Verhindern des Vergessens früh erlernter Muster zusammenhängen.

1.2.3 Das Rückenmark

1.2.3.1 Allgemeine Strukturen des Rückenmarks

Das Rückenmark (Medulla spinalis) reicht bei erwachsenen Menschen vom Ende des Gehirns im Foramen magnum des Okzipitalknochens bis etwa zum ersten Lendenwirbelkörper [58]. Es ist von einem knöchernen Skelett der Wirbelsäule und vom Liquor cerebrospinalis umgeben. Die Wirbelsäule besteht aus einzelnen Wirbeln, zwischen denen die einzelnen Nerven austreten. Die Wirbel werden verschiedenen Abschnitten zugeordnet. Beim Menschen gibt es 7 Zervikalsegmente (C1-C7), 12 Thorakalsegmente (Th1-Th12), 5 Lumbalsegmente (L1-L5) und 5 Sakralsegmente (S1-S5). Bei den verschiedenen Klassen von Wirbeltieren kommt es zu einer leicht veränderten Anzahl einzelner Segmentabschnitte. So haben Nagetiere 7 Zervikalsegmente, 13 Thorakalsegmente, 6 Lumbalsegmente und eine unterschiedliche Anzahl an Sakralsegmenten [74], in Abhängigkeit von der Gattung. Das Rückenmark versorgt über Spinalnerven die Extremitäten, den Rumpf und den größte Teil des Halses mit Signalen.

1.2.3.2 Rückenmarkquerschnitt

Im Querschnitt lässt sich das Rückenmark in eine graue und eine weiße Substanz gliedern (siehe Abbildung 1.5). Die graue Substanz zeigt eine schmetterlingsähnliche Form und enthält die Zellkörper der Rückenmarksneuronen, während die weiße Substanz die Axone und Dendriten der Neurone sowie Gliazellen enthält [58].

Die graue Substanz ist so angeordnet, dass der breite Teil nach vorne (ventral= bauchseitig) zeigt und der schmalere nach hinten (dorsal= rückseitig). Der vordere Anteil wird auch Vorderhorn (Cornu anterius) genannt und enthält Zellkörper von Neuronen, die für die Motorik (Motoneurone) zuständig sind, d. h. ihre Axone innervieren die Skelettmuskeln. Der hintere Anteil wird als Hinterhorn (Cornu posterior) bezeichnet und enthält Zellkörper von Neuronen, die u. a. für die Sensibilität zuständig sind. Ausgehend von dieser Anordnung entspringen von den Vorderhörnern die Vorderwurzeln und von den Hinterhörnern die Hinterwurzeln und vereinigen sich dann zum Spinalnerv. In Bereichen des Thorakal- und Lumbalmarkes befindet sich zwischen Vorder- und Hinterhorn noch das so genannte Seitenhorn (Cornu laterale), das Zellkörper von Neuronen des vegetativen Nervensystems enthält.

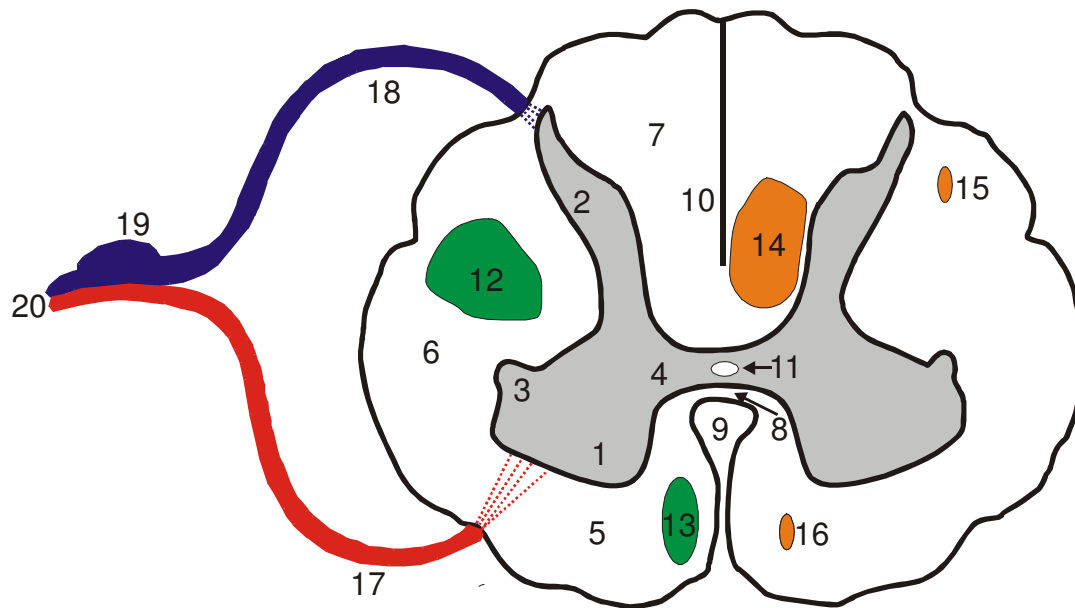


Abb. 1.5 Schematische Darstellung des Rückenmarksquerschnitts modifiziert nach [58]

1= Vorderhorn, 2= Hinterhorn, 3= Seitenhorn, 4= Commissura grisea, 5= Vorderstrang, 6= Seitenstrang, 7= Hinterstrang, 8= Commissura alba anterior, 9= Fissura mediana, 10= Sulcus medianus posterior, 11= Canalis centralis, 12= Tractus corticospinalis lateralis (Mensch), 13= Tractus corticospinalis anterior (Mensch), 14= Tractus corticospinalis dorso-medial (Maus), 15= Tractus corticospinalis lateralis (Maus), 16= Tractus corticospinalis ventro-medial (Maus), 17= Vorderwurzel, 18= Hinterwurzel, 19= Spinalganglion, 20= Spinalnerv

Wie die graue Substanz kann auch die weiße Substanz in ein Vorder-, Seiten- und Hinterstrang unterteilt werden, wobei sie nicht derselben funktionellen Einteilung folgt, da im Vorder- und Seitenstrang sowohl sensible als auch motorische Bahnen aufwärts bzw. abwärts laufen. Die sensiblen aufsteigenden Bahnen laufen vom Rückenmark zum Gehirn und die motorischen absteigenden Bahnen vom Gehirn zum Rückenmark, wo sie dann in der grauen Substanz auf Alpha-, Beta- und Gamma-Motoneurone umgeschaltet werden. Die Pyramidenbahn, auch Tractus corticospinalis (Corticospinaler Trakt = CST) genannt, ist die größte und bedeutendste motorische Bahn. Die Zellkörper der corticospinalen Neurone sind in der Schicht V des Kortex (MotorKortex) lokalisiert [75] und ziehen ins Rückenmark, wo sie die Alpha-Motoneurone zur Willkür- und Feinmotorik über Interneurone innervieren. Die Axone passieren dabei nacheinander die innere Kapsel, die Crura cerebri und die Fasciculi longitudinales ponti, bevor sie in der Medulla oblongata eine sichtbare Vorwölbung, die sogenannten Pyramiden bilden. Direkt nach den

Pyramiden kreuzen beim Menschen 70-90 % der Fasern auf die Gegenseite und laufen als Tractus corticospinalis lateralis im Seitenstrang nach unten, bis sie dort Segment für Segment in die Vordersäule eintreten, um die entsprechenden Motorneurone zu innervieren. Der Anteil an ungekreuzten Faser (10-30 %) läuft als Tractus corticospinalis anterior medial nach unten und kreuzt auf Höhe seines Eintretens in die graue Substanz in das kontralaterale Vorderhorn [58]. Der Tractus corticospinalis anterior endet im Zervikalmark. Der wesentliche anatomisch-topographische Unterschied zwischen Menschen und Ratten/Mäusen besteht darin, dass bei Ratten/Mäusen die gekreuzten Fasern nicht im Seitenstrang, sondern im Hinterstrang des Rückenmarks (dorsal) verlaufen und es weniger als 5% ungekreuzter Axone gibt. Die ungekreuzten Axone verlaufen dabei sowohl lateral als auch ventro-medial [75].

1.2.4 Neuroregeneration

1.2.4.1 Neuroregeneration im ZNS

Eine bedeutende Herausforderung der biomedizinischen Forschung ist, die Axonregeneration nach Neurotraumata zu stimulieren. Das betrifft insbesondere die beschädigten Axone von langen Fasertrakten im Gehirn und Rückenmark, da diese, anders als im PNS, nicht zu einer robusten und effektiven Regeneration befähigt sind [76]. Die limitierten regenerativen Prozesse, die beobachtet werden können, führen lediglich zum Wachstum von wenigen hundert Mikrometern und hören nach wenigen Tagen wieder auf. Es sind mittlerweile verschiedene Gründe für diese eingeschränkte Regeneration identifiziert worden [77]. Zum einen gibt es eine physikalische Behinderung auswachsender Axone durch die gebildete Glianarbe [78], zum anderen werden inhibierende Moleküle produziert. Zu diesen Molekülen gehören Proteoglykane, insbesondere diejenigen, die Chondroitinsulfat-Glykosaminoglykane tragen [79]. Die Proteoglykane lassen sich in der extrazellulären Matrix finden und es gibt mehrere Ansätze, durch Abbau dieser Moleküle das Axonwachstum zu stimulieren [79, 80]. Weitere inhibitorische Moleküle, die identifiziert werden konnten, sind mit dem Myelin assoziiert. Dazu gehören z. B. Nogo, das Myelin-assoziierte Glycoprotein (MAG) und das Oligodendrozyten-Myelin-Glycoprotein (Omgp) [81-85]. Ein weiterer Grund für die mangelhafte Unterstützung von regenerativen Axonen ist die unzureichende Versorgung mit überleben- und

wachstumsfördernden Faktoren, wie z. B. Neurotrophe-Faktoren. Die Neurotrophe-Faktoren lassen sich in drei Gruppen einteilen:

1. Neuropoetische Zytokine: z. B. *Ciliary neurotropic factor* (CNTF) und Interleukin-6 (IL-6)
2. Fibroblasten-Wachstumsfaktoren: z. B. *acidic und basic Fibroblast Growth Faktor* (aFGF und bFGF)
3. Neurotrophine: *nerve growth factor* (NGF), *Brain-derived neurotrophic factor* (BDNF), Neurotrophin-3 (NT-3) und Neurotrophin-4/5 (NT-4/5)

Dabei spielen die Neurotrophine eine besonders wichtige Rolle in der vorgelegten Arbeit.

1.2.4.2 Neurotrophine

Die Neurotrophine bestehen in ihrer biologisch aktiven Form aus zwei identischen Untereinheiten aus ca. 120 Aminosäuren. Die Neurotrophine zeigen eine 90-100 % Homologie zwischen den Spezies, wobei sie untereinander eine bis zu 50 % Übereinstimmung der Aminosäuresequenz aufweisen [86, 87]. Ihre Aufgabe ist es, das Schicksal von Neuronen im sich entwickelnden und adulten ZNS zu kontrollieren [88]. Sie wurden ursprünglich als ein Überlebensfaktor von Neuronen betrachtet, da sie die Apoptose verhindern können [89]. Indem sie lokal in geringen Konzentrationen von Zellen im Zielgebiet ausgeschüttet werden, regulieren sie die Anzahl der innervierenden Neurone [90]. Nur diejenigen Neurone, deren Axon mit ausreichend Neurotrophinen versorgt wird, überleben. Die anderen gehen durch Apoptose zugrunde [90-92]. Das Wirkspektrum der Neurotrophine ist sowohl zeitlich, als auch in Abhängigkeit von den Zielzellen, sehr unterschiedlich [93]. Mittlerweile werden die Neurotrophine ebenfalls in Zusammenhang mit synaptischer Modulation und Axonwachstum gebracht [94-96].

Die unterschiedliche Wirkung der Neurotrophine wird vor allem durch eine Bindung an verschiedene Tropomyosin-Rezeptor-Kinase (Trk)-Rezeptoren verursacht. Die Rezeptoren gehören zu der Tyrosin-Kinase-Rezeptorfamilie und bestehen alle aus drei Abschnitten: der extrazellulären Komponente, an die das Neurotrophin bindet und Ähnlichkeit mit Immunglobulinen hat, einer Transmembrandomäne und einer intrazellulären Domäne mit Tyrosin-Kinase Aktivität [97].

1.2.4.3 Neurotrophin-Rezeptoren

NGF bindet vor allem an Trk-A, BDNF und NT-4 an Trk-B und NT-3 an Trk-C. Die Neurotrophine binden zwar mit einer hohen Affinität und Spezifität an ihren jeweiligen Rezeptor, sind aber unter gewissen Umständen durchaus in der Lage, mit einer schwachen Affinität an die anderen Rezeptoren zu binden [98-101]. Neben diesen drei so genannten Vollängen-Rezeptoren gibt es sowohl von Trk-B als auch Trk-C zwei Isoformen des Rezeptors mit verkürzter intrazellulären Domäne [102, 103]. Durch die Verkürzung fehlt der entscheidende Anteil für die Kinase-Aktivität. Die biologische Funktion dieser verkürzten Rezeptoren ist bisher noch nicht vollständig geklärt [104].

Die Bindung an den Trk-Rezeptor führt zu einer Dimerisierung und Kinase-Aktivierung [101]. Es gibt 10 konservierte Tyrosine in der zytoplasmatischen Domäne, wovon drei an dem autoregulatorischen Kreislauf der Kinase-Aktivität beteiligt sind. Die anderen Tyrosine fungieren nach einer Phosphorylierung als Andockstelle für Adaptorproteine. Die Adaptorproteine binden über ihre SH2-Domäne an die Phosphatgruppen und aktivieren ihrerseits mehrere intrazelluläre Signalwege. Zu diesen Signalwegen gehören der bereits unter 1.1.3.2 beschriebene Sos/Ras/MAP-Kinase-Signalweg und der PI3K/Akt-Kinase-Signalweg. Zusätzlich kommt es über das Tyrosin Y758 zu einer Aktivierung von Phospholipase-C (PLC)- γ und folgend zu einer Hydrolyse des Membranlipid Phosphatidylinositol-bisphosphat (PIP_2) zu Diacylglycerol (DAG) und Inositoltrisphosphat (IP_3). IP_3 sorgt für einen Anstieg des intrazellulären Calciumlevels und Aktivierung von Calcium gesteuerten Signalwegen. DAG reguliert über eine Proteinkinase-C die Aktivierung der MAP/Erk-Kaskade und so neuronales Auswachsen [105].

Neben den Trk-Rezeptoren können die Neurotrophine ebenfalls an p75-Neurotrophin-Rezeptor (p75NTR) binden, der zu der Familie der TNF-Rezeptorfamilie gehört [106]. Die Rolle von p75NTR wird kontrovers diskutiert [107]. Während er früher als ein low-affinity-Rezeptor für die Neurotrophine bezeichnet wurde, ist mittlerweile bekannt, dass er mit annähernd der selben Affinität wie die Trk-Rezeptoren gebunden wird [107]. Werden die Trk-Rezeptoren und p75NTR koexprimiert, so verstärkt p75NTR die Diskriminierung der Trk-Rezeptoren hinsichtlich einer favorisierten Bindung des jeweils spezifischen Liganden [107-109]. In anderen Studien wurde der p75NTR mit der Aktivierung der Apoptose in

Verbindung gebracht [110]. Dabei ließ sich feststellen, dass lediglich die Vorläuferproteine der Neurotrophine wie z. B. pro-NGF effektiv die Apoptose über p75NTR vermitteln können, wobei pro-NGF nicht an Trk-A bindet [111, 112]. Später wurde festgestellt, dass Sortilin zusammen mit p75NTR einen Rezeptorkomplex an der Zelloberfläche bildet, über den pro-NGF seine apoptotische Wirkung vermittelt [112]. Zusätzlich konnten weitere Partner von p75NTR identifiziert werden. Im Zusammenspiel mit dem Lingo-1 und dem Nogo-Rezeptor bildet p75NTR ein Trimer, an das Moleküle wie Nogo, MAG oder Omgp binden und ihre inhibitorische Wirkung auf das axonale Auswachsen vermitteln [113-116]. Studien mit z. B. Nogo-inhibierenden Antikörper haben zeigen können, dass so ein Wiederauswachsen von lädierten Axonen stimuliert werden kann [83, 117, 118].

1.3 Wechselwirkung zwischen Immunsystem und ZNS

1.3.1 Rolle von T-Lymphozyten in der Neuroinflammation

Für lange Zeit wurde das ZNS als ein immunprivilegiertes Organ betrachtet. Mittlerweile wird dieses Privileg als Toleranz verstanden, da bekannt ist, dass es zu einer routinemäßigen und sehr effektiven Überwachung kommt [119, 120]. Es lassen sich aktivierte autoreaktive Lymphozyten finden, die die Blut-Hirn-Schranke passieren [120], bzw. unter den peripheren Lymphozyten lassen sich ZNS-spezifische Lymphozyten isolieren [121, 122]. Dabei findet eine strenge Überwachung der Immunzellen statt, um das Risiko einer Schädigung durch entzündliche Reaktionen zu minimieren. Die Anzahl der T-Zellen, die in einem gesunden ZNS zu finden sind, ist sehr gering [123], steigt aber aufgrund von immunologischen Reaktionen im Körper an, selbst wenn das ZNS nicht direkt betroffen ist [124].

Die effektive Kontrolle von einwandernden Immunzellen in das ZNS wird durch die Blut-Hirn-Schranke gewährleistet [58, 59]. Unter pathologischen Bedingungen, wie einer mechanischen Verletzung [125] oder im Rahmen von neurologischen Erkrankungen [126], ist dieser Schutz verringert, und es zeigen sich starke inflammatorische Prozesse im ZNS [127, 128]. Nach einer mechanischen Verletzung im ZNS kann, ähnlich wie im PNS, eine verstärkte Einwanderung von T-Zellen und Makrophagen beobachtet werden [129-131]. Gleichzeitig findet eine Aktivierung von Mikrogliazellen und Astrozyten statt [132-134]. Interessanterweise lassen sich in

Abhängigkeit vom untersuchten Modell ein bis zwei Phasen einer T-Zell-Infiltration nachweisen [128, 129], wobei nur ZNS-spezifische T-Zellen im Läsionsbereich akkumulieren [135, 136]. Die Anzahl der T-Zellen bleibt einige Zeit nach der akuten Entzündungsreaktion deutlich erhöht [128, 137], was für eine mögliche Rolle in der späteren Wundheilungsreaktion sprechen könnte [138]. Der Prozess der Wundheilung wird im ZNS als Neuroregeneration verstanden [139]. Die aktivierten Mikrogliazellen und Astrozyten sind in der Lage, mit den eingewanderten T-Zellen zu interagieren, indem sie Leukozyten-anziehende Chemokine produzieren [140-142] oder diese durch die Bildung von Zytokinen beeinflussen [143]. Mikrogliazellen können zu Makrophagen-ähnlichen Zellen reifen [144] und dann deren Funktion wie Phagozytose und Antigenpräsentation über den MHC-II-Komplex übernehmen [145-152]. Da sie dabei ebenfalls die benötigten kostimulierenden Moleküle präsentieren, sind sie in der Lage, die akkumulierten ZNS-spezifischen T-Zellen zu aktivieren und zur Proliferation anzuregen. So wird z. B. durch eine Verletzung degeneriertes Myelin [153, 154] durch Mikrogliazellen dazu verwendet, eingewanderte Myelin-spezifische T-Zellen zu aktivieren [134, 137, 155-158]. Neben den Mikrogliazellen sind auch aktivierte Astrozyten dazu befähigt, MHC-II- und kostimulatorische-Moleküle zu präsentieren [153, 159, 160], sind aber selber nicht in der Lage, eine T-Zell-Proliferation zu initiieren [161-164]. Sie unterstützen vielmehr die T-Zell-Antwort in Abhängigkeit von Mikrogliazellen oder IL-1 [165, 166], durch Produktion einer Vielzahl an Chemokinen und Zytokinen [167].

Es findet eine komplexe und gegenseitige Beeinflussung zwischen ZNS-infiltrierten T-Zellen und gewebeständigen Mikrogliazellen und Astrozyten statt, die an der Auslösung, Regulation oder Suppression einer ZNS-Immunantwort beteiligt sind [149, 152, 168-171]. Im Rahmen der Inflammation kommt es zur Bildung zahlreicher Faktoren, die zu einer zeitlich versetzten, sekundären Neuronenschädigung führen [172]. Diese sekundäre Schädigung betrifft subletale Neurone, die den Primärschaden überlebt haben. Das führt dazu, dass die eingewanderten Immunzellen einerseits versuchen, die Entzündung in der Läsion einzudämmen und zur Regeneration beizutragen [173], gleichzeitig aber auch weitere Ausfälle und Schädigungen des neuronalen Gewebes verursachen können [76, 174, 175].

Aufgrund dieser unterschiedlichen Beobachtungen ist die Rolle von T-Zellen im Rahmen einer ZNS-Schädigung sehr umstritten [176]. So werden die aktiven MBP- oder MOG-T-Zellen, die in den entzündlichen Zellinfiltraten der

Autoimmunerkrankung MS gefunden werden, primär als schädlich betrachtet [177, 178]. Untersuchungen haben gezeigt, dass sich während eines akuten Krankheitsschubes vermehrt Th1- und Th17-Zellen finden lassen [179, 180], jedoch im Rahmen der Phase der Remission und Regeneration eher Th2-Zellen [181, 182], was wiederum auch für einen positiven Effekt sprechen könnte. In der Behandlung der MS wird einerseits eine Immunsuppression durch Glucocorticoide verwendet, aber auch eine Immunmodulation durch INF- β oder Glatirameracetat (Copaxone®) [183-185]. Copaxone hat dabei mehrere mögliche Wirkmechanismen:

1. Die chemische Struktur ähnelt MBP, wodurch MBP-angreifende-Immunzellen abgefangen werden.
2. Es fördert die Entstehung regulatorisch wirkender CD8⁺-Zellen, die sonst deutlich verringert sind.
3. Der Transkriptionsfaktor FOXP3 wird aktiviert, was zur vermehrten Bildung von CD4⁺CD25⁺ Treg-Zellen führt.
4. Verschiebung des Gleichgewichts von inflammatorischen (Th1-) zu anti-inflammatorischen (Th2-) Immunzellen.

Diese ZNS reaktiven T-Zellen lassen sich neben der MS auch nach Rückenmarksverletzungen, Schlaganfällen oder experimentellen bzw. klinischen Nervenläsionen nachweisen, wobei sie nicht als autoimmun verstanden werden [186-188]. In Tiermodellen mit Ratten und Mäusen konnten ZNS-reaktive T-Zellen sieben Tage nach einer Rückenmarkläsion aus den Lymphknoten isoliert werden. Wurden diese Zellen in gesunde Tiere injiziert, so entwickelten diese einen Phänotyp ähnlich der Experimentellen Autoimmun-Enzephalomyelitis (EAE) [189, 190]. Bei der EAE handelt es sich um eine Erkrankung des ZNS bei Ratten und Mäusen und wird in der experimentellen biomedizinischen Forschung als Tiermodell für MS verwendet. ZNS-reaktive T-Zellen, die später als sieben Tage nach der Läsion isoliert wurden, verursachten keine EAE-Symptomatik, so dass davon ausgegangen wird, dass es regulatorische Mechanismen gibt, die eine autoimmune Reaktion unterdrücken [189]. An dieser Stelle setzten lang anhaltende Diskussionen darüber ein, welche Rolle solche ZNS-spezifischen T-Zellen innerhalb der ersten Woche nach einer Läsion haben [191]. Es gibt Hinweise dafür, dass diese autoimmunen T-Zellen zum

Nervenuntergang und zur Demyelinisierung beitragen [190, 192] oder, ganz im Gegenteil, die Regeneration unterstützen [193]. Das Forschungsgebiet der neuroprotektiven Autoimmunität beruft sich auf die letztere Hypothese.

1.3.2 Neuroprotektive Autoimmunität

Das Konzept der neuroprotektiven Autoimmunität wurde vor allem durch die Arbeitsgruppe um Michal Schwartz begründet [194]. Das Konzept besagt, dass autoreaktive Makrophagen und T-Zellen eine protektive bzw. regenerierende Wirkung nach mechanischen Schäden des PNS und ZNS haben [136, 193, 195]. Es konnte gezeigt werden, dass nur MBP-spezifische T-Zellen in der Lage waren, retinale Ganglienzellen vor einem Sekundärschaden zu bewahren [136, 196]. T-Zellen, spezifisch für ein Hühnereiweiß (Ovalbumin = OVA) oder ein nicht ZNS-spezifisches Protein wie das Heat Shock Protein (HSP), waren dazu nicht fähig [136]. Ähnliche Ergebnisse ließen sich auch durch eine Verabreichung von Glatirameracetat erzielen [197]. Der Transfer von MBP-spezifischen T-Zellen sowie der aktiven und passiven Immunisierung mit Peptiden des Myelins (MBP, PLP und MOP) hatte auch bei Rückenmarksverletzungen einen positiven Effekt [195, 198, 199].

Die neuroprotektive Immunität und der daraus erfolgte klinische Test werden sehr stark kritisiert, da sich einerseits die Daten bezüglich einer neuroprotektiven Funktion von MBP-spezifischen T-Zellen nicht reproduzieren ließen, und andererseits weil einige der verwendeten Tiere eine EAE entwickelten [189-191]. Bei einer genauen Betrachtung der verschiedenen Ergebnisse zeigt sich, dass die verwendeten T-Zellen häufig nicht genauer bezüglich ihres Phänotyps charakterisiert wurden (Th1 vs. Th2). Es zeigten eher diejenigen Maus- bzw. Rattenlinien eine protektive autoimmune T-Zellen-Antwort, die keine EAE entwickelten, wenn sie mit Myelin-assoziierten Antigen konfrontiert wurden [138]. Es ist bekannt, dass die Th1/Th2-Balance einerseits vom Alter, aber andererseits auch vom genetischen Hintergrund der Tiere abhängig ist [200-203]. So zeigen die EAE-resistenten Mausstämme Balb/C/Ola oder C3H/HeJ eine fast ausschließliche Th2-Immunantwort, während die EAE-empfindlichen Stämme C57BL/6, B10.PL oder SJL eine dominante Th1-Immunantwort aufweisen [138, 204].

1.3.3 Rolle von Th2-Zellen bei neuropathologischen Prozessen

Dass eine Analyse der T-Zellen bezüglich ihres Phänotyps von Bedeutung sein kann, zeigte sich bei Experimenten, in denen ein Modell mit entorhinal-hippocampalen Schnittkulturen dazu benutzt wurde, neuroprotektive Effekte zu untersuchen [139, 205]. In den Untersuchungen waren Th2-Zellen in der Lage, die durch Th1-Zellen induzierte Präsentation des inflammatorischen Markers ICAM-1 auf Mikrogliazellen zu verhindern oder sogar umzukehren [206, 207]. Außerdem waren Th2-Zellen sehr viel stärker als Th1-Zellen in der Lage, das Überleben von Neuronen vor einer N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Schädigung zu schützen [208]. Bedingung für diesen Effekt war, dass es nicht zu einem Zell-Zell-Kontakt zwischen den Neuronen in der Schnittkultur und den Th2-Zellen kam. Dieser Umstand macht es wahrscheinlich, dass der schützende Effekt durch ein sezerniertes Protein vermittelt wird [208]. Die Hinweise auf eine protektive Wirkung von Th2-Zellen bei traumatischen, nicht-autoimmunen Schäden des ZNS werden durch weitere Ergebnisse unterstützt [138]. So führen operative Schnittverletzungen oder Schlaganfälle zu einer sekundären Immundefizienz, die „ZNS-Verletzung induzierte Immunsuppression“ genannt wird [209]. Dabei kommt es catecholamin-abhängig über z. B. Adrenalin oder Noradrenalin in Mäusen und Menschen zu einer Verlagerung in Richtung Th2-Immunistatus [210, 211]. Als Hypothese wurde daraus geschlossen, dass die vermehrte Produktion von Th2-Zellen z. B. die Entstehung von autoimmunen ZNS-Entzündungen eindämmen könnte [212].

Bei der Verwendung von Th2-induzierenden Substanzen konnten ebenfalls neuroprotektive bzw. neuroregenerative Effekte beobachtet werden. So führte die Immunisierung mit einem Th2-induzierenden Adjuvants wie dem inkompletten Freundschens Adjuvants (IFA) und Aluminiumhydroxid zu einer gesteigerten Axonregeneration nach einer Rückenmarkläsion, ohne eine EAE zu induzieren [213-215]. Die gleichzeitige Gabe des potenten, Th2-induzierenden Glatirameracetat in Kombination mit einem Adjuvant führte zu einer verstärkten Protektion von retinalen Ganglienzellen vor einem Absterben durch Glutamat-Zytotoxizität oder durch Hypertension mittels Okular [197, 216].

Es gibt zahlreiche Hinweise darauf, dass Th2-Zellen, vermittelt durch einen sezernierten Faktor, eine herausragende Rolle bei der Neuroregeneration spielen [138]. Dabei wird als ein Kernelement der Neuroregeneration die Bildung neuer Axone verstanden [217]. Diese neuen Axone werden benötigt, um eine

Wiederherstellung der neuronalen Funktionen zu gewährleisten, wobei der Prozess des Axonwachstums meist Neurotrophin-abhängig ist [188, 218-222]. Da T-Helferzellen durchaus Neurotrophine produzieren, wurde die Hypothese aufgestellt, dass die vorher beschriebenen Effekte bezüglich Neuroprotektion und Neuroregeneration durch die lokale Produktion von Neurotrophinen bewirkt werden könnte [176]. Es konnte nämlich festgestellt werden, dass Th2-Zellen substantiell mehr NGF, NT-3 und NT-4 produzieren als Th1-Zellen [223]. Sowohl Th1- als auch Th2-Zellen produzieren jedoch sehr viel weniger Neurotrophine als neuronale Zellen. Daraus wurde der Schluss gezogen, dass die Neurotrophine der T-Zellen keinen substantiellen zusätzlichen Beitrag zur Neuroregeneration haben [223]. Vielmehr wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Th2-Zellen durch einen anderen spezifischen Faktor in der Lage sind, eine Neuroprotektion bzw. Neuroregeneration zu stimulieren [138, 223, 224]. Wie bereits unter 1.1.2 ausgeführt, ist das IL-4 eines der wichtigsten Markerproteine von Th2-Zellen und grenzt sie von Th1-Zellen ab.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, wie Th2-Zellen die Neuroregeneration im Sinne eines axonalen Wiederauswachsens oder reaktiven Sproutings positiv beeinflussen. Dabei wurde der Schwerpunkt auf eine Regeneration mechanisch verletzter Axone nach einem Primärschaden gelegt. Um den Th2-Zellen spezifischen Faktor zu identifizieren, wurde für die *in vitro* Versuche ein Kokulturmodell mit organotypisch entorhinal-hippocampalen Gewebeschnitten verwendet. Außerdem wurde mit dem *in vivo* Modell der Rückenmarkläsion untersucht, ob Th2-Zellen, bzw. ein spezifischer Faktor, eine neue Therapieoption in der Behandlung von mechanischen ZNS-Schäden darstellt.

Folgende experimentelle Fragestellungen wurden untersucht:

1. Welcher Th2-spezifische Faktor ist an der Stimulation des axonalen Auswachsens beteiligt?
2. Ist der identifizierte Faktor therapeutisch nutzbar?
3. Welche intrazellulären Mechanismen werden durch den Th2-Faktor aktiviert, um das axonale Auswachsen zu stimulieren?
4. Gibt es einen Zusammenhang zwischen den Neurotrophin-Rezeptoren und Th2-Zellen bei der axonalen Stimulation?
5. Können injizierte Th2-Zellen oder ein spezifischer Faktor die axonale Regeneration *in vivo* beeinflussen?

2 Material und Methoden

2.1 Material

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Chemikalien hatten alle die Qualität *pro analysis* und wurden, falls nicht anders vermerkt, von den Firmen Roth (Karlsruhe), Gibco (Karlsruhe), Invitrogen (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Sigma-Aldrich (Taufkirchen) oder Serva (Heidelberg) bezogen. Für die Herstellung der benötigten Lösungen wurde entionisiertes Wasser aus der Reinstwasseranlage (Millipore) benutzt.

2.1.1 Tierstämme und Haltung

Die Mauslinien β -Aktin-EGFP, IL-4-Rezeptor-defizient, Stat6-defizient, IL-4-Rezeptor-mutant und Trk-B-defizient wurden in den tierexperimentellen Einrichtungen des Centrums für Anatomie in Berlin gehalten. Die Mäuse hatten dabei einen freien Zugang zu Wasser und Futter und wurden in einem Hell-Dunkelrhythmus von 12 h gehalten.

Tab 2.1.1 Übersicht der verwendeten Mauslinien

Name	Phänotyp	Offizieller Name des Stamms	Bezogen von	The Jackson Laboratory Stock Nummer (2008)	Referenz	Besonderheiten
Balb/C	Wildtyp-Mausstamm	Balb/cJ	BFR	000651	-	EAE resistent starke Th2-Immunantwort
EGFP- β -Aktin	Heterozygote und homozygote Tiere fluoreszieren grün	TgN-(beta-act-EGFP)	Jackson Laboratory	006567	[1]	Heterozygote und homozygote Tiere können makroskopisch unterschieden werden
IL-4-Rezeptor-defizient	kein funktionsfähiger IL-4-Rezeptor	Balb/C-IL4ra ^{tm1Sz} /J	Max-Delbrück-Centrum	003514	[2]	-
Stat6-defizient	kein funktionsfähiges Stat6	C.129SZ-Stat6 ^{tm1gru} /J	Jackson Laboratory	002828	[3]	-
IL-4-Rezeptor-mutante	funktionsfähiger IL-4-Rezeptor mit Y500F Mutation	C.129X1-I/4ra ^{tm1Tch} /J	University of California	007680	[57]	-
Trk-B-defizient	kein funktionsfähiger Trk-B-Rezeptor	B6.129SZ-NtrkZ ^{tm1Bbd} /J	Max Delbrück Zentrum	003098	[227]	Trk-B-defiziente Tiere versterben 12 h nach Geburt
IL-10-defizient	Keine Produktion von IL-10	C.129-IL10 ^{tm1Cgn}	Jackson Laboratory	004333	[228]	B und T-Zellen entwickeln sich normal

2.1.2 Zelllinien

Die J558 Zellen sind eine B-Zell-Myelom-Zelllinie [230]. Über einen Retrovirus wurde die murine cDNA für IL-4 eingebracht (J558-IL-4) [231, 232].

2.1.3 rekombinante Proteine

Bezeichnung	Hersteller	Artikel-Nr.	Verwendung
murines IL-4	BD Pharmingen, Heidelberg, D	550067	Th2-Zellen Prägung
murines IL12	R&D Systems, Wiesbaden, D	419-ML	Th1-Zellen Prägung
humanes NT-3	Tebu-Bio, Offenbach, D	450-03	Kollagen-Kokultur
murines IL-6	Tebu-Bio, Offenbach, D	216-16	Kollagen-Kokultur
murines IL-4	Tebu-Bio, Offenbach, D	214-14	Kollagen-Kokultur

2.1.4 Antikörper

Bezeichnung	Hersteller	Artikel-Nr.	Verwendung
anti-CD8a Micro-Beads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D	130-049-401	Zellseparation
anti-CD11b Micro-Beads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D	130-049-601	Zellseparation
anti-CD45R Micro-Beads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D	130-049-501	Zellseparation
Phospho-Trk-A-Antikörper	Cell Signaling Technology Beverly MA, USA	RPN2132	Western Blot
Trk-B-Antikörper	R&D Systems, Wiesbaden, D	AF1494	Western Blot
Trk-C-Antikörper	R&D Systems, Wiesbaden, D	AF1404	Western Blot
Phospho-Akt-Kinase-Antikörper	Cell Signaling Technology Beverly MA, USA	4051	Western Blot
Akt-Kinase-Antikörper	Cell Signaling Technology Beverly MA, USA	9272	Western Blot
Phospho-MAP-Kinase-Antikörper	Cell Signaling Technology Beverly MA, USA	9106	Western Blot
MAP-Kinase-Antikörper	Cell Signaling Technology Beverly MA, USA	9102	Western Blot
Kaninchen anti-Ziege-HRP gekoppelter Antikörper	Millipore, Eschborn, D	Ap106p	Western Blot
Kaninchen anti-Maus-HRP gekoppelter Antikörper	Amersham, Feiburg, D	25009596	Western Blot
Ziege anti-Kaninchen-HRP gekoppelter Antikörper	Amersham, Feiburg, D	25009597	Western Blot
CD4-FITC-Antikörper	BD Pharmingen, Heidelberg, D	553047	FACS
CD8a-PE-Antikörper	BD Pharmingen, Heidelberg, D	553033	FACS
CD11b-FITC-Antikörper	BD Pharmingen, Heidelberg, D	557396	FACS
CD45R-FITC-Antikörper	BD Pharmingen, Heidelberg, D	553087	FACS

IL-4-IgG1-Antikörper	BD Pharmingen, Heidelberg, D	554432	Th1-Zellen Prägung Blockierungsexperimente
IL-12-IgG1-Antikörper	BD Pharmingen, Heidelberg, D	554475	Th2-Zellen Prägung
IL-10-IgG1-Antikörper	BD Pharmingen, Heidelberg, D	554421	Blockierungsexperimente
IL-13-IgG2b-Antikörper	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D	I4532	Blockierungsexperimente
Isotypkontroll-IgG1-Antikörper	BD Pharmingen, Heidelberg, D	554682	Blockierungsexperimente
Isotypkontroll-IgG2b-Antikörper	Biolegend, San Diego CA, USA	400621	Blockierungsexperimente

2.1.5 Seren

Bezeichnung	Hersteller	Artikel-Nr.	Verwendung
Fötales Kälberserum (FCS)	Biochrom, Berlin, D	s 0113/5	Zellkulturmedium
Normales Pferdeserum (NHS)	Gibco, Karlsruhe, D	26050-088	Zellkulturmedium

2.1.6 Kits

Bezeichnung	Hersteller	Artikel-Nr.	Verwendung
OptEIA Set mouse IL-4	BD Pharmingen, Heidelberg, D	555232	ELISA
OptEIA Set mouse IL-10	BD Pharmingen, Heidelberg, D	555252	ELISA
IL-13 mouse ELISA Kit	Tebu-Bio, Offenbach, D	ELM-IL13-001	ELISA
OptEIA Set mouse IFN- γ	BD Pharmingen, Heidelberg, D	555138	ELISA
TGF- β 1 Emax Immuno Assay	Promega, Mannheim, D	G7590	ELISA
Mouse IL-4 Secretion Assay Cell Enrichment and Detection Kit	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D	130-090-515	Depletion von IL-4 Zellen
AmpliTaq DNA Polymerase	Applied Biosystems, Foster City CA, USA	N8080157	PCR
Advantage GC Genomic LA Polymerase Mix	Clontech,	639152	PCR
DNA-free™	Ambion, Austin TX, USA	1906	DNA-Verdau
High Capacity cDNA Archive Kit	Applied Biosystems, Foster City CA, USA	4322171	cDNA-Synthese
DNA Purification Kit	Machery-Nagel, Düren, D	740952-259	Isolation genomischer DNA
Universal Mastermix Taqman	Applied Biosystems, Foster City CA, USA	4352042	Taqman PCR

Vectastain ABC Elite Std-Kit	Linaris, Wertheim, D	109980	DAB-Färbung
BCA Protein Assay Reagent Kit	Pierce, Rockford IL, USA	23227	Proteinkonzentration
ECL Plus Western blotting detection	Amersham, Feiburg, D	RPN2132	Immuno-Blot

2.1.7 Medien und Zusätze

Bezeichnung	Hersteller	Artikel-Nr.	Verwendung
RPMI 1640 Roswell Park Memorial Institute	Gibco, Karlsruhe, D	52400-041	Zellkulturmedium
DMEM Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium	Gibco, Karlsruhe, D	41965-039	Zellkulturmedium
HBSS ohne Mg und Ca Hanks' Balanced Salt Solution	Gibco, Karlsruhe, D	14170-088	Zellkulturmedium
MEM Minimum Essential Medium	Gibco, Karlsruhe, D	11012-044	Zellkulturmedium
BME Basal Medium Eagle	Gibco, Karlsruhe, D	41010-109	Zellkulturmedium
NBM Neuro Basal Medium	Gibco, Karlsruhe, D	21103-049	Zellkulturmedium
L-Glutamin 200 mM	Gibco, Karlsruhe, D	25030-024	Zellkulturmedium
Penicillin/Streptomycin	Gibco, Karlsruhe, D	15140-122	Zellkulturmedium
Glutamax	Gibco, Karlsruhe, D	35050-038	Zellkulturmedium
B27 Supplement	Gibco, Karlsruhe, D	17504044	Zellkulturmedium
Gentamycin	Gibco, Karlsruhe, D	15750-045	Zellkulturmedium
Humanes Insulin	Gibco, Karlsruhe, D	12585-014	Zellkulturmedium

2.1.8 Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller	Artikel-Nr.	Verwendung
100 bp DNA Ladder	Promega, Mannheim, D	G210A	DNA Elektrophorese
Agarose	Serva, Heidelberg, D	11404.05	DNA Elektrophorese
Ammonium-Nickel-II-Sulfat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D	A1827	DAB Färbung RML Schnitte
Aprotinin	Roth, Karlsruhe, D	A162.1	Lysepuffer Proteinproben
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D	M7154	Protein Probenpuffer
BSA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D	A7906	Immuno-Blot

Material und Methoden

CFSE	Invitrogen, Karlsruhe, D	C1157	Markierung Th2-Zellen
Kollagen Ratte Typ 1	Sigma-Aldrich, Taufkirchen,D	27666	Kollagen-Kokultur
Concanavalin A	Sigma-Aldrich, Taufkirchen,D	C5275	Stimulierung T –Zellen
DAB	Roth, Karlsruhe, D	CN75	DAB Färbung RML Schnitte
DEPC Wasser	Roth, Karlsruhe, D	K028.1	RNA Arbeiten
Dextran Biotin (BDA)	Invitrogen, Karlsruhe, D	D-1956	Markierung CST
DMSO	Roth, Karlsruhe, D	A994	Blockierungsexperimente
DNase	Worthington, Lakewood NJ, USA	LK003170	Primäre Gliazellkultur
dNTP's	Amersham, Freiburg, D	27-2035-02	PCR
EDTA	Roth, Karlsruhe, D	8040.2	Protein Probenpuffer
EGTA	Roth, Karlsruhe, D	3054.1	Protein Probenpuffer
Entellan	Merck, Darmstadt., D	107960	Konservierung RML Schnitte nach DAB Färbung
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe, D	7870	DNA Elektrophorese
Heparin liquemin N25000	Roche, Mannheim, D	3441331	Perfusion Mäuse
Immu-Mount™	Thermo Scientific, Waltham MA, USA	999041200	Konservierung RML-Schnitte nach Injektion CFSE Th2-Zellen
Ketamin	DeltaSelect, Pfullingen, D	-	Anästhesie Mäuse
K252a	Merck, Darmstadt., D	420297	Blockierungsexperimente
Leupeptin	Roth, Karlsruhe, D	CN33.1	Protein Probenpuffer
LY-294002	Merck, Darmstadt., D	440204	Blockierungsexperimente
Milchpulver	Roth, Karlsruhe, D	T145	Immuno-Blot
Natriumorthovanadat	Roth, Karlsruhe, D	450243	Protein-Probenpuffer
Natriumpyrophosphat	Roth, Karlsruhe, D	221368	Protein-Probenpuffer
Paraformaldehyd	Roth, Karlsruhe, D	0335.3	Gewebefixierung
PMSF	Roth, Karlsruhe, D	6367.1	Protein-Probenpuffer
Poly-L-Lysin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen,D	P4832	Primäre Gliazellkultur
Precision Plus Protein Standard	Bio-Rad, München, D	161-0374	SDS-Elektrophorese
Rimadyl®	Pfizer, Karlsruhe, D	1704396	Analgesie Mäuse nach RML
Rompun	Bayer, Leverkusen, D	-	Anästhesie Mäuse
Rotiphorese® Acrylamid	Roth, Karlsruhe, D	T802	SDS-Elektrophorese

Tetramethylbenzidin Dihydrochlorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D	T3405	ELISA Farbreaktion
Triton-X100	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D	106K177	DAB-Färbung
Trypan-Blau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D	93595	Bestimmung der Zellzahl
Trypsin	Boehringer, Ingelheim, D	109827	Primäre Gliazellkultur
U0126	Promega, Mannheim, D	V11211	Blockierungsexperimente

2.1.9 Geräte und Materialien

Bezeichnung	Hersteller	Artikel-Nr.	Verwendung
Autoclip 9mm	BD Pharmingen, Heidelberg, D	427631	Wundverschluss nach Rückenmarkläsion
Binokular GZ6	Leica, Bensheim, D		Präparation Kokulturen
Binokular STEMI DV4	Zeiss, Jena, D		Präparation RML
Blotpapier	Millipore, Eschborn, D		Western Blot
Brutschrank I	Thermo Electron, Langenselbold, D		Kultivierung Kokulturen
Brutschrank II CF 150 F	Binder, Tuttlingen, D		Kultivierung primärer Zellen
Digitale Kamera Photometric Coll Snap ES	Visitron Systems, München, D		Foto-Kokumentation EGFP-Kokulturen
Easycast B2 Electrophoresis Systems	Bio-Rad, München, D		DNA Elektrophorese
ELISA-Reader Synergy 2	BioTek, Bad Friedrichshall, D		ELISA und BDA Messung
ELISA Washer Opsys MW	Dynex Technologies, Sullyfield Circle V, USA		Waschen ELISA Platten
Elix-5 Water Purification Systems	Millipore, Eschborn, D		Gewinnung dd H ₂ O
FACS Calibur	BD Pharmingen, Heidelberg, D		FACS Messung
Fluoreszenz/Durchlichtmikroskop Olympus BX 51	Olympus, Hamburg, D		EGFP-Kokultur + RML Auswertung
F96Mikrowell Platten,Maxisorp	Nunc, Wiesbaden, D	442404	ELISA
Gel Imaging System	Herolab, Wiesloch, D		Dokumentation DNA/RNA Gele
Hand-UV-Lampe tap NU-6KI	Konrad Benda, Wiesloch, D		Unterscheidung β -Aktin EGFP-Mäuse
Hyperfilm ECL	Amersham, Freiburg, D	28-9068-37	Dokumentation Western Blot
Inverses Fluoreszenz/Durchlichtmikroskop Olympus IX 70	Olympus, Hamburg, D		Auswertung Kollagen-Kokultur, primäre Zellen
Kryostat CM 1900	Leica, Bensheim, D		Kryoschnitte des Rückenmarks nach RML
Lichtquellen für Binokular KL 1500 LCD	Leica, Bensheim, D		Lichtquellen
MACS LS Säulen	Miltenyi, Bergisch Gladbach, D		Zellseparation (MACS)

Material und Methoden

MCILWAIN Tissue-Chopper TC752	H. Sauer Laborbedarf, Reutlingen, D		Gewebeschneider für Kokulturen
Millicell-CM Zelleinsätze	Millipore, Eschborn, D	PIMORG 50	EGFP-Kokultur
Milli-Q Synthesis A 10 Systems	Millipore, Eschborn, D		Gewinnung d H ₂ O
Neutralit Teststäbchen	VWR, Darmstadt, D	109533001	pH Einstellung der Kollagenlösung
Perfusionspumpe ISMATEC BVP 70-15-20	IDEX Corporation, Northbrook IL, USA		Perfusion der Mäuse
Perma Hand Seide 0,45 cm	Ethicon, Glashütte, D	640H	Wundverschluss nach RML
Photometer BioMate3	Thermo Electron, Langenselbold, D		Konzentrationsbestimmung DNA und RNA
PL6 Heavy 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg, D	32.007.953	RNA Isolation
PxE 0.2 Thermal Cycler	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, D		PCR
PVDF Membran Immobilon-P	Millipore, Eschborn, D	IPVH00010	Western-Blot
Quadriperm Zellkulturschalen	Nunc, Wiesbaden, D	167063	Kollagen-Kokultur
Rongeur	Fine Science Tools, Heidelberg, D	16221-14	Entfernung Knochenstücke RML
Sterilbank Antares 48	Anthos Mikrosysteme, Köln, D		Primäre Zellkultur
Sterilbank Laminar Flow	Steag, Pliezhausen, D		Präparation Kokulturen
Sterilfilter 0,22 µm	Corning Inc., Lowell MA, USA	431154	Sterilfiltrieren Zellkulturmedien
Taqman 96-well Platten	Applied Biosystems, Foster City CA, USA	4346906	Taqman PCR
Taqman MicroAmp optical adhesive film	Applied Biosystems, Foster City CA, USA	4311971	Taqman PCR
Trans-Blot SD Semi Dry Transercell	Bio-Rad, München, D		Western-Blot
Ultra Turrax T25 basic	IKA® Werke, Staufen, D		Gewebezerkleinern für RNA Extraktion
Viereckige Kulturschalen	Nunc, Wiesbaden, D	176740	Kollagen-Kokulturen mit rekombinanten Proteinen
Zellkulturflaschen	BD Pharmingen, Heidelberg, D	353136	Primäre Astrozyten und Mikrogliazellen
Zellsiebe 70 µm	VWR, Darmstadt, D	734-0003	Primäre T-Zellen und APZs
Zentrifuge 5415 R	Eppendorf, Hamburg, D		Molekularbiologie und Proteinchemie
Zentrifuge Megafuge 1.0	Thermo Electron, Langenselbold, D		Zellkultur
7500 Fast Real-Time PCR Systems	Applied Biosystems, Foster City CA, USA		Taqman PCR

2.1.10 Primer

PCR	Primer	Primer Sequenz 5'>3'
Genotypisierung IL-4-Rezeptor- defiziente Mäuse	A B C D	CTT GGG TGG AGA GGC TAT TC AGG TGA GAT GAC AGG AGA TC AAT GTG ACC TAC AAG GAA CC GGA CTC CAC TCA CTC CAG
Genotypisierung Stat6-defiziente Mäuse	A B C D	CTG AAT GAA CTG CAG GAC GA ATA CTT TCT CGG CAG GAG CA CTG GAC CTC ACC AAA CGC CCC GGA TGA CGT GTG C
Genotypisierung IL-4-Rezeptor-mutante Mäuse	A +/+, -/- B +/+ C -/-	ACT GCC TGC ACA AAC TCC T TTG CAG ACA ATC CTG CCT A TTG CAG ACA ATC CTG CCT T
Genotypisierung Trk-B-defiziente Mäuse	A B C	AGA CCA TGA TGA GTG GGT CGC C TCG CGT AAA GAC GGA ACA TGA TCC GAT GTG GAA TGT GTG CGA GGC C
Genotypisierung IL-10-defiziente Mäuse	A B C	GTG GGT GCA GTT ATT GTC TTC CCG GCC TTC AGT ATA AAA GGG GGA CC CCT GCG TGC AAT CCA TCT TG
murine β -Aktin cDNA	A B	CGA CGC GTT CCG ATG CCC CGG ACT CAT CGT ACT CCT GCT TGC
murine IL-4-Rezeptor cDNA	A B	GAT CAA CAT CCT GAT GTC AGG GGC CTC AAA CAG CTC CAT ACA G
Taqman-PCR β -Aktin	A B Sonde	GTA CAA CCT CCT TGC AGC TCC T TTG TCG ACG ACG AGC GC CGC CAC CAG TTC GCC ATG GAT
Taqman-PCR Trk-A	A B Sonde	Applied Biosystems Sequenzen nicht veröffentlicht Mm01219407_m1
Taqman-PCR Trk-B	A B Sonde	Applied Biosystems Sequenzen nicht veröffentlicht Mm01341753_m1
Taqman-PCR Trk-C	A B Sonde	Applied Biosystems Sequenzen nicht veröffentlicht Mm00456222_m1
Taqman-PCR p75	A B Sonde	Applied Biosystems Sequenzen nicht veröffentlicht Mm01309635_m1

2.1.11 Lösungen und Puffer

Millipore Typ I Wasser

Elix-5 5 Water Purification System

aus Leitungswasser:

Deionisiertes und gefiltertes Wasser für analytische Zwecke geeignet

Millipore Typ II Wasser

Milli-Q Synthesis A 10 System

aus Millipore Typ I Wasser:

Ultrapures Wasser, für molekularbiologische Zwecke geeignet

Soweit keine anderen Angaben, wurde immer Millipore Typ I Wasser verwendet.

Alle mit Chemikalien angesetzten Puffer und Lösungen für die Zellkultur, wurden sterilfiltriert.

0,1 M Phosphatpuffer pH 7,4 (0,1 x PB)

0,1 M Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)

0,1 M Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4)

in Wasser

Phosphatgepufferte Salzlösung pH 7,4 (1x PBS)

140 mM Natriumchlorid (NaCl)

2,7 mM Kaliumchlorid (KCl)

10 mM Dinatriumhydrogenphosphat-Heptahydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$)

in Wasser

Trisgepufferte Salzlösung pH 7,4 (TBS-Puffer)

50 mM Tris[hydroxymethyl]aminomethan (Trisbase)

150 mM Natriumchlorid (NaCl)

in Wasser pH von 7,4 mit HCl einstellen

DMEM Medium für primäre Astrozyten und Mikrogliazellen

10 % FCS

1 % Penicillin-Streptomycin-Lösung (100x)

2 mM L-Glutamin

in DMEM-Medium

Neuro Basal Medium (NBM) für primäre Neurone

2 mM L-Glutamin
2 % B-27 (50x)
1 % Gentamycin (100x)
in NBM-Medium

Inkubationsmedium für J558 Zellen

10 % FCS
1 % Penicillin-Streptomycin-Lösung (100x)
in RPMI 1640 Medium

Lysepuffer für Erythrozyten bei T-Zell Präparation

9 ml 0,16 M Ammoniumchlorid (NH_4Cl) in Wasser
1 ml 0,17 M Tris[hydroxymethyl]aminomethan (Trisbase)
in Wasser

Präparations- und Inkubationsmedium für T-Zellen (C-RPMI)

10 % FCS
1 % Penicillin-Streptomycin-Lösung (100x)
0,1 % β -Mercaptoethanol
in RPMI 1640 Medium

Einfriermedium für T-Zellen

10 % FCS in Dimethylsulfoxid (DMSO)

MACS und FACS- Puffer

2 % FCS in PBS

Essigsäure für Kollagen-Kokultur

0,1 M Essigsäure (CH_3COOH) in Wasser

Kollagen-Rekonstituierungspuffer

0,8 M Natriumhydroxid (NaOH)
2,2 % Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3)
in Wasser

Kollagen

2 mg/ml Kollagen in 0,1 M Essigsäure

Kollagen-Lösung pH 7,4-7,8

1 ml Kollagen
50 µl DMEM-Medium
100 µl Rekonstituierungspuffer

Präparationsmedium für Kollagen und EGFP-Kokulturen

16 g/l MEM
2 mM L-Glutamin
0,8 mM Tris[hydroxymethyl]aminomethan (Trisbase)
in Wasser

Inkubationsmedium Kollagen-Kokulturen

25 % Normal Horse Serum (NHS)
25 % HBSS
4 mg/l Insulin
0,8 mg/l Vitamin C
5 mM Tris[hydroxymethyl]aminomethan (Trisbase)
2 mM L-Glutamin
43,5 mg/l Natriumhydrogencarbonat
1 % Penicillin-Streptomycin-Lösung (100x)
2,4 g/l Glucose
8 g/l MEM
in Wasser

Inkubationsmedium für EGFP-Kokultur

4 g/l MEM
25 % BME-Medium
25 % NHS
2 mM Glutamax
6,25 g/l Glucose
in Wasser und pH 7,2 mit NaOH-Lösung einstellen

Trisbase-Borsäure-EDTA-Puffer (TBE-Puffer)

90 mM Tris[hydroxymethyl]aminomethan (Trisbase)
90 mM Borsäure
2 mM Ethylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat (EDTA)
in Wasser

Agarose-Gel

1,5 Agarose in TBE-Puffer

Ketamin-Rompun-Gemisch zur Anästhesie

2 % Ketamin
0,8 % Rompun
in 0,9 % Natriumchlorid-Lösung (NaCl)

ELISA-Wasch-Puffer

0,05 % Tween-20 in PBS

Krebs-Puffer (10x Stock)

1, 18 M Natriumchlorid (NaCl)
48 mM Kaliumchlorid (KCl)
24 mM Calciumchlorid (CaCl₂)
12 mM Kaliumdihydrogenphosphat (KH₂PO₄)
12 mM Magnesiumsulphat (MgSO₄)
in Wasser

Krebs-Puffer pH 7,4 für Protein-Assay

frisch angesetzt

1,2 mM Glucose
25 mM Natriumhydrogencarbonat (NaHCO₃)
in 1x Krebs-Puffer und pH auf 7,4 einstellen

DNA-Probenpuffer

5 ml Glycerol
4,5 ml TBE Puffer
400 µl 0,5 M Ethylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat (EDTA)
100 µl Xylencyanol Stammlösung (2 % in TBE)

Fixierlösung für Perfusion

4 % Paraformaldehyd
5 % Succrose
in 0,1 M PB-Puffer

Succrose-Lösung

30 % Saccharose in Wasser

Ringer-Lösung

54 mM	Natriumchlorid (NaCl)
2 mM	Kaliumchlorid (KCl)
1,8 mM	Calciumchlorid (CaCl ₂)
2 mM	Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)
29,4 mM	Natriumnitrat (NaNO ₃)
10 mg/l	Phenolrot
50000 I.E.	Heparin

BDA-Lösung zum Markieren des CST

10 % BDA in 0,1 x PBS

Protein-Lysepuffer

20 mM	Tris[hydroxymethyl]aminomethan (Trisbase)
150 mM	Natriumchlorid (NaCl)
1 mM	Ethylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat (EDTA)
1 mM	Ethylen Glycol Tetraessigsäure (EGTA)
1 %	Triton-x 100
1 mM	Natriumorthovanadat (Na ₄ P ₂ O ₇)
2,5 mM	Natriumpyrophosphat (Na ₃ VO ₄)
1 mg/l	Leupeptin
3 mg/l	Aprotinin
1 mM	Glycerolphosphat
1 %	Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)

in Wasser

Protein-Probenpuffer

0,1 M	Tris[hydroxymethyl]aminomethan (Trisbase)
10 %	Glycerin
4 %	Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)
4 %	β-Mercapthoethanol
	Bromphenolblau

in Wasser

Trenngelpuffer

1,5 M	Tris[hydroxymethyl]aminomethan (Trisbase)
-------	---

in Wasser pH 8,8

Sammelgelpuffer

0,5 M	Tris[hydroxymethyl]aminomethan (Trisbase)
-------	---

in Wasser pH 6,8

Elektrophoresepuffer

25 mM Tris[hydroxymethyl]aminomethan (Trisbase)

192 mM Glycin

0,1 % Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)

in Wasser

Anodenpuffer I

300 mM Tris[hydroxymethyl]aminomethan (Trisbase)

10 % Methanol

in Wasser pH 10,4

Anodenpuffer II

25 mM Tris[hydroxymethyl]aminomethan (Trisbase)

10 % Methanol

in Wasser pH 10,4

Kathodenpuffer

40 mM Glycin

25 mM Tris[hydroxymethyl]aminomethan (Trisbase)

10 % Methanol

in Wasser pH 9,4

Stripping-Puffer von PVDF-Membranen

100 mM β -Mercapthoethanol

2 % Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)

62,5 mM Tris[hydroxymethyl]aminomethan (Trisbase)

in Wasser

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Primäre Zellkultur

2.2.1.1.1 Präparation von primären Astrozyten und Mikrogliazellen

Die Herstellung einer primären Gliazellenkultur erfolgt aus neugeborenen Balb/C-Mäusen unter sterilen Bedingungen. Nach der Dekapitation werden die Gehirne sofort entnommen und in eiskaltem HBSS gesammelt. Es folgt die Entfernung der Stammhirne, Kleinhirne und der olfaktorischen Bulben mit einem Skalpell. Anschließend werden die Meningen vollständig mit einer Pinzette entfernt, um eine Verunreinigung mit meningealen-Zellen zu reduzieren. Die Gehirne werden in eine HBSS Lösung mit 1 % Trypsin/ 0,05 % DNase überführt und für 5 min bei RT inkubiert. Die enzymatische Wirkung von Trypsin und der DNase wird durch Kultivierungsmedium beendet. Die Gewebesuspension wird zentrifugiert (800 rpm, 4°C, 12 min) und der Überstand abgenommen. Das Sediment wird in Kultivierungsmedium mit 0,05 % DNase resuspendiert und das Gewebe mit einer Pasteurpipette mechanisch dissoziiert. Die Zellen werden anschließend zweimal mit 20 ml Kultivierungsmedium gewaschen (800 rpm, 4°C, 12 min) und in Kultivierungsmedium (10 ml/ Gehirn) resuspendiert. Jeweils 10 ml dieser Zellsuspension werden in eine mit Poly-L-Lysin (100 µg/ml) beschichteten Kulturflasche (75 cm²) gegeben und bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Am nächsten Tag werden die Kulturen zweimal mit Kultivierungsmedium gewaschen. Nach 5-7 Tagen hat sich in der Kulturflasche eine Schicht von konfluenten Astrozyten gebildet, auf denen sich schwach adhärente Mikrogliazellen befinden. Die Mikrogliazellen können zu ca. 95% durch starkes Schütteln der Kulturflaschen abgelöst werden und schwimmen anschließend im Kulturmedium. Zur Gewinnung von Mikrogliazellen RNA, werden drei Kulturflaschen geschüttelt und das Medium abgenommen. Nach einer Zentrifugation erhält man ein Sediment, das aus Mikrogliazellen besteht.

2.2.1.1.2 Präparation primärer Neurone

Die primären Neurone werden aus 19 Tage alten Balb/C Embryonen gewonnen, indem das Muttertier durch zervikale Dislokation getötet wird und die Embryonen sofort aus dem Uterus in eiskaltes HBSS überführt werden. Es folgt die vollständige Entfernung der Meningen mit einer Pinzette und die Präparation der beiden Kortexhälften. Das isolierte Gewebe wird dreimal mit 5 ml HBSS in einem 15 ml

Röhrchen (3 Gehirne/ Röhrchen) gewaschen (1200 rpm, 4°C, 5 min). Danach wird das Gewebe in 3 ml HBSS mit 0,3 % Trypsin gelöst und für 30 min bei 37°C inkubiert. Durch die Zugabe von 2 ml FCS wird der enzymatische Verdau abgestoppt und das Gewebe anschließend dreimal mit 10 ml Neuro-Basalmedium gewaschen (1200 rpm, 4°C, 5 min). Nach dem letzten Waschschrift wird das Gewebe mit einer Pasteurpipette mechanisch dissoziiert und das Volumen auf 10 ml mit Neuro-Basalmedium aufgefüllt. Danach wird die Zellsuspension für 1-2 min stehend inkubiert, damit sich Zellaggregate absetzen können. Der Überstand mit den Zellen wird abgenommen, gesammelt und zentrifugiert (1200 rpm, 4°C, 5min). Das Sediment wird in Neuro-Basalmedium resuspendiert und die Neurone in einer Dichte von ca. 4×10^6 pro Kulturflasche (75 cm²) ausplattiert. Die Zellen werden bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert und können nach 5-7 Tagen für die RNA-Isolation benutzt werden.

2.2.1.1.3 Präparation von primären T-Zellen

Für die Arbeit werden ausschließlich primäre T-Zellen verwendet. Diese Zellen haben zwar eine begrenzte Lebensdauer, sind aber bezüglich ihrer Aktivität und Funktion dem physiologischen Bilde einer T-Zelle näher, als immortalisierte T-Zell-Linien. Es werden T-Zellen aus 8-12 Wochen alten Balb/C und IL-10-defizienten Mäusen gewonnen. Die Mäuse werden durch zervikale Dislokation getötet, um anschließend die axillären, inguinalen, zervikalen und dermalen Lymphknoten sowie die Milz entnehmen zu können. Die Entnahme des Gewebes erfolgt unter semi-sterilen Bedingungen in der Tierhaltung der Anatomie. Die weitere Aufarbeitung der Zellen erfolgt unter sterilen Bedingungen an einer Werkbank. Das isolierte Gewebe von zwei Tieren wird gepoolt und die Kapsel der Lymphknoten mit einer Schere zerschnitten, bevor das Gewebe durch ein Nylon-Zellsieb (70 µm Porengröße) gedrückt und einmal mit 10 ml C-RPMI Medium gewaschen wird (1200 rpm, 5 min, 4°C). Nach der Zentrifugation wird der Überstand dekantiert und das Sediment in 10 ml frisch angesetzten Lysepuffer resuspendiert und bei RT für 5 min inkubiert. Die Lyse wird eingesetzt, um enthaltene Erythrozyten zu beseitigen. Die Lysereaktion wird durch Zugabe von 20 ml C-RPMI Medium abgestoppt und nach erfolgter Zentrifugation wird das Sediment aller Tiere vereinigt und erneut gewaschen (C-RPMI, 1200 rpm, 5 min, 4°C). Danach wird das Sediment in C-RPMI Medium resuspendiert und die Zellzahl bestimmt. Für Experimente mit naiven T-Zellen werden die Zellen direkt nach der Zellzahlbestimmung verwendet. Für alle anderen

Experimente werden die T-Zellen kultiviert. Dazu werden die Zellen auf eine Konzentration von 4×10^6 Zellen/ml eingestellt und mit ConcanavalinA (ConA) unspezifisch stimuliert. ConA ist ein Metalloprotein aus der Jackbohne (*Canavalia ensiformis*) und gehört zu der Gruppe der Lektine, da es Kohlenhydrate binden kann ohne eine enzymatische Funktion zu haben. In der immunologischen Forschung wird ConA als Mitogen eingesetzt, das T-Zellen stimuliert. Die Wirkung erfolgt durch Aktivierung der T-Zellen über den CD3-Komplex. Die Ausdifferenzierung der T-Zellen in die Subpopulationen Th1 und Th2 erfolgt durch Zugabe von rekombinanten Proteinen und Antikörpern.

Tab. 2.2.1.1.3: Ansatz für Stimulation und Differenzierung der Th1 und Th2- Zellpopulation

Th1- Zellen	Th2-Zellen
ConA (1 µg/ml)	ConA (1 µg/ml)
rek. Interleukin-12 (1 ng/ml)	rek. Interleukin-4 (200 U/ml)
anti-Interleukin-4 (1 µg/ml)	anti-Interleukin-12 (1 µg/ml)

Die Zellen werden in 6-Well-Platten (4 ml/Well) ausplattiert und bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach 2 Tagen in Kultur wird die T-Zell-Proliferation durch Zugabe des Wachstumsfaktors IL-2 (25 U/ml) verstärkt und die Zellen am Tag 3 nach Präparation im Verhältnis 1:2 geteilt. Die Stärke der Proliferation kann unter dem Mikroskop beobachtet werden und ist durch das Vorhandensein von so genannten Proliferationsclustern und einer Vielzahl an großen blastischen Zellen gekennzeichnet. Nach 4-5 Tagen lösen sich die Cluster auf und es sind keine blastischen Zellen mehr sichtbar. Sobald die T-Zellen diesen Zustand erreicht haben werden sie als ruhend betrachtet und sind bereit für eine Restimulation.

2.2.1.1.4 Restimulation von T-Zellen

Bei der Restimulation werden die T-Zellen erneut durch ConA in der Gegenwart von APZs stimuliert. Dazu wird die Milz und der Thymus von 8-12 Wochen alten Balb/C-Tieren gewonnen und nach 2.2.1.1.3 aufgearbeitet. Nach Bestimmung der Zellzahl werden die APZs inaktiviert, durch die Bestrahlung mit 30 Gray (5000 rad). Die Bestrahlung führt zu Brüchen in der DNA der Zellen, die somit ihre Teilungsfähigkeit verlieren aber kurzzeitig noch in der Lage sind Antigene zu präsentieren.

Die primären Th1- und Th2-Zellen werden getrennt gesammelt, gewaschen (1200 rpm, 5 min, 4°C) und gezählt. Anschließend werden sie getrennt mit APZs in frisches Inkubationsmedium gemischt, im Verhältnis 1:3 (T-Zellen/APZs), d. h. $1,3 \times 10^6$ T-Zellen und $2,7 \times 10^6$ APZs pro ml Inkubationsmedium. Die Restimulation erfolgt mit denselben Zusätzen wie in Tab. 2.2.1.1.3 angegeben. Anschließend werden die Zellen in eine 24-Well-Platte gegeben (2 ml/Well) und für 24 h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert.

2.2.1.1.5 Aufreinigung der T-Zellen durch *Magnetic Activated Cell Sorting* (MACS)

Für die Experimente werden die CD4⁺-Zellen von den anderen Zellen in der Zellkultur mittels magnetisch aktivierter Zellsortierung getrennt. Bei der Durchführung werden die in einer Suspension befindlichen Zellen mit so genannten Micro-Beads inkubiert. Dabei handelt es sich um etwa 50 Nanometer große Magnetpartikel, an die Antikörper gebunden sind. Diese Antikörper erkennen spezifische Strukturen auf der Oberfläche von Zellen und sorgen damit für die Bindung der Micro-Beads an die gewünschte Zellpopulation. Beim Durchfluss durch eine Säule, die von einem starken Magnetfeld umgeben ist, werden die mit den Micro-Beads markierten Zellen zurückgehalten. Auf diese Weise erhält man beim Spülen der Säule nur unmarkierte Zellen, die aus dem ursprünglichen Zellgemisch entfernt wurden. Für die Experimente wird eine Negativ-Selektion der CD4⁺-Zellen durchgeführt, d. h. es werden Antikörper verwendet, die Oberflächenmarker erkennen, die nicht auf den CD4⁺-Zellen vorkommen. Die Verwendung von CD8a-, CD11b- und CD45R-Antikörpern garantiert eine gute Negativ-Selektion.

Tab. 2.2.1.1.5: Übersicht relevanter Zelloberflächenmarker/ Cluster of differentiation (CD)

Name	Zelltyp
CD4	T-Helferzellen ↑↑↑, Dendritische Zellen (Subpopulation) ↑
CD8a	Zytotoxische T-Zellen ↑↑↑, Dendritische Zellen (Subpopulation) ↑
CD11b	Makrophagen/Monozyten ↑↑↑, Granulozyten ↑↑, NK-Zellen ↑↑, Dendritische-Zellen (Subpopulation) ↑
CD45R	B-Zellen ↑↑↑ Dendritische-Zellen (Subpopulation) ↑

↑↑↑= stark exprimiert, ↑↑= mittel exprimiert, ↑ schwach exprimiert

Nachdem die T-Zellen 24h restimuliert wurden, werden sie abgenommen und zentrifugiert (1200 rpm, 5 min, 4°C). Danach wird das Sediment in 10 ml eiskalten MACS-Puffer resuspendiert, die Zellzahl bestimmt und erneut zentrifugiert. Anschließend wird der Überstand dekantiert und die Zellen mit den Antikörpern gemischt. Jeder der drei Antikörper wird in einer Konzentration von 10 µl/1x10⁷ Zellen eingesetzt und mit MACS-Puffer im Verhältnis 1:10 verdünnt. Die Inkubation erfolgte für 15 min bei 4°C, bevor die Zellen mit 10 ml MACS-Puffer gewaschen werden. In der Zwischenzeit wird die LS-Säule in den Midi-MACS-Magneten eingebracht und mit 3 ml eiskalten MACS-Puffer äquilibriert. Nach der Zentrifugation wird das Sediment in 1ml MACS-Puffer resuspendiert, vorsichtig auf eine Säule gegeben und diese nach dem Durchlauf mit 3 ml Puffer gespült. Da es sich um eine Negativ-Selektion handelte, wird der Durchfluss aufgefangen und die Zellzahl bestimmt, bevor die Zellen erneut gewaschen werden. Anschließend sind die CD4⁺-Th1- und Th2-Zellen bereit für die Experimente.

2.2.1.1.6 Qualitätsüberprüfung der T-Zell-Separation mittels Durchflusszytometrie

Um die Qualität der Separation der CD4⁺-T-Zellen zu überprüfen, werden sie einer Durchflusszytometrie oder auch Fluoreszenz-aktivierte-Zellseparation (FACS) unterzogen, wobei fluoreszenz-gekoppelte Antikörper gegen CD4, CD8a, CD11b und CD45R verwendet werden. Das Prinzip der Untersuchung beruht auf der Emission von optischen Signalen seitens der Zelle, wenn diese einen Laserstrahl passiert. Hierbei werden die in einer Lösung befindlichen Zellen durch eine Kapillare gesaugt und passieren im Sensormodul einzeln einen Laserstrahl. Die Zellen streuen einen Teil des Lichts, welches mittels Detektoren nachgewiesen wird. Die Menge des gestreuten Lichts korreliert mit der Größe der Zelle und mit ihrer Komplexität. So streuen Granulozyten, die eine raue Oberfläche und in ihrem Inneren viele Vesikel haben, deutlich mehr Licht als die sehr glatten T-Zellen. Das Vorwärtsstreulicht (FSC = *Forward Scatter*) ist ein Maß für die Beugung des Lichts im flachen Winkel und hängt vom Volumen der Zelle ab. Das Seitwärtsstreulicht (SSC = *Sideways Scatter*) ist ein Maß für die Brechung des Lichts im rechten Winkel, die von der Granularität der Zelle, der Größe und Struktur ihres Zellkerns und der Menge der Vesikel in einer Zelle beeinflusst wird. Mit diesen beiden Parametern lassen sich zum Beispiel die Zellen des Blutes bereits recht gut unterscheiden. Zugleich mit dem gestreuten Licht

kann man im Durchflusszytometer Fluoreszenzfarben messen. Nur wenige Zellen emittieren per se fluoreszierendes Licht. Daher verwendet man Farbstoffe, die an bestimmte Bestandteile der Zellen binden. Es können z. B. Antikörper, die mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind, verwendet werden. Die Antikörper sind meist gegen bestimmte Oberflächenproteine (z. B. Proteine der CD-Klassifizierung; CD = Cluster of Differentiation) gerichtet. Nach Markierung kann dann auch die Sortierung nach diesen Merkmalen erfolgen. Durch Einsatz verschiedenfarbiger Laser kann die Anzahl der einsetzbaren Farbstoffe und damit die Informationsdichte erhöht werden. Bei Verwendung mehrerer Laser kann eine Vielzahl von Fluoreszenzfarben gleichzeitig gemessen werden. Für die Charakterisierung der Zellpopulation werden 1×10^6 Zellen/ Färbung nach der Separation entnommen und mit 1ml FACS-Puffer gewaschen (1200 rpm, 5 min, 4°C). Nach dem Dekantieren des Überstandes werden die Zellen in einem Volumen von 50 µl FACS-Puffer mit den entsprechend verdünnten Antikörpern (CD4, CD8a, CD11b, CD45R) resuspendiert, die entweder FITC oder PE gekoppelt sind.

Tab. 2.2.1.1.6 Übersicht der verwendeten Antikörper und deren Verdünnung

Antikörper	Fluoreszenzfarbstoff	Verdünnung
CD4	FITC	1:500
CD8a	PE	1:500
CD11b	FITC	1:500
CD45R	FITC	1:500

Als Kontrolle werden Zellen mitgeführt, die nicht mit einem Antikörper inkubiert sind. Alle Proben werden für 10 min bei RT inkubiert und anschließend mit 1ml FACS-Puffer gewaschen, bevor sie in 200 µl FACS-Puffer resuspendiert werden und bereit für die Messung sind. Die Messung der Zellen erfolgt mit einem FACS Calibur-Gerät, wobei die Grundeinstellungen mit Hilfe der ungefärbten Zellen durchgeführt werden. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der Software CellQuestPro® der Firma BD Biosciences.

2.2.1.1.7 Auftauen von T-Zellen

Das Auftauen von T-Zellen wird in einem Wasserbad mit 37 °C durchgeführt. Die Zellen werden dann in 10 ml Medium aufgenommen und zentrifugiert (1200 rpm, 5 min, 4°C), um das im Einfriermedium enthaltene DMSO zu beseitigen. Das Sediment wird in 10 ml frischem, angewärmten Medium aufgenommen und die Zellzahl bestimmt, bevor die Zellen restimuliert werden.

2.2.1.1.8 Einfrieren von T-Zellen

Primäre T-Zellen, die nicht direkt für ein Experiment benutzt und somit nicht restimuliert werden, können für einen gewissen Zeitraum eingefroren und gelagert werden. Dazu werden die Zellen abgenommen, einmal mit frischem C-RPMI Medium gewaschen (1200 rpm, 5 min, 4°C) und anschließend die Zellzahl bestimmt. Die Zellen werden in eiskaltem Einfriermedium (FCS + 10 % DMSO) resuspendiert (ca. 50×10^6 Zellen/ml). Das DMSO soll die Bildung von Eiskristallen beim Einfrierprozess verhindern, die die Zellen zerstören würden. Jeweils 1 ml der Zellsuspension wird in ein Kryo-Röhrchen überführt und in einer Einfrierbox bei -80°C gelagert, bis die Zellen vollständig eingefroren sind. Die Zellen konnten max. 3-4 Wochen bei -80°C gelagert werden und müssen für eine längere Lagerung direkt nach dem Einfrieren in flüssigen Stickstoff überführt werden.

2.2.1.1.9 Charakterisierung der T-Zellen mittels ELISA

Die Subpopulationen Th1- und Th2-Zellen werden bezüglich ihres Zytokin-Profiles untersucht. Dazu wird die Zellkulturüberstände auf die Zytokine IL-4, IL-10, IL-13, IFN- γ und TGF- β mittels spezifischer ELISA untersucht. Direkt nach der Zellseparation der CD4⁺-Zellen (2.2.1.1.5) werden $4,6 \times 10^6$ CD4⁺-Th1 und Th2-Zellen in jeweils 1200 μ l C-RPMI Medium resuspendiert und in einem Well einer 48-Well-Platte für 24h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Danach werden die Zellen zusammen mit dem Medium abgenommen und zentrifugiert (1200 rpm, 5 min, 4°C). Der Überstand wird direkt bei -80°C eingefroren und bis zur ELISA-Analyse gelagert.

2.2.1.1.10 IL-4-Depletions-Assay der T-Zellen

Der IL-4-Depletions-Assay ermöglichte es innerhalb einer Th2-Zellpopulation, diejenigen Zellen zu markieren, die IL-4 produzieren und mittels einer MACS-Positiv-Selektion herauszuziehen [233, 234]. Man kann innerhalb der Th2-Population

mehrere Zelltypen charakterisieren. Es gibt dabei nur wenige Zellen, die nur IL-4 oder IL-4 und IL-10 produzieren. Diese beiden Zelltypen werden im Verlaufe des Assays mit einem MACS-Bead-Antikörper gegen IL-4 markiert und aus der Zellpopulation gezogen. Dazu werden Th2-Zellen restimuliert und nach 4 h in Kultur aufgearbeitet. Der Assay erfolgte nach Herstellerangaben mit dem *Mouse IL-4-Secretion-Assay Cell Enrichment and Detection Kit*® (Miltenyi, Deutschland) Nachdem die IL-4 produzierenden Zellen herausgezogen sind, werden die Zellen weiter kultiviert. 24 h nach der Restimulation werden sowohl die IL-4-depletierten Th2-Zellen als auch die nicht depletierte Kontrollgruppe auf CD4⁺-Zellen selektioniert. Diese Zellen werden einerseits für eine Charakterisierung durch ELISA verwendet, als auch im Kollagen Auswachsassay eingesetzt.

2.2.1.1.11 CFSE-Markierung von Th2-Zellen

Damit die Migration von Th2-Zellen nach der Injektion in die Rückenmarkläsion nachzuverfolgen ist, werden diese vorher mit einem fluoreszierenden Farbstoff markiert. Ein etablierter Farbstoff ist das CFSE, das sich frei im Zytoplasma der Zelle befindet und bei einer Zellteilung gleichmäßig weitergegeben wird, wodurch Zellteilungsbeobachtungen möglich werden [235]. Nach der CD4⁺-Selektion der Th2-Zellen werden diese zweimal mit PBS gewaschen (25 ml, 1200 rpm, 5 min, 4°C) und die Zellzahl bestimmt. Anschließend werden 1×10^7 Zellen in 5 µM CFSE/PBS resuspendiert und für 8 min dunkel inkubiert. Die Färbung wird mit 25 ml C-RPMI abgestoppt und die Zellen dreimal mit C-RPMI Medium und dann dreimal mit PBS gewaschen (25 ml, 1200 rpm, 5 min, 4°C). Anschließend wird die Zellzahl bestimmt und die Zellen in PBS (1×10^5 Zellen/µl) resuspendiert bevor sie in das Rückenmark injiziert werden können.

2.2.1.1.12 Kultivierung von J558-Zellen

Bei den J558-Zellen handelt es sich um Plasmazytomzellen (Myelomzellen). Es sind bösartige Non-Hodgkin-Zellen, die sich aus Plasmazellen (B-Zellen) entwickelt haben und primär in Lymphknoten und im Knochenmark auftreten. Für die Experimente werden unveränderte, so genannte Wildtyp-J558-Zellen als Kontrollzellen verwendet und IL-4-J558-Zellen. Die IL-4-J558-Zellen sind durch Infektion mit einem Retrovirus, der die Sequenz für murines IL-4 enthält, erzeugt worden. Bei den J558-Plasmazytomzellen handelt es sich um nicht-adhärenente Zellen, die in einer

Zellkulturflasche kultiviert werden. Alle 2-3 Tage werden die Zellen in Abhängigkeit von der Dichte geteilt. Das verwendete Zellkulturmedium basierte auf RPMI-Medium (10 %FCS, 5% Penicillin/Streptomycin). Für die Analyse des Zytokinprofils werden jeweils $4,6 \times 10^6$ Wildtyp-J558 und IL-4-J558-Zellen in 1200 μ l Medium resuspendiert und in einem Well einer 48-Well-Platte bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Die Zellen werden nach 24h abgenommen, zentrifugiert (1200 rpm, 5 min, 4°C) und der Überstand bei -80°C gelagert, bis die ELISA Untersuchungen durchgeführt werden. Das Einfrieren und Auftauen erfolgte Analog der T-Zellen (siehe 2.2.1.1.7 und 2.2.1.1.8).

2.2.1.2 Entorhinal-hippocampale Schnittkulturen

Wie bereits unter 1.2.2 beschrieben, besitzt die entorhinal-hippocampale Formation eine relativ einfache und sehr gut charakterisierte Zytoarchitektur, einschließlich der afferenten und efferenten Projektionen. Deshalb wird dieses Gehirnareal als ein gutes Modell zur *in vivo* und *in vitro* Untersuchung von neurowissenschaftlichen Fragestellungen angesehen. Für *in vitro* Untersuchungen dienen häufig organotypische Schnittkulturen von Gehirnen als ein Modell, mit dem gut neurodegenerative, neuroinflammatorische, neuroprotektive und neuroregenerative Prozesse nach einer Schädigung untersucht werden können [236-239].

Für neurodegenerative und neuroinflammatorische Untersuchungen haben sich 6-9 Tage alte Schnittkulturen als besonders geeignet herausgestellt, da es zu diesem Zeitpunkt zu einer Wiederherstellung organotypischer Zellbedingungen in der inneren Zone kommt [240].

Für Neuroprotektion und Neuroregeneration sind dagegen Schnittkulturen geeignet, die unmittelbar nach ihrer Präparation verwendet werden. Diese Akutschnitte simulieren die Bedingungen nach einem mechanisch gesetzten Primärschaden. Unter dem Begriff Neuroprotektion wird eine Verringerung oder sogar ein Schutz von neuronalen Schaden und Zelltod durch den primären oder sekundären Schaden verstanden. Bei der Neuroregeneration betrachtet man die Vorgänge, die zur Wiederherstellung von neuronalen Verbindungen führen, entweder durch den Ersatz von neuronalen Zellen oder durch Wiederauswachsen ihrer Fortsätze. Ein reaktives Aussprossen (Sprouting) intakter Axone trägt genauso zur Reorganisation des geschädigten Hirngewebes (funktionelle Regeneration) bei, wie das Neuauswachsen von geschädigten Axonen [241].

2.2.1.2.1 Kokulturen

In der Arbeit wird der Einfluss von Th2-Zellen auf das axonale Auswachsen untersucht. Dazu wird ein schon bekanntes Kokulturmodell modifiziert. Es diente ursprünglich dazu, repulsive oder attraktive Eigenschaften eines Faktor zu untersuchen [242, 243]. Für die Untersuchungen werden entorhinal-hippocampale Schnittkulturen verwendet, wobei der Hippocampus vom entorhinalen Kortex (EC) abgetrennt wird, was gleichzeitig zu einer gezielten Durchtrennung des Tractus perforans führte. Für die Kollagen-Kokulturen wird ausschließlich der EC als Modell des axonalen Auswachsens in eine Kollagenmatrix nach einem primären mechanischen Schadens verwendet.

2.2.1.2.2 Präparation organotypischer entorhinal-hippocampaler Schnittkulturen

Für die Präparation der organotypischen entorhinal-hippocampalen Schnittkulturen werden 3 Tage alte Mäuse (Balb/C, IL-4-Rezeptor-defizient, Stat6-defizient und IL-4-Rezeptor-mutant) verwendet. Nachdem die Tiere dekapitiert wurden, folgte die Entnahme der Gehirne unter sterilen Bedingungen. Die Gehirne werden sofort in eiskaltes Präparationsmedium überführt und mit Hilfe eines Binokulars wird die weitere Präparation durchgeführt. Zunächst werden die beiden Hemisphären getrennt und das Cerebellums abgeschnitten. Es folgte die Abtrennung des Hirnstamms und des Neokortex von der entorhinal-hippocampalen Formation, die Ähnlichkeit mit zwei aneinander liegenden Bananen hat. Die entorhinal-hippocampalen Formation wird auf die Unterlage des Mcllwain TC752 Gewebeschnieder (Helmut Saur Laborbedarf, Deutschland) gelegt und dann in 350 µm dicke Scheiben geschnitten. Nach dem Schneiden wird das Gewebe mit einem Spatel in frisches eiskaltes Präparationsmedium überführt und die Schnitte getrennt. Es werden nur Schnitte, die sich in der Mitte der Formation befanden, ausgewählt (siehe Abbildung 1.3). Die Ausbeute lag pro Gehirn zwischen 10 und 12 Schnitten. Mit dem Skalpell wird der entorhinale Kortex anschließend vom Hippocampus abgetrennt und in dem Kollagen-Kokultur-Experiment eingesetzt.

2.2.1.2.3 Kollagen-Kokultur

Für die Kokultivierung mit entorhinalen Kortex-Schnittkulturen werden CD4⁺-Th1, CD4⁺-Th2 und naive Zellen verwendet, sowie J558-Zellen. Sowohl die Zellen als

auch die Schnittkultur werden dazu in eine Kollagenmatrix eingebettet. Dabei wachsen die Axone in die Kollagenmatrix ein, ohne ihre Zielzellen zu erreichen. Die Zielzellen befinden sich normalerweise im Hippocampus (siehe 1.2.2).

Die Kollagenmatrix besteht aus Typ-I-Kollagen aus Rattenschwänzen, das in 0,1 M Essigsäure gelöst wird (2 mg/ml). Für jedes Experiment wird das gelöste Kollagen frisch mit DMEM-Medium gemischt und mit dem Rekonstituierungspuffer auf einen pH von 7,4-7,8 eingestellt. 95 μ l dieser frischen Kollagenlösung wird mit 5 μ l der jeweiligen Zellsuspension ($8 \times 10^4/\mu$ l C-RPMI-Medium) gründlich gemischt. Aus jedem Ansatz werden drei Tropfen mit jeweils 30 μ l Volumen auf einen Superfrost-Plus-Objektträger gegeben, der sich in einer Quadriperm Kulturschale befinden. Die Kulturschale wird für 15 min bei 37°C inkubiert, damit das Kollagen auspolymerisieren kann. Danach wird unmittelbar neben dem Zelltropfen ein weiterer Kollagentropfen ohne Zellen gesetzt und die EC-Schnittkultur darin plaziert. Dabei zeigt die konkave Seite der Schnittkulturen zu den Zellen, hatte aber genügend Abstand, so dass es nicht zu einem Zell-Zell-Kontakt zwischen den Zellen und den auswachsenden Axonen kommt. Anschließend wird das Kollagen erneut für 15 min bei 37°C inkubiert, damit es polymerisieren kann. Es folgt die Zugabe von 5 ml angewärmten Inkubationsmedium je Well und der anschließenden Inkubation für 48h bei 37°C und 5 % CO₂ im Inkubator.

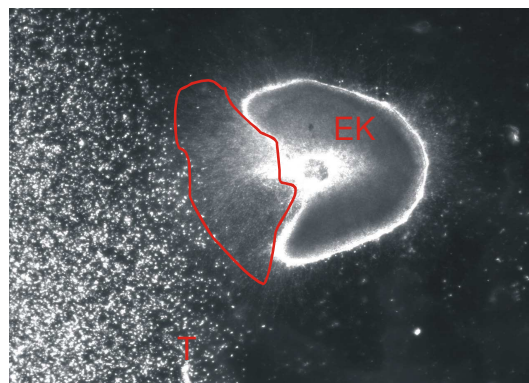


Abb. 2.2.1.2.3: Übersicht der Kokultivierung einer Schnittkultur mit T-Zellen

Die Kortex-Schnittkultur wird in einen Kollagentropfen kultiviert. Neben der Schnittkultur wird ein Kollagentropfen mit T-Zellen kultiviert. Nach zwei Tagen in Kultur wird die zellzugewandte Seite der Schnittkultur ausgewertet. Der rote Bereich markiert den auszuwertenden Bereich der Schnittkultur.

EK= entorhinaler Kortex, T= T-Zellen

2.2.1.2.4 Kollagen-Kokultur mit blockierenden Antikörper und Substanzen

In der Arbeit wird untersucht, welche der Th2-typischen Zytokine einen Einfluss auf das axonale Auswachsen von entorhinalen Kortex-Schnittkulturen haben. Dazu werden funktionsblockierende Antikörper gegen IL-4, IL-10 (beide IgG1) und IL-13 (IgG2b) verwendet und mit unspezifischen Isotyp-Kontrollantikörpern verglichen. Alle Antikörper werden in das Kollagen gemischt, so dass bestimmte vorher ausgetestete Endkonzentrationen erreicht werden. Die Antikörper befinden sich sowohl in dem Kollagen der Schnittkulturen, als auch im Kollagen der Th2-Zellen. Bei der Herstellung der Suspension aus Th2-Zellen, Antikörpern und Kollagen muss in der Berechnung darauf geachtet werden, dass maximal 8 µl Zellsuspension und Antikörper mit 92 µl Kollagen gemischt werden können, da ansonsten das Kollagen nicht mehr polymerisiert. Entsprechend werden die Antikörper vorverdünnt bzw. die Th2-Zellsuspension höher konzentriert.

Zusätzlich wird untersucht über welchen Mechanismus die Th2-Zellen das axonale Auswachsen von entorhinalen Kortex-Schnittkulturen beeinflussen. Dazu werden funktionsblockierende Substanzen verwendet, deren optimale Konzentration vorher ausgetestet wird. Die verwendeten Substanzen sind alle in DMSO gelöst, wodurch sie nicht direkt in das Kollagen gemischt werden können, da sie die Polymerisierung verhindern. Aus diesem Grund werden die Substanzen bzw. das DMSO in das Inkubationsmedium gemischt.

Tab. 2.2.1.2.4 Übersicht der verwendeten blockierende Antikörper und Substanzen

Name	Verwendete Endkonzentration
IL-4-IgG1-Antikörper	50 ng/ml
IL-10-IgG1-Antikörper	50 ng/ml
IL-13-IgG2b-Antikörper	100 ng/ml
IgG1-Isotyp-Kontrollantikörper	50 ng/ml
IgG2b-Isotyp-Kontrollantikörper	100 ng/ml
LY-294002 blockiert Akt-Kinase	100 µM
U0126 blockiert MAP-Kinase	100 µM
K252a blockiert Trk Rezeptoren	200 nM

2.2.1.2.5 Kollagen-Kokultur mit rekombinanten Proteinen

Neben dem Einfluss von Zellen auf das axonale Auswachsen von entorhinalen Kortex Schnittkulturen wird auch untersucht welchen Effekt rekombinant hergestellte Proteine haben. Dazu werden Schnittkulturen von Balb/C Mäusen mit verschiedenen IL-4 Konzentrationen (500 ng/ml, 50 ng/ml, 5 ng/ml, 500 pg/ml, 50 pg/ml und 5 pg/ml) inkubiert. Außerdem wird untersucht, ob NT-3 und IL-6 (beide 500 ng/ml) einen Einfluss auf das axonale Auswachsen von Schnittkulturen der IL-4-Rezeptor-defizienten, Sta6-defizienten sowie IL-4-Rezeptor-mutanten Mäuse haben. Die rekombinanten Proteine werden in das Inkubationsmedium gemischt, so dass die gewünschten Endkonzentrationen erzielt wird. Anders als unter 2.2.1.2.3 beschrieben werden die Schnittkulturen nicht in einem Kollagentropfen auf einem Superfrost-Plus-Objekträger platziert, sondern auf einem sterilen Deckglas (\varnothing 12 mm), das sich in einer 4-Well-Platte befindet. Es wird jeweils 500 μ l Inkubationsmedium je Schnitt verwendet.

2.2.1.2.6 Auswertung der Kollagen-Kokulturen

Die Auswertung aller Kollagen-Kokultorexperimente erfolgt 48h nach der Präparation. Dabei wird das axonale Auswachsen der zellzugewandten Seite in mindestens drei unabhängigen Experimenten analysiert. Als Kriterium für das axonale Auswachsen, wird die axonale Dichte jeder Schnittkultur nach einer semiquantitativen Methode bewertet. Drei unabhängige Experimentatoren bewerteten die verblindeten Schnittkulturen nach festgelegten morphologischen Kriterien zwischen 0 und 3 (siehe Abb. 2.2.1.2.6). Dabei bekommen Schnittkulturen mit keinem Auswachsen eine 0 und Schnittkulturen mit sehr vielen und dicht gelagerten Axonen eine 3. Für jede Gruppe wird der Mittelwert und der Standardfehler des Mittelwertes berechnet und statistisch auf signifikante Unterschiede analysiert. Für die statistische Analyse wird der Mann-Whitney-U Test verwendet.

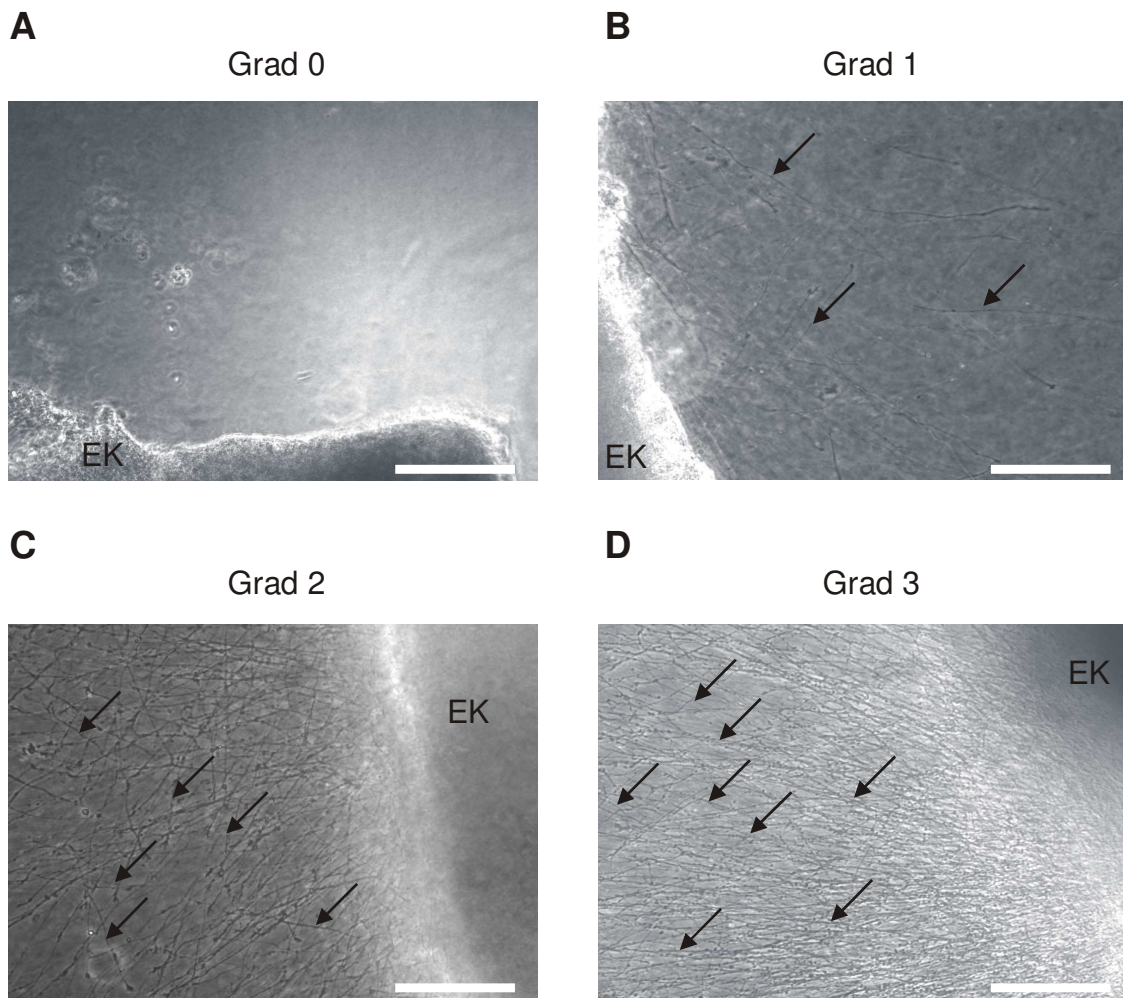


Abb. 2.2.1.2.6: Morphologische Kriterien für die Dichteausswertung der Kollagen-Kokulturen

Nach zwei Tagen in Kultur wird die zellzugewandte Seite der Schnittkulturen nach festgelegten morphologischen Kriterien von drei Experimentatoren nach Verblindung analysiert. Beispiele für die verschiedenen Dichtegrade: Grad 0 (A), Grad 1 (B), Grad 2 (C) und Grad 3 (D).

EK= entorhinaler Kortex, Pfeile markieren ausgewachsene Axone, Größenstandard Bild A-D= 100 µm

2.2.1.2.7 GFP-Kokultur

Die Kollagen-Kokulturen ermöglicht eine Untersuchung des axonalen Auswachsens von entorhinalen Kortex Schnittkulturen unter dem Einfluss verschiedener Faktoren. Dabei wachsen die Axone in die Kollagenmatrix, jedoch ohne die Zielzellen im Hippocampus erreichen zu können. Es ist bekannt, dass Axone des entorhinalen Kortex in einer organotypischen Schnittkultur die Fähigkeit beibehalten, in den Gyrus dentatus einzuwachsen. Dabei wird erneut die Innervation spezifischer Schichten erreicht [236, 241, 244, 245]. Diese Fähigkeit zu regenerieren ist abhängig von dem Alter der verwendeten Tiere und der Zeit in Kultur [246, 247]. Aufgrund der zielspezifischen Innervation von Axonen des Tractus perforans, kann deren

Wachstum und Remodellierung studiert werden. Außerdem ist es möglich, die Anzahl der reinnervierenden Axone nach einer Axotomie zu quantifizieren. Dazu müssen die reinnervierenden Axone markiert werden. Die Anwendung von Tracern bedarf dabei viel Erfahrung, um unbeabsichtigte mechanische Schäden beim Tracern zu vermeiden. Zusätzlich können Ungenauigkeiten beim Applizieren dazu führen, dass zu wenig oder zu viel Axone markiert werden. Das führt zu falsch positiven oder falsch negativen Ergebnissen. Die Verwendung von Enhanced-Green-Fluorescence-Protein (EGFP)-markierten Zellen stellt eine mögliche Vereinfachung dar. Dazu wurde von Bernd Heimrich und Robert Glumm [248] ein Modell etabliert, in dem Schnittkulturen aus β -Aktin-EGFP exprimierenden Mäusen verwendet werden. Die β -Aktin-EGFP Mäuse sind etablierte und sehr gut charakterisierte transgene Mäuse, die besonders leicht zu unterscheiden sind. Neugeborene Mäuse können makroskopisch mit einer Hand-UV-Lampe (254 nm/366 nm) unterschieden werden, da sie unterschiedlich stark fluoreszieren. Bei einer Verpaarung von heterozygoten Eltern können in einem Wurf sowohl Wildtyp-, heterozygote- und homozygote Tiere entstehen. Wildtyp-Tiere fluoreszieren nicht und homozygote Tiere fluoreszieren sichtbar stärker als heterozygote Tiere. Bei den homozygoten β -Aktin-EGFP-Mäusen wird in allen Körperzellen mit der Ausnahme von roten Blutkörperchen und Haaren EGFP exprimiert, das sich zytoplasmatisch anreichert.

2.2.1.2.8 Präparation der EGFP-Kokulturen

Für die Präparation der EGFP-Kokulturen werden Wildtyp-Mäuse und homozygote β -Aktin-EGFP Mäuse aus demselben Wurf verwendet. Die Präparation der Schnittkulturen folgt dem Protokoll wie unter 2.2.1.2.2 beschrieben. Es werden ebenfalls nur die mittleren entorhinal-hippocampalen Schnittkulturen ausgesucht und der Hippocampus vom EK mit dem Skalpell getrennt. Der Hippocampus wird von den Wildtyp-Tieren und der EK von den β -Aktin-EGFP Tieren verwendet. Jeweils ein Hippocampus und ein EK werden auf einer semipermeablen Membran aneinander gelegt, so dass die natürliche Formation wiederhergestellt wird. Alle Axone, die aus dem β -Aktin-EGFP EK auswachsen, sind grün-fluoreszierend und konnten sehr gut in dem nicht-fluoreszierenden Wildtyp-Hippocampus identifiziert werden. Die semipermeable Membran wird vorher in ein Well einer 6-Well-Platte mit 1200 μ l Inkubationsmedium gesetzt und mindestens 10 min bei 37°C inkubiert. Sowohl die Zellen ($4,8 \times 10^6$ Zellen/1200 μ l) als auch das rekombinante Protein (500 ng/ml)

werden in das Inkubationsmedium unter der semipermeablen Membran gemischt. Nach 48h in Kultur werden die EGFP-Kokulturen ausgewertet.

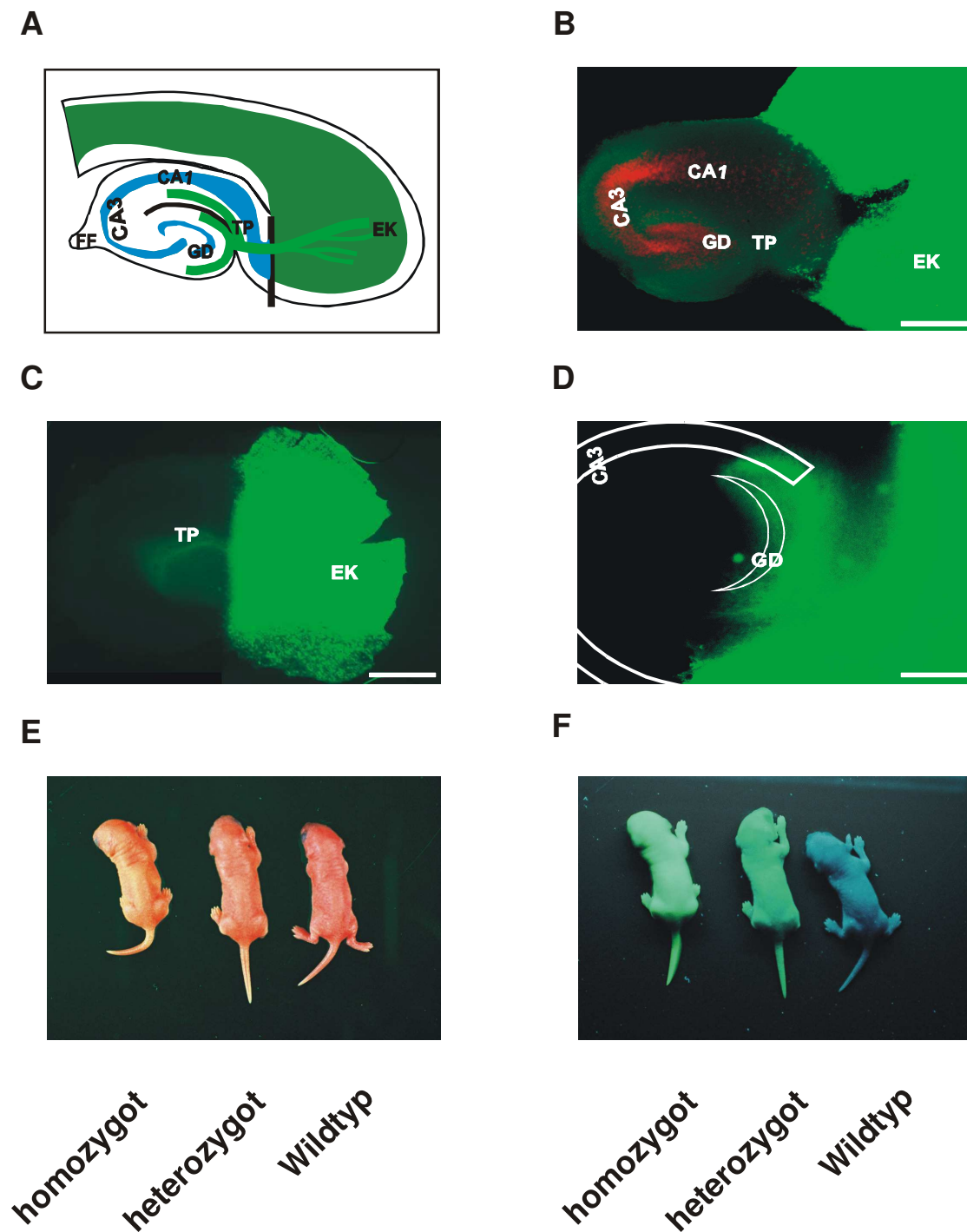


Abb. 2.2.1.2.8: Das EGFP Schnittkulturen Modell zur Analyse des Einwachsens von Axonen in den Hippocampus (nach [249])

- A) Schematische Darstellung des EGFP-Schnittkulturen-Modells. Der EGFP-positive entorhinale Kortex (EK) einer β -Aktin-EGFP-transgenen Maus wird zusammen mit dem Hippocampus einer Wildtyp-Maus aus dem selben Wurf kokultiviert. Die Axone der entorhinal-hippocampalen Projektion haben ihren Ursprung in dem EGFP-positiven (EK), wachsen als EGFP-positiver Tractus perforans (TP) in den EGFP-negativen Hippocampus und enden im Gyrus dentatus (GD).
- B) 14 Tage nach der Kultivierung sind EGFP-positive Axone (Pfeile) in den Wildtyp-Hippocampus eingewachsen und enden im Gyrus dentatus, der durch Ethidiumbromid eine rot fluoreszierende Nisselfärbung hat. Die EGFP Fluoreszenz des einwachsenden Tractus perforans ist reduziert durch die Überlagerung der Nissel-Färbung. Belichtungszeit 2500 ms.
- C) 2 Tage nach Kultivierung sind EGFP-positive Axone (Pfeile) in den Wildtyp-Hippocampus eingewachsen. Das Kästchen markiert den Bildausschnitt der in Abbildung D vergrößert dargestellt ist. Belichtungszeit 2500 ms.
- D) Ein Bündel von Tractus-perforans-Axonon, die EGFP im Axoplasma exprimieren, sind im Wildtyp-Hippocampus sichtbar. Wegen der Vergrößerung ist eine Belichtungszeit von 1500 ms ausreichend um die starke EGFP Fluoreszenz in den Axonen sichtbar zu machen. Einzelne Axone können nicht differenziert werden, da das Foto viele überlappende Axone zeigt.
- E) 2 Tage alte β -Aktin-EGFP Mäuse bei Tageslicht.
- F) Mittels einer Hand-UV-Lampe (254 nm/366 nm) ist zu erkennen, dass die EGFP-Fluoreszenz bei homozygoten Tieren maximal, bei heterozygoten reduziert und bei wildtyp Tieren nicht vorhanden ist.
- CA= Cornu ammonis; GD= Gyrus dentatus; EK= entorhinaler Kortex; FF= Fimbria-Fornix; TP= Tractus perforans; schwarze Balken= Grenze zwischen EGFP-positiven entorhinalen Kortex und EGFP-negativen Hippocampus. Größenstandard: B,C,D = 100 μ m

2.2.1.2.9 Auswertung der EGFP-Kokulturen

Die EGFP-Kokulturen wird nach 48h in Kultur ausgewertet. Dazu wird zunächst das Medium unterhalb der Membran abgenommen und die Membran mit den Schnittkulturen vorsichtig mit 0,1 M Phosphat-Puffer gewaschen. Danach wird die Membranen erneut in die 6-Well Platte gelegt und die Fixierlösung großzügig unter und auf die Membran gegeben. Die 6-Well-Platten werden dann für 20 min im Dunkeln auf einen Schüttler gestellt. Danach wird die Fixierlösung abgenommen und das Well mit 0,1 M Phosphat-Puffer vollständig aufgefüllt. Die Membranen mit den Schnittkulturen werden bei Bedarf auf den Boden des Wells gedrückt. Die 6-Well-Platte wird anschließend für 1 h im Dunkeln auf einen Schüttler gestellt. Anschließend werden die Schnittkulturen mit einem feinen Pinsel unter einem Binokular abgelöst, auf einen Superfrost-Plus-Objekträger überführt und mit Immu-Mount® Lösung versiegelt. Am nächsten Tag konnten die Schnittkulturen fotodokumentiert werden. Dazu wird der Hippocampus von allen EGFP-Kokulturen mit einer Belichtungszeit von 2500 ms fotografiert und anschließend mit Hilfe einer

Bildanalyse-Software ausgewertet werden. Die Bildanalyse-Software von MetaMorph ermöglichte es in einer definierten Fläche die durchschnittliche Fluoreszenzintensität zu messen. Diese Fluoreszenzintensität steht im Verhältnis zu der Menge an neu eingewachsenen EGFP-positiven Axonen aus dem β -Aktin-EGFP EK. Die definierte Fläche beträgt $3000 \mu\text{m}^2 \pm 10 \%$, was vor Beginn der Experimente festgelegt und für alle Experimente beibehalten wurde. Die MetaMorph-Software ermöglicht es, mit Hilfe der Computer-Maus Flächen zu zeichnen und deren Größe zu überprüfen. Für jede Gruppe wird der Mittelwert und der Standardfehler des Mittelwertes berechnet und statistisch auf signifikante Unterschiede analysiert. Für die statistische Analyse wird der Mann-Whitney-U Test verwendet.

2.2.2 Molekularbiologie

2.2.2.1 RNA-Isolation

Für die Präparation der Gesamt-RNA aus Geweben und Zellen werden ausschließlich Ribonuclease (RNase) freie Lösungen und Geräte verwendet. Die Gesamt-RNA ist die Summe aller RNA Moleküle, die in einer Zelle vorkommen: ribosomale-RNA (rRNA), transfer-RNA (tRNA) und boten-RNA (mRNA). Die Präparation erfolgt nach dem Prinzip der Phenol-Chloroform-Extraktion unter Verwendung des phenolhaltigen Reagenz TRIzol-G[®]. Dabei hilft das organische Lösungsmittel Phenol den Komplex aus Proteinen und Nukleinsäuren zu dissoziieren und die Proteine zu denaturieren. Nach der Zugabe von Chloroform können drei Phasen identifiziert werden. Die untere Phenolphase enthält die DNA, die Interphase die Proteine und die obere wässrige Phase die RNA. Bei Zugabe von Isopropanol und Ethanol kommt es in Gegenwart monovalenter Kationen zur Aggregation von Nukleinsäure-Molekülen und zu deren Fällung, da ihnen die Hydrathülle entzogen wird.

Nach der Entnahme der verwendeten Gewebe werden diese sofort in eiskalten PBS-Puffer gegeben und bei 16000g für 10 sec zentrifugiert, um anhaftendes Blut zu entfernen. Danach wurde der Puffer vollständig abgenommen und das Gewebe sofort für die RNA-Präparation verwendet. Es wird 1 ml des Reagenz TRIzol G zu 100 mg Gewebe hinzugefügt und mit einem Ultra Turrax T25 (IKA, Staufen, D) homogenisiert. Die Einzelzellen (Neurone, Astrozyten und Mikrogliazellen) werden wie unter 2.2.1.1.1 und 2.2.1.1.2 beschrieben hergestellt. Jeweils eine konfluent bewachsene 50 ml Kulturflasche mit Neuronen und Astrozyten wird zweimal mit 20

ml PBS gewaschen und anschließend mit 10 ml PBS und einem Zellschaber vom Boden abgelöst und die Zellsuspension zentrifugiert (800 rpm, 4°C, 5 min). Die Mikrogliazellen werden von 2 Kulturflaschen abgeschüttelt (siehe 2.2.1.1.1), der Überstand abgenommen und zentrifugiert (800 rpm, 4°C, 5 min). Das Sediment der Zentrifugation aller drei Zelltypen wird mit jeweils 1 ml TRIzol G homogenisiert. Zu jeweils 1 ml Gewebe- bzw. Zellhomogenisat werden 0,2 ml Chloroform gegeben, mehrfach stark geschüttelt und für 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wird das Gemisch zentrifugiert (16000 g, 4°C, 20 min) und die obere wässrige Phase vollständig abgenommen. Um zu vermeiden, dass sich noch Phenol in der Probe befindet, wird die wässrige Phase auf „Phase Lock Gel Light 1,5 ml“ Eppendorf-Reaktionsgefäße (Eppendorf, Hamburg, D) gegeben und zentrifugiert (16000g, 4°C, 20 min). Die obere Phase wird anschließend abgenommen und mit demselben Volumen Isopropanol vermischt, bei -20°C für mindestens 2 h gelagert und anschließend zentrifugiert (16000 g, 4°C, 20 min). Der Überstand wird vollständig abgenommen, das Sediment zweimal mit 70 % Ethanol und einmal mit 100 % Ethanol gewaschen bevor es Luftgetrocknet und in 20 µl DEPC-Wasser gelöst wird. Anschließend werden Reste von DNA mittels der DNAase aus dem DNA-free™ Kit (Ambion, Austin, USA) nach Herstellerangaben beseitigt. Es folgt eine Konzentrationsbestimmung mittels photometrischer Messung und eine Qualitätskontrolle mittels nativer Agarose-Gelelektrophorese. Nach der Agarose-Gelelektrophorese müssen zwei distinkte Banden sichtbar sein. Die beiden Banden sind auf der Höhe von 1,9 und 4,7 kb sichtbar und entsprechen der 18s und 28s rRNA. Die RNA wird bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.2.2.2 cDNA-Synthese

Für eine Transkription der aus den Zellen und Geweben isolierten RNA in complementary DNA (cDNA), wird eine reverse Transkriptase verwendet. Die Umschreibung erfolgt nach Herstellerangaben mit dem High Capacity cDNA Archive Kit® (Applied Biosystems, Foster City, USA). Für jede Probe werden jeweils 2 Ansätze durchgeführt. 2 µg RNA werden zusammen mit DEPEC-Wasser, dem RT-Puffer, der dNTP-Lösung und den Primern auf ein Volumen von 19 µl eingestellt. Danach wird in eine Probe 1 µl Reverse-Transkriptase hinzugefügt und in die andere 1 µl DEPEC-Wasser. Die Wasser-Probe wird mitgeführt um zu überprüfen, ob die RNA-Proben mit genomischer DNA kontaminiert sind. Danach werden die Proben

kurz zentrifugiert und für 10 min bei 25°C inkubiert, bevor sie für 2 h bei 37°C inkubiert werden. Für die konventionelle PCR wird die cDNA unverdünnt verwendet und für eine TaqMan-Real-Time-PCR vorher 1:5 mit Wasser verdünnt.

2.2.2.3 DNA-Isolation

Die Isolation von genomischer DNA erfolgt bei adulten und neugeborenen Mäusen aus einer Schwanzbiopsie nach Herstellerangaben mit dem NucleoSpin Tissue Kit (Macherey-Nagel, Düren). Die DNA von adulten Mäusen wird mit 50 µl BE-Puffer eluiert und die DNA von neugeborenen Mäusen mit 20 µl BE-Puffer. Anschließend wird die DNA-Konzentration mittels Agarose-Gelelektrophorese bestimmt. 1 µl DNA-Lösung wird im Vergleich zu definierten Marker-DNA-Menge (DNA-Größenstandard) aufgetragen und diese miteinander verglichen.

2.2.2.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die in den Nukleinsäuren vorhandenen Purin- und Pyrimidinbasen absorbieren, bedingt durch ihre Ringstruktur, im ultravioletten Bereich Energie. Dabei hat jede Base ein bestimmtes Absorptionsmaximum. Die Maxima der Basen liegen zwischen 249 nm und 276 nm, so dass insgesamt betrachtet eine Quantifizierung der Nukleinsäuren im sich ergebenden Mischspektrum von 260 nm möglich ist.

Bei einer Wellenlänge von 260 nm und einer Schichtdicke der Küvette von 1 cm entspricht eine OD_{260} von 1:

- 50 µg/ml doppelsträngiger DNA
- 40 µg/ml einzelsträngiger RNA
- 33 µg/ml einzelsträngigem Oligonukleotid

$$E_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Faktor für Nukleotidspezies} = x \text{ ng/}\mu\text{l DNA}$$

Das Verhältnis $OD_{260/280}$ ist ein Maß für den Reinheitsgrad der Nukleinsäurepräparation. Für RNA Proben sollte dieser Wert über 2 liegen und für DNA zwischen 1,7 und 2. Für die folgenden Experimente werden nur Proben verwendet, die diesen Qualitätsmerkmalen entsprechen.

2.2.2.5 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wird zur Amplifikation definierter DNA-Regionen benutzt. Benötigt werden zwei Oligonukleotide (Primer), die komplementär zu dem (+)-Strang des einen Endes und zu dem (-)-Strang des anderen Endes des zu amplifizierenden DNA-Bereichs sind. Nach der Denaturierung der DNA können die Primer an die DNA-Matrize hybridisieren. Die Elongation der Oligonukleotide ausgehend vom 3'-OH-Ende führt eine hitzestabile DNA-Polymerase aus, z. B. die Taq-Polymerase aus *Thermus aquaticus*. Nachdem die gewünschte Sequenz synthetisiert worden ist, schließt sich eine Denaturierung der DNA an, worauf erneut eine Hybridisierungsphase und die Elongationsphase der Primer folgt. Durch diesen zyklischen Verlauf wird durch dreißig- bis vierzigfaches Wiederholen eine exponentielle Vermehrung des gewünschten PCR-Produkts erreicht.

Für die PCR wurde der PxE 0.2 Thermal Cycler® verwendet.

2.2.2.5.1 PCR zum Genotypisieren von Mauslinien

Tab 2.2.2.5.1.1: Einfacher Ansatz mit dem AmpliTaq DNA Polymerase Kit für IL-4-Rezeptor-defizienten Mäuse

Zusätze	Volumen
Puffer Master Mix (10x)	2,5 µl
MgCL ₂ (25 mM)	2,2 µl
dNTPS (10 mM je NTP)	2,2 µl
Primer A (20 µM)	0,69 µl
Primer B (20 µM)	0,69 µl
Primer C (20 µM)	1,38 µl
Primer D (20 µM)	1,38 µl
Taq Polymerase (5 U/µl)	0,14 µl
H ₂ O	11,55 µl
DNA (100-200 ng/µl)	2 µl
Σ	25 µl

Tab. 2.2.2.5.1.2: PCR Protokoll für Genotypisierung von IL-4-Rezeptor-defizienten Mäusen

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklenzahl
1. Denaturieren	94 °C	3 min	1
2. Denaturieren	94 °C	20 sec	
3. Hybridisieren	64 °C – 0,5 °C pro Zyklus	30 sec	12
4. Elongation	72 °C	35 sec	
5. Denaturieren	94 °C	20 sec	
6. Hybridisieren	58 °C	30 sec	25
7. Elongation	72 °C	35 sec	
8. Finale Elongation	72 °C	2 min	1
9. Kühlung	4 °C	unendlich	
Größe PCR Fragment		+/- 125 bp, +/- 280 bp	

+/-= Wildtyp-Bande, -/-= K.O.-Bande

Tab 2.2.2.5.1.3: Einfacher Ansatz mit dem AmpliTaq DNA Polymerase Kit für Stat6-defizienten Mäuse

Zusätze	Volumen
Puffer Master Mix (10x)	2,5 µl
MgCL ₂ (25 mM)	1,5 µl
dNTPS (10 mM je NTP)	1 µl
Primer A (20 µM)	0,5 µl
Primer B (20 µM)	0,5 µl
Primer C (20 µM)	0,5 µl
Primer D (20 µM)	0,5 µl
Taq Polymerase (5 U/µl)	0,1 µl
H ₂ O	16,9 µl
DNA (100 ng/µl)	1 µl
Σ	25 µl

Tab 2.2.2.5.1.4: PCR Protokoll für Genotypisierung von Stat6-defizienten Mäusen

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklenzahl
1. Denaturieren	94 °C	3 min	1
2. Denaturieren	94 °C	30 sec	
3. Hybridisieren	54 °C	30 sec	35
4. Elongation	72 °C	30 sec	
5. Finale Elongation	72 °C	2 min	1
6. Kühlung	4 °C	unendlich	
Größe PCR Fragment	+/- 275 bp, -/- 172 bp		

+/-= Wildtyp-Bande, -/-= K.O.-Bande

Tab 2.2.2.5.1.5: Einfacher Ansatz mit dem Clontech PCR-Kit für IL-4-Rezeptor-mutante Mäuse

Zusätze	Volumen
Puffer Master Mix (10x)	2,5 µl
dNTPS (10 mM je NTP)	1 µl
Primer A (10 µM)	1 µl
Primer B oder C (10 µM)	1 µl
Clontech Polymerase (5 U/µl)	0,1 µl
H ₂ O	17,85 µl
DNA	1 µl
Σ	25 µl

Tab 2.2.2.5.1.6: PCR Protokoll für Genotypisierung von IL-4-Rezeptor-mutanten Mäusen

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklenzahl
1. Denaturieren	94 °C	5 min	1
2. Denaturieren	94 °C	50 sec	
3. Hybridisieren	58 °C	50 sec	35
4. Elongation	72 °C	1 min	
5. Finale Elongation	72 °C	10 min	1
6. Kühlung	4 °C	unendlich	
Größe PCR Fragment	+/-500 bp, -/- 600 bp		

+/-= Wildtyp-Bande, -/-= K.O.-Bande

Tab 2.2.2.5.1.7: Einfacher Ansatz mit dem AmpliTaq DNA Polymerase Kit für Trk-B-defiziente Mäuse

Zusätze	Volumen
Puffer Master Mix (10x)	2,5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	1,5 µl
dNTPS (10 mM je NTP)	1 µl
Primer A (10 µM)	0,5 µl
Primer B (10 µM)	0,5 µl
Primer C (10 µM)	0,5 µl
Taq Polymerase (5 U/µl)	0,1 µl
H ₂ O	17,4 µl
DNA (100 ng/µl)	1 µl
Σ	25 µl

Tab 2.2.2.5.1.8: PCR Protokoll für Genotypisierung von Trk-B-defizienten Mäusen

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklenzahl
1. Denaturieren	94 °C	7 min	1
2. Hybridisieren	60 °C	35 sec	1
3. Elongation	72 °C	2 min	1
4. Denaturieren	94 °C	20 sec	35
5. Hybridisieren	60 °C	35 sec	
6. Elongation	72 °C	2 min	
Größe PCR Fragment		+/+ 900 bp, -/- 1000 bp	

+/+ = Wildtyp-Bande, -/- = K.O. Bande

Tab 2.2.2.5.1.9: Einfacher Ansatz mit AmpliTaq DNA Polymerase Kit für IL-10-defiziente Mäuse

Zusätze	Volumen
Puffer Master Mix (10x)	2,5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	1,5 µl
dNTPS (10 mM je NTP)	1,5 µl
Primer A (20 µM)	0,5 µl
Primer B (20 µM)	0,75 µl
Primer C (20 µM)	1 µl
Clontech Polymerase (5 U/µl)	0,1 µl
H ₂ O	10,75 µl
DNA	1 µl
Σ	25 µl

Tab 2.2.2.5.1.10: PCR Protokoll für Genotypisierung von IL-10-defizienten Mäusen

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklenzahl
1. Denaturieren	94 °C	3 min	1
2. Denaturieren	94 °C	30 sec	35
3. Hybridisieren	65 °C	1 min	
4. Elongation	72 °C	1 min	1
5. Finale Elongation	72 °C	2 min	
6. Kühlung	4 °C	unendlich	
Größe PCR Fragment		+/+ 200 bp, -/- 450 bp	

+/+ = Wildtyp-Bande, -/- = K.O. Bande

2.2.2.5.2 PCR zum Nachweis von β -Aktin und IL-4-Rezeptor

Für eine PCR nach Transkription der RNA in cDNA wurde 1 μ l unverdünnte (100 ng/ μ l) cDNA-Lösung eingesetzt.

Tab. 2.2.2.5.2.1: Einfacher Ansatz mit AmpliTaq DNA Polymerase Kit für β -Aktin und IL-4-Rezeptor-PCR

Zusätze	Volumen
Puffer Master Mix (10x)	2,5 μ l
MgCl ₂ (25 mM)	1,5 μ l
dNTPS (10 mM je NTP)	1 μ l
Primer A (10 μ M)	0,5 μ l
Primer B (10 μ M)	0,5 μ l
Taq Polymerase (5 U/ μ l)	0,1 μ l
H ₂ O	17,9 μ l
cDNA (100 ng/ μ l)	1 μ l
Σ	25 μ l

Tab. 2.2.2.5.2.2: PCR-Programm für β -Aktin

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklenzahl
1. Denaturieren	95°C	5 min	1
2. Denaturieren	95°C	40 sec	35
3. Hybridisieren	67°C	40 sec	
4. Elongation	72°C	40 sec	
5. Finale Elongation	72°C	10 min	1
6. Kühlung	4°C	unendlich	
Größe PCR Fragment			519 bp

Tab. 2.2.2.5.2.3: PCR-Programm für IL-4-Rezeptor

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklenzahl
1. Denaturieren	95°C	5 min	1
2. Denaturieren	95°C	40 sec	35
3. Hybridisieren	58°C	40 sec	
4. Elongation	72°C	60 sec	
5. Finale Elongation	72°C	10 min	1
6. Kühlung	4°C	unendlich	
Größe PCR Fragment			657 bp

2.2.2.6 Native Agarose-Gelelektrophorese

Ein Verfahren zur Auftrennung von DNA- und RNA-Molekülen in einem elektrischen Feld ist die Agarose-Gelelektrophorese. Die Agarose dient dabei als Matrix, in dem DNA/RNA-Moleküle in einem elektrischen Feld, aufgrund der negativ geladenen Phosphatgruppen, zur Anode wandern. Die Wanderungsgeschwindigkeit wird durch verschiedene Faktoren wie Molekülgröße, Konformation der DNA, Agarosekonzentration und angelegte Gleichspannung beeinflusst. Lineare,

doppelsträngige DNA-Fragmente bewegen sich im Agarosegel indirekt proportional zum dekadischen Logarithmus ihres Molekulargewichts.

Zum Auftragen der DNA/RNA-Proben auf das Agarosegel wird diese mit einem glycerinhaltigem Probenpuffer (6 x DNA-Probenpuffer) versetzt. Die erhöhte Dichte der Probenlösung führt zum Absinken in die Taschen des Agarosegels. Die Größe der zu analysierenden DNA-Fragmente und der RNA-Untereinheiten wird durch einen parallel aufgetragenen DNA-Größenstandard bestimmt. Durch den Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid (Endkonzentration 0,5 µg/ml), der in die Nukleinsäuren interkaliert, wird die DNA/RNA unter UV-Licht sichtbar gemacht. Als Laufpuffer dient TBE-Puffer.

Das Resultat der Auftrennung wird mittels UV-Durchlicht ausgewertet und mit einem Gel Imaging Systems digital dokumentiert

2.2.2.7 Real-Time PCR

Bei der Taqman Real-Time PCR handelt es sich um eine hoch sensitive, reproduzierbare und spezifische Methode zur Quantifizierung von mRNA. Der Vorteil gegenüber einer konventionellen PCR besteht darin, dass die Auswertung der PCR direkt im Anschluss möglich ist und keine weiteren Arbeitsschritte erfordert. Neben dem spezifischen Primerpaar für das nachzuweisende Gen, wird zusätzlich noch eine sequenzspezifische Oligonukleotid-Sonde verwendet, die zwischen den beiden Primern lokalisiert ist. Die Sonde ist am 5'-Ende mit dem fluoreszierenden Reporter-Farbstoff (6-Carboxyfluorescein, FAM) und am 3'-Ende mit dem Quencher-Farbstoff (6-Carboxy-tetramethyl-rhodamin, TAMRA) markiert. Solange die Sonde intakt an die komplementäre DNA gebunden ist, wird die Fluoreszenz des Reporter-Farbstoffes durch die räumliche Nähe zum Quencher unterdrückt. Kommt es während der Elongationsphase der PCR zu einem Zusammentreffen der Taq-Polymerase und der Sonde, so wird die Sonde aufgrund der 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Polymerase hydrolysiert. Daraus resultiert der Bruch der Sonde und eine räumliche Trennung von Reporter-Farbstoff und Quencher. Die Unterdrückung der Fluoreszenzanregung durch den Quencher wird somit aufgehoben. Die Fluoreszenz nimmt anschließend direkt proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu. Am Ende eines Laufs (der aus mehreren Zyklen besteht) wird anhand der erhaltenen Fluoreszenzsignale die Quantifizierung in der exponentiellen Phase der PCR vorgenommen. Nur in der exponentiellen Phase der PCR (die wenige Zyklen in einem Lauf dauert) ist die

korrekte Quantifizierung möglich, da während dieser Phase die optimalen Reaktionsbedingungen herrschen. Der Beginn dieses optimalen Bereichs wird Threshold-Cycle (C_T -Wert) genannt. Der Fluoreszenzanstieg wird für jeden einzelnen Zyklus im geschlossenen Reaktionsgefäß mit Hilfe des Applied-Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System gemessen.

Die Primer und Sonden für Trk-A, Trk-B, Trk-C und p75 sind von Applied-Biosystems kommerziell erstanden. Dabei ist das Verhältnis zwischen Primern und Sonde eingestellt und von Applied-Biosystems getestet. Die Sequenzen für Primer und Sonden sind nicht veröffentlicht. Primer und Sonde für β -Aktin PCR sind von Frau Dr. Christine Brandt im Institut für Zell- und Neurobiologie in Berlin mit Hilfe der primer Express Software ermittelt. Die Etablierung des Primerpaares, die Primertitration und die Effizienzbestimmung mittels Standardkurvengenerierung wurden ebenfalls von Frau Dr. Christine Brandt nach Vorschrift der SOP durchgeführt.

Tab. 2.2.2.7.1: Real-Time (TaqMan) PCR-Ansatz für Trk-A, Trk-B, Trk-C und p75 (Primer und Sonde von Applied Biosystems als fertige Mixtur erstanden).

Substanz	Volumen
Master Mix	10 μ l
H ₂ O	8 μ l
Primer+Sonden Mix	1 μ l
cDNA	1 μ l
Σ	20 μ l

Tab. 2.2.2.7.2: Real-Time (TaqMan) PCR-Ansatz für β -Aktin

Substanz	Volumen
Master Mix	10 μ l
H ₂ O	3,4 μ l
Primer Mix	4,8 μ l
Sonde	0,8 μ l
cDNA	1 μ l
Σ	20 μ l

Tab 2.2.2.7.3: PCR Protokoll für alle Real-Time (TaqMan) PCR-Ansätze mit dem Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklenzahl
1. Enzym Aktivierung	95 °C	20 sec	1
2. Schmelzen	95 °C	3 sec	
3. Abkühlen/ Elongation	60 °C	60 sec	40

2.2.2.7.1 Relative Quantifizierung

Bei der Taqman Real-Time PCR wird der Threshold-Cycle (C_T) ermittelt, der eine Aussage darüber trifft, bei welchem Zyklus das erste Mal ein statistisch signifikanter Anstieg der Reporter-Fluoreszenz messbar ist. Dabei steht die Anzahl der gesuchten mRNA im Verhältnis zum C_T -Wert. Je mehr mRNA in der Probe, desto geringer ist der C_T -Wert. Um eine relative Quantifizierung der Expressionshöhe eines bestimmten Gens in der Probe durchzuführen, muss es mit einem nicht-regulierten Gen („House-Keeping-Gene“) in derselben Probe verglichen werden. Damit ist auch ein Vergleich zwischen unterschiedlich behandelten Proben möglich.

Der ΔC_T -Wert wird nach folgender Formel berechnet:

$$\Delta C_T = \text{Mittelwert CT (Zielgen)} - \text{Mittelwert CT („House-Keepin-Gene“)}$$

Das dimensionslose Ergebnis wird folgendermaßen dargestellt [250]:

1. Ergebnis= $2^{-\Delta C_T}$ für eine relative Quantifizierung in Log-Darstellung normalisiert auf ein nicht reguliertes Gen
2. Ergebnis= $2^{-\Delta\Delta C_T}$ für eine relative Quantifizierung in der Darstellung einer Hoch- oder Runterregulation des Gens wird nach der Normalisierung zusätzlich auf eine unbehandelte Kontrolle bezogen.

Für die Experimente wird eine relative Quantifizierung durchgeführt. Eine wichtige Voraussetzung dieser Auswertmethode ist, dass die verwendeten Primer und Sonden eine gleiche Effizienz der Amplifikation haben. Im Idealfall hat die Effizienz den Wert 1. Unter dieser Bedingung kann von einer Verdopplung der Kopienzahl je Zyklus ausgegangen werden.

2.2.3 Proteinchemie

2.2.3.1 Protein-Assay

Für die Analyse der Phosphorylierung von Trk-B und -C sowie der Akt und MAP-Kinase wird eine Protein-Assay von Knüsel 1994 [93] modifiziert. Der Assay ermöglicht die Bestimmung geeigneter Konzentrationen der blockierenden Substanzen für Trk (K252a), Akt-Kinase (LY294002) und MAP-Kinase (U10126). Für jede verwendete Probe werden 3 Balb/C Mäuse dekapitiert und das Gehirn sofort in eiskaltes PBS gelegt. Alle verwendeten Mäuse sind 3 Tage alt. Unter einem

Binokular werden die Entorhinal-Hippocampale-Formationen aller Tiere in eiskalten PBS präpariert. Um die überschüssige Flüssigkeit zu reduzieren, wird das Gewebe kurz auf Zellstoff abgetrocknet und sofort danach mit dem McIlwain-TC752 Gewebeschnaider (Helmut Saur Laborbedarf, Deutschland) zerkleinert. Dabei wird das Gewebe dreimal mit einer Einstellung von 250 μm geschnitten und nach jedem Durchgang um 90° gedreht, so dass am Ende kleine Gewebestücke entstehen. Das Entorhinal-hippocampale Gewebe wird dann in 50 ml Krebs-Puffer überführt und aufrecht für 15 min in ein Wasserbad mit 37°C gestellt. Der für das Experiment verwendete Krebs-Puffer wird frisch angesetzt, sterilfiltriert und mindestens 3 h vor Verwendung in einem offenen Gefäß bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach der Inkubation des Gewebes von 15 min bei 37°C wird der Überstand vorsichtig dekantiert und das Sediment noch viermal mit 50 ml Krebs-Puffer gewaschen (15 min, 37°C). Nach dem letzten Waschschrift wird für jede vorgesehene Probe 1 ml Krebs-Puffer hinzugefügt und das Gewebe vorsichtig resuspendiert. Zunächst mit einer Plastikpipette und anschließend mit einer abgeschnittenen 1 ml Eppendorf-Spitze. Es werden Aliquots von 1 ml in einem Heizblock bei 37°C für 10 min inkubiert. Danach wird der Überstand vollständig abgenommen und jeweils 1 ml Krebs-Puffer hinzugefügt. In Experimenten mit blockierenden Substanzen werden diese in den Krebs-Puffer verdünnt, bzw. die entsprechende Menge an DMSO hinzugefügt. Es folgt eine Inkubation für 10 min. Anschließend wird der Überstand erneut vollständig abgenommen und jede Probe mit Krebs-Puffer/5 % NHS auf 500 μl aufgefüllt. Die Neurotrophen Faktoren werden in die vorgesehene Probe gemischt (Endkonzentration von 200 ng/ml) und die Proben für 10 min bei 37°C und 5 % CO₂ offen inkubiert. Danach werden die Proben sofort für 2 min auf Eis gestellt, bevor sie zentrifugiert werden (16000 g, 10 sec, 4°C). Der Überstand wird vollständig abgenommen und das Sediment in 200 μl Lysepuffer resuspendiert, bevor die Proben auf Eis mit Ultraschall behandelt werden. Die Proben bleiben dann für 20 min auf Eis stehen, bevor sie zentrifugiert (16000 g, 10 min, 4°C) werden. Der Überstand wird vollständig abgenommen und jeweils eine Probe für die Proteinbestimmung mit dem BCA-Test verwendet. Der Rest wird bis zum Einsatz im Western-Blot bei -20°C eingefroren.

2.2.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration über BCA-Test

Proteine bilden mit Cu^{2+} -Ionen in alkalischer Lösung einen Komplex (Biuret-Reaktion). Die Cu^{2+} -Ionen des Komplexes werden zu Cu^+ -Ionen reduziert, die mit Bicinchoninsäure (BCA) einen violetten Komplex bilden. Die Intensität der Verfärbung kann dazu benutzt werden, die Proteinkonzentration zu bestimmen. Dazu wird die Reaktion mit Lösungen bekannter Proteinkonzentration durchgeführt und die Extinktion bei 562 nm gemessen. Nachdem aus den Messergebnissen der Proteinlösungen eine Gerade erstellt wurde, kann man die Proteinkonzentration der Probe ablesen, sofern der Bereich der Konzentration mit abgedeckt wurde. Um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, sollte das Protein angegeben werden, das zur Herstellung der Eichgeraden benutzt wurde. Für alle BCA-Tests wird in der Arbeit das BCA Protein Assay Reagent Kit (Pierce, Rockford IL, USA) benutzt, in dem BSA als Standard verwendet wird.

2.2.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Bei der Polyacrylamid-Gelelektrophorese wird als Trennmatrix eine Mischung aus Acrylamid und Bisacrylamid gewählt, die sich unter geeigneten Bedingungen polymerisieren lässt. Die Polymerisation wird durch den Radikalstarter Ammoniumpersulfat (APS) initiiert und durch N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) katalysiert, wobei die Porengröße der Matrix durch die Konzentration des Acrylamids bestimmt wird. Bisacrylamid wird für die Quervernetzung benötigt. Durch Zusatz eines amphiphilen Detergenz wie Natriumdodecylsulfat (SDS) wird eine Entfaltung der Proteine erreicht, wobei an drei Aminosäure-Reste je ein SDS-Molekül bindet. Dadurch erhält man das Protein in einer ausgestreckten Form, das durch die gebundenen SDS-Moleküle eine starke negative Ladung trägt. Die Ladung der Aminosäureseitenketten ist jetzt unbedeutend für die Wanderung im elektrischen Feld. Durch die Zugabe von 2-Mercaptoethanol zum Probenpuffer werden vorhandene Disulfidbrücken im Protein aufgelöst und eine weitere Entfaltung des Proteins ermöglicht. Durch die starken negativen Ladungen wandern alle Proteine bei der angelegten Gleichspannung zur Anode, wobei die Wandergeschwindigkeit nur von der Größe der untersuchten Proteine und der Porengröße der Matrix abhängt.

Bei der diskontinuierlichen SDS-Page werden die Proben zunächst auf ein Sammelgel aufgetragen (pH 6,8), an der Grenzschicht zwischen Sammelgel und Trenngel (pH 8,8) konzentriert und dann als scharfe Bande im Trenngel aufgetrennt. Die Firma Biorad bietet eine Apparatur, in der die SDS-Polyacrylamid Gele gegossen werden. Die Acrylamidlösung wird zwischen zwei Platten gegossen, die durch dünne Trennstifte getrennt werden. Das Sammelgel hatte eine Konzentration von 4 % Acrylamid, das Trenngel eine Konzentration von 10 %. Es werden jeweils 20 µg Protein je Probe zusammen mit dem Probenpuffer gemischt und bei 95 °C für 5 min aufgeköcht, bevor die Probe auf das Gel aufgetragen wird. Um später die Proteinbanden besser identifizieren zu können, wird ein Protein-Größenstandard mitgeführt.

2.2.3.4 Western-Blot

Hierbei werden die durch eine Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine mittels Elektrotransfers auf eine PVDF überführt. Dieser Transfer wird in dem Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell® der Firma Biorad durchgeführt. Dazu werden der Anoden I und II-Puffer, ein Kathoden-Puffer, eine PVDF-Membran, Methanol und 2 Lagen Blotpapier benötigt. Das SDS-Polyacrylamid Gel wird nach Beendigung der Elektrophorese für 15 min in dem Kathoden-Puffer äquilibriert. Die erste Lage Blotpapier wird in Anoden I-Puffer und die zweite Lage Blotpapier in Kathoden-Puffer äquilibriert. Die PVDF-Membran wird für 15 sec. in Methanol getaucht und dann für 2 min in Aqua dest. gewaschen, bevor sie 5 min in Anoden II-Puffer äquilibriert wird.

Der Blot wird wie folgt luftblasenfrei aufgebaut:

- Anode
- Blotpapier (Anoden I-Puffer)
- PVDF-Membran (Anoden II-Puffer)
- SDS-Polyacrylamid Gel (Kathoden-Puffer)
- Blotpapier (Kathoden-Puffer)
- Kathode

Bei dem verwendeten Gerät wurde 60 min bei 15 V und 0,1-0,4 A geblottet.

2.2.3.5 Immuno-Blot

Dabei handelt es sich um den Nachweis von Proteinen, die auf eine Membran aufgebracht und nach dem Blockieren freier Bindungsstellen, mittels eines spezifischen Antikörpers markiert werden. Die Detektion erfolgt mittels eines Zweitantikörpers, der spezifisch den Erstantikörper erkennt und an dem meist ein Enzym gekoppelt ist. Während der Arbeit werden für Immuno-Blots ausschließlich Zweitantikörper mit einer gekoppelten Meerrettichperoxidase (HRP) benutzt. Die anschließende Detektion, des durch zwei Antikörper markierten Proteins wird durch die Enhanced-Chemilumineszenz (ECL)-Reaktion durchgeführt, wobei schwache Lichtsignale entstehen, die den aufgelegten Röntgenfilm an der Position des Proteins schwärzen.

2.2.3.5.1 Immunologischer Nachweis

Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen auf der PVDF-Membran wird diese über Nacht bei 4 °C oder für 1 h bei Raumtemperatur in einer 5 %igen Milchpulverlösung in TBS inkubiert. Dies ist notwendig, damit das Hintergrundsignal so schwach wie möglich ausfällt. Nach Zugabe des in Blocklösung verdünnten Erstantikörpers, wird der Blot bei Raumtemperatur für 1 h auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend wird die Antikörperlösung abgenommen und bis zur Wiederverwendung bei 4°C gelagert. Reste von ungebundenem Erstantikörper werden durch wiederholtes Waschen mit 0,05 % Tween-20 in TBS (3x 5 min.) entfernt. Anschließend wird der Blot 1 h mit dem Zweitantikörper in Blocklösung bei Raumtemperatur inkubiert. Der Zweitantikörper erkennt den Fc-Teil der Erstantikörper und ist an eine Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelt. Nach erneutem Waschen mit 0,05 % Tween-20 in TBS (3x 5 min) und 1 mal 5 min mit TBS wird der Blot mit der ECL-Lösung für eine Minute im Dunkeln inkubiert. Mit Hilfe der ECL-Lösung wird eine Chemilumineszenz-Reaktion (Oxidation des Luminols aus der Lösung durch die Peroxidase) ausgelöst, deren Lichtsignale durch Auflegen eines Röntgenfilms sichtbar gemacht werden können.

Tab. Übersicht der verwendeten Erst und Zweitantikörper und ihrer Verdünnung

Name	1.oder 2 Antikörper	Spezies	Verdünnung	verdünnt in
phospho-Trk-A	1. Antikörper	Kaninchen	1:250	5 % Milchpulver in TBS
phospho-Akt-Kinase		Maus	1:500	5 % BSA in TBS
phospho-MAP-Kinase		Maus	1:250	5 % BSA in TBS
Trk-B		Ziege	1:500	5 % Milchpulver in TBS
Trk-C		Ziege	1:500	5 % Milchpulver in TBS
Akt-Kinase		Kaninchen	1:250	5 % Milchpulver in TBS
MAP-Kinas		Kaninchen	1:250	5 % Milchpulver in TBS
anti-Maus IgG HRP gekoppelt	2. Antikörper	Kaninchen	1:5000	5 % Milchpulver in TBS
anti-Kaninchen IgG HRP gekoppelt		Ziege	1:5000	5 % Milchpulver in TBS
anti-Ziege IgG HRP gekoppelt		Kaninchen	1:5000	5 % Milchpulver in TBS

2.2.3.6 Beseitigen von Antikörper-Antigen Bindungen im Immuno-Blot

Damit eine PVDF-Membran mehrfach einem Immuno-Blot bezüglich unterschiedlicher Proteine unterzogen werden kann, müssen zunächst die alten Erst- und Zweitantikörper entfernt werden (Strippen). Dazu wird die Membran für 30 min und 60°C in einem „Stripp-Puffer“ inkubiert, danach mit 0,05 % Tween-20 in TBS (3x 15 min) gewaschen, bevor sie erneut mit 5 % Milchpulver in TBS (60 min, RT) geblockt wird. Anschließend wird der Immuno-Blot mit den neuen Antikörpern durchgeführt.

2.2.3.7 ELISA

Bei dem Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) handelt es sich um ein immunologisches Nachweisverfahren, das auf einer Antikörper-Antigen-Bindung und einer enzymatischen Farbreaktion beruht. Eine ELISA-Technik wird Sandwich-ELISA genannt, da dabei zwei Antikörper verwendet werden, die spezifisch dasselbe Antigen binden, jedoch an unterschiedlichen Stellen. Der erste Antikörper (Capture-Antikörper) wird an eine spezielle 96 Well-Mikrotiterplatte gebunden und unspezifische Bindungsstellen werden blockiert. Danach werden die Proben mit den enthaltenen Antigenen in die Wells gegeben und für eine gewisse Zeit inkubiert. Um später die Konzentration des zu messenden Antigens in den Proben bestimmen zu können, wird eine Verdünnungsreihe des gesuchten Antigens mit aufgetragen. Die

Proben werden dann zusammen mit nicht gebundenem Antigen beim Waschen entfernt und der zweite Antikörper (Detection-Antikörper) verwendet. Der Zweitantikörper ist mit einem Enzym gekoppelt, meist Meerrettichperoxidase (HRP), das ein Substrat zu einem Reaktionsprodukt umsetzt. Dieser Prozess wird meist durch einen Farbumschlag sichtbar. Die Menge umgesetzten Substrats, sprich Intensität des Farbumschlags, ist proportional zur Antigenkonzentration. Die Farbtintensität wird über die optische Extinktion in einem ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen und mit der Extinktion bei 570 nm korrigiert. Mit Hilfe der Verdünnungsreihe und einer Negativkontrolle, kann eine Kalibrierungskurve (Eichkurve) erstellt werden und so die Menge an Antigen in der Probe interpoliert werden. In der Arbeit wurden die Zytokine IL-4, IL-10, IL-13, IFN- γ und TGF- β mit handelsüblichen ELISA-Kits gemessen.

2.2.4 *In vivo* Regenerationsmodell

2.2.4.1 der Rückenmarkläsion (RML)

Für alle Experimente werden 8 Wochen alte weibliche Balb/C Mäuse benutzt. Zunächst werden die Tiere mit einem injizierten Ketamin-Rompun-Gemisch anästhesiert (0,1 ml/ 10 g Körpergewicht der Maus). Eine ausreichende Narkose ist durch eine flache Atmung und einen schwachen Muskeltonus gekennzeichnet. Nachdem der Rücken und der Kopf rasiert sind, wird die Maus flach auf den Bauch gelegt (siehe Abbildung 2.2.4.1.1_A). Der gesamte Eingriff wird mit Hilfe eines Binokulars durchgeführt. Nachdem die Rückenhaut mit einem medialen Schnitt von kaudal nach rostral eröffnet ist, wird der Fettkörper, der sich auf der Höhe des Nackens befindet, mit einem Schnitt von der Rückenmuskulatur getrennt (siehe Abbildung 2.2.4.1.1_B). Danach kann der Fettkörper so angehoben werden, dass die Sicht auf ein Blutgefäß ermöglicht wird. Diese Gefäß verläuft von ventral nach dorsal, bis es zwischen Th4 und Th5 zwischen den Processus spinosi (Dornfortsatz) verschwindet. Diese Stelle wird als Ausgangspunkt für die Lokalisation von Th8 genommen. Mit der Scherenspitze kann von Th4 bis Th8 in kaudaler Richtung abgezählt werden (siehe Abbildung 2.2.4.1.1_C). Mit der Schere wird die an den Wirbel anhaftende Muskulatur entfernt. Der Dornfortsatz von Th8 wird dann mit einer Pinzette gegriffen, und ein leichter Zug nach oben ermöglichte es, einen Schnitt zwischen Th8 und Th9 zu machen. Danach kann der Dornfortsatz noch weiter nach oben gezogen werden und das Rückenmark mit einer median-posterior verlaufenden Arterie wird sichtbar.

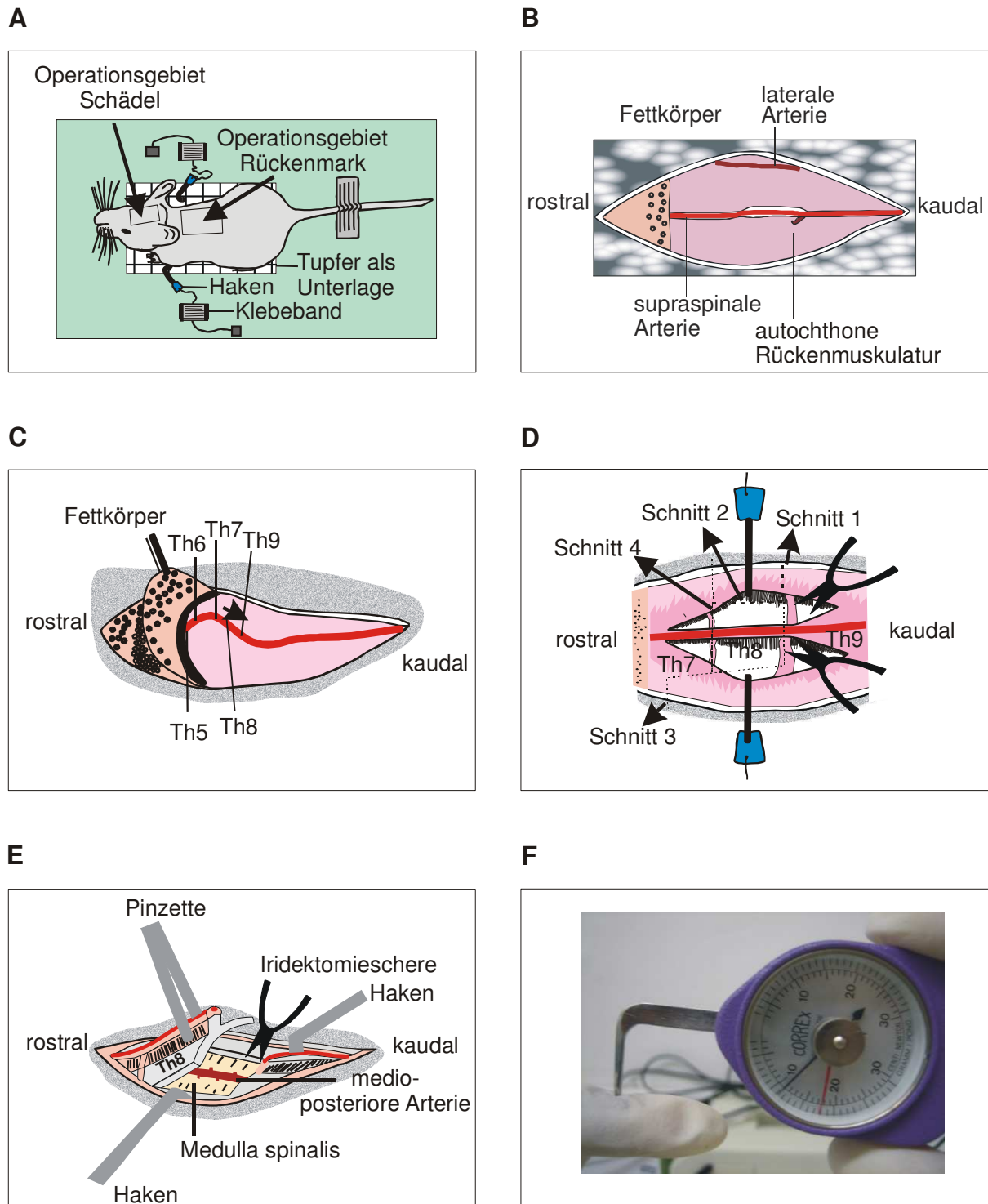


Abb: 2.2.4.1.1 Schematische Darstellung der Durchführung einer Rückenmarksläsion (nach Lars Uhlmann 2006, Institut für Zell und Neurobiologie)

A) Vorbereitung der Maus vor einer Rückenmarksläsion: Die narkotisierte Maus wird auf den Bauch gelegt und am Kopf und Rücken rasiert. Die Haken auf beiden Seiten helfen später, die Haut und Muskulatur von den Wirbeln fernzuhalten.

B) Dorsale Ansicht nach Eröffnung der Rückenhaut: Mit der Schere wird ein Schnitt von rostral nach kaudal durchgeführt. Eine Arterie wird sichtbar, die unter dem Fettkörper im Nacken der Maus verschwindet.

C) Lokalisation von Th8 anhand der Arterie: Die Arterie verläuft ventral nach dorsal und verschwindet unter dem Fettkörper auf Höhe von Th4 und Th5, zwischen den Processus spinosus

D) Schematische Darstellung der 4 Schnitte für die Laminektomie: Sobald der Th8 identifiziert ist, werden 4 Schnitte durchgeführt. Der erste zwischen Th8 und Th9. Der zweite und dritte lateral am Th8 Wirbel und der vierte zwischen Th8 und Th7.

E) Schematische Darstellung der Laminektomie: Nach den 4 Schnitten kann die obere Hälfte des Th8 Wirbels mit einer Pinzette abgehoben werden. Darunter wird die Medulla spinalis sichtbar, zusammen mit einer medial verlaufenden Arterie. Kleinere Knochenstücke werden mit einem Mini-Rongeur beseitigt.

F) Foto des Newtonmeter für die Kompression: Direkt auf die Mitte der medulla spinalis wird mit einem umgebauten Newtonmeter ein gleichmäßiger Druck von 10cN für 3 sec. ausgeübt. Nach der Kompression wird ein Hämatom sichtbar, welches mit 2 Stichinzisionen entlastet wird. In die linke Seite der Medulla spinalis werden die T-Zellen injiziert bzw. die Membran mit den Plasmozytomzellen direkt auf den geöffneten Wirbel gelegt.

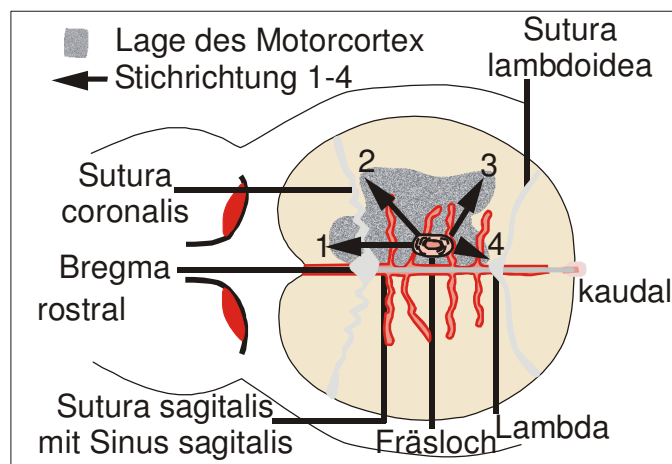
Um die obere Seite des Th8-Wirbels mit dem Dornfortsatz vollständig entfernen zu können, werden drei weitere Schnitte durchgeführt (siehe Abbildung 2.2.4.1.1_D). Die ersten beiden lateral zum Rückenmark und der dritte zwischen Th7 und Th8. Danach kann die Oberseite des Wirbels mit der Pinzette abgehoben werden und das Rückenmark ist auf der gesamten Fläche des Th8 sichtbar (siehe Abbildung 2.2.4.1.1_E). Mit einem Mini-Rongeur wird der Knochen lateral etwas mehr entfernt, so dass das Rückenmark von oben uneingeschränkt sichtbar ist. Die Läsion (Kompression) wird mit einem umgebauten Newtonmeter durchgeführt, indem ein gleichmäßiger Druck von 10 cN für 3 sec auf die Mitte des frei liegenden Rückenmarks ausgeübt wird (siehe Abbildung 2.2.4.1.1_F). An der Stelle der Kompression bildet sich sofort danach ein Hämatom aus. Zur Entlastung und zur Verringerung eines sekundären Schadens durch das Hämatom wird von beiden Seiten eine Stichinzision mit einer Kanüle durchgeführt.

Für die T-Zell Experimente wird den Kontrolltieren 1 µl PBS mit einer modifizierten Hamiltonpipette in die linke Stichinzision gespritzt und den Testtieren 1 µl einer Th1- bzw. Th2-Zellsuspension (1×10^5 Zellen/ µl PBS). Die J558-Plasmozytomzellen würden bei einer Injektion in das Gewebe nach wenigen Tagen zu bösartigen Tumoren herangewachsen. Deshalb wurden für diese Experimente kleine Taschen angefertigt, in die die Zellen gegeben wurden. Die Taschen bestehen aus einer permeablen Membran mit einer Porengröße von 0,22 µm. Jeweils zwei Membranen werden zusammengeschmolzen, so dass eine Tasche von ca. 3 mm Durchmesser entsteht, die eine Öffnung hat. In diese Öffnung werden ca. 1×10^5 Wildtyp-J558 und

IL4-J558-Zellen gespritzt bzw. PBS als Kontrolle und danach die Tasche mit Histoacrylkleber versiegelt. Die Taschen werden in die Öffnung des laminektomierten Th8 Wirbels, direkt über die Kompression des Rückenmarks gelegt. Anschließend werden die Muskeln seitlich des Th8 Wirbels zusammengenäht, so dass keine Öffnung mehr zu sehen ist. Die Haut wird mit Klammern verschlossen.

Im nächsten Schritt werden die Ursprungszellen des CST mit einem Biotin-Komplex markiert. Die Zellkörper des CST sind im Motorkortex lokalisiert. Nachdem die Kopfhaut aufgeschnitten ist, kann man sich anhand der Schädelnähte orientieren und mit einem Minibohrer ein Loch in die Schädeldecke fräsen (siehe Abbildung 2.2.4.1.2_A).

A



B

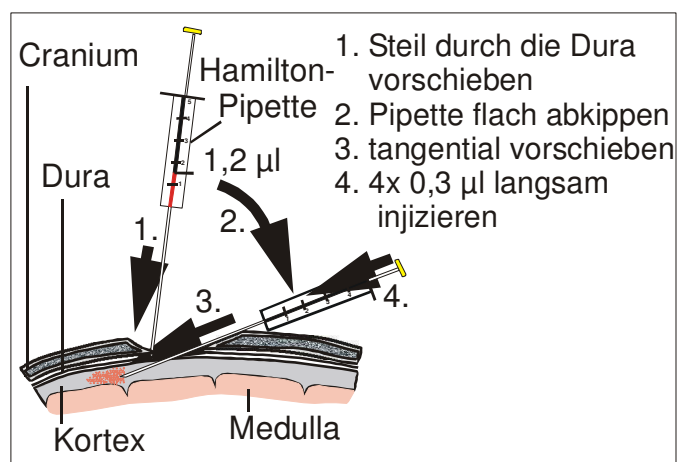


Abb: 2.2.4.1.2 Schematische Darstellung der Markierung des CST mit BDA (nach Lars Uhlmann 2006, Institut für Zell und Neurobiologie)

A) Lokalisation des Motor Kortex aufgrund der Schädelanatomie: Mit Hilfe der Schädelnähte und Blutgefäße kann man sich orientieren und die Stelle für den Motorkortex identifizieren. Auf der rechten Seite wird mit einem Minibohrer ein Loch an der entsprechenden Stelle gefräst. Das BDA wird mit einer Hamilton-Pipette in 4 Richtungen verteilt.

B) Schematische Darstellung der Handhabung zum Injizieren des Tracers BDA in den Motorkortex: Zuerst wird die Hamilton-Pipette steil eingestochen und danach sofort abgeflacht. Dadurch wird ein zu tiefes Eindringen in das Gehirn vermieden und der Tracer kann in die Umgebung der CST-Neurone injiziert werden, die sich im Motorkortex befinden.

Aufgrund der Anatomie des CSTs werden lediglich die Zellen in der rechten Seite des Motorkortex markiert. Die Axone der Zellen auf der rechten Seite kreuzen später fast vollständig auf die linke Seite im Rückenmark und verlaufen direkt im Bereich der injizierten T-Zellen. Um die Experimente zu standardisieren, werden die Mäuse in den Plasmoytomzell-Experimenten ebenfalls auf der rechten Seite mit dem Biotin-Komplex versorgt. 1,2 µl einer 10 %igen biotinierten-Dextran-Amin (BDA)-Lösung wird in den Motorkortex mit einer Hamiltonspritze injiziert. Das Gesamtvolumen wird in vier Portionen aufgeteilt, die in unterschiedliche Richtungen injiziert werden (siehe Abbildung 2.2.4.1.2_B). Das BDA wird von den Zellen aufgenommen und anterograd transportiert. Die Haut wird nach der Injektion des BDA mit Klammern verschlossen. Alle Tiere werden nach der Operation mit einem Analgetikum (Rimadyl: 100 µg/g Körpergewicht) und einer 30 %ige Glucoselösung versorgt und bei 35 °C gehalten, um eine Hypothermie zu vermeiden. Die Hypothermie stellt für 48h das größte postoperative Mortalitätsrisiko dar. Bei Bedarf werden die Mäuse an den folgenden Tagen mit Analgetikum und Glucoselösung versorgt.

Nach 14 Tagen werden die Mäuse mit einem lethalen Ketamin-Rompun-Gemisch anästhesiert (0,4 ml/ 10 g Körpergewicht der Maus). Nachdem die Anästhesie soweit vorangeschritten ist, dass der Patellasehnenreflex nicht mehr auszulösen ist, wird das Blutgefäß-System der Tiere mittels transkardialer Perfusion mit Ringerlösung gespült. Anschließend wird die Ringerlösung durch 4 % PFA/5 % Succrose in 0,1 M Phosphat-Puffer ausgetauscht und somit das Gewebe fixiert. Das Rückenmark wird entnommen und in Perfusionslösung über Nacht bei 4°C nachfixiert. Danach wird das Rückenmark zur Vermeidung von Gefrierartefakten für 24 h in einer 30 %ige Succroselösung bei 4°C gelagert und anschließend in TissueTek mittels auf -40 bis -

45 °C abgekühltem 2-Butylmethan eingefroren. Die Rückenmäcker werden bei -20 °C gelagert.

Von jedem Rückenmark werden Kryoschnitte mit einem Kryostaten angefertigt. Zunächst werden am cranialen Ende 5-6 Querschnitte angefertigt, bevor das gesamte Rückenmark in seiner Längsachse geschnitten wird. Alle Schnitte werden mit Superfrost-Plus-Objektträgern aufgenommen und bis zur Färbung bei -20 °C gelagert.

2.2.4.2 DAB-Entwicklung

Für eine Auswertung der regenerierenden Axone müssen diese zunächst sichtbar gemacht werden. Dazu wird eine Avidin-Biotin-HRP-gekoppelte histochemische Färbung durchgeführt. Avidin ist ein Glycoprotein aus dem Hühnerei und liegt als Tetramer vor. Jede der Untereinheiten ist in der Lage, eine sehr feste Bindung mit Biotin (Vitamin H) einzugehen. Das Biotin wiederum kann leicht mit einem Enzym, wie z. B. HRP gekoppelt werden. Für die Färbung wird ein Komplex aus Avidin und Biotin-HRP zusammen mit den Kryoschnitten des Rückenmarks inkubiert. Dabei bindet das Avidin neben dem Biotin-HRP auch das Biotin, welches im BDA enthalten ist. Das BDA ist wie unter 2.2.4.1 beschrieben, von den Zellkörpern im Motorkortex aufgenommen worden und entlang der Axone des CST transportiert worden. Das Biotin im BDA wird durch den Avidin-Biotin-HRP Komplex markiert. Das Enzym HRP ist in der Lage, DAB zu einem unlöslichen Stoff umzusetzen, der in der Gegenwart von Amonium-Nickel-II-Sulfat eine blau-schwarze Farbe entwickelt.

Die zu färbenden Schnitte werden aufgetaut und für mindestens 2 h bei RT getrocknet. Die Schnitte werden dann zweimal 10 min mit TBS-TX 0,3 % gewaschen, währenddessen wird der ABC-Komplex aus dem Vectastain ABC-Kit (Linaris, Deutschland) in TBS-TX 0,3 % nach Herstellerangaben angesetzt. Der ABC-Komplex wird großzügig auf den Schnitten verteilt und diese bei 4 °C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wird der überschüssige ABC-Komplex mit 0,05 M Tris/HCl pH 8,0 dreimal gewaschen und die Objektträger mit den Schnitte in eine Färbeküvette gestellt. In die Küvette wird 190 ml 0,05 M Tris/HCl pH 8,0 und 0,8 g Amonium-Nickel-II-Sulfat vermischt. Die Schnitte werden für 10 min inkubiert, bevor 0,03 g DAB hinzugefügt werden. Nach weiteren 10 min Inkubation werden 30 µl einer 30 %igen H₂O₂ Lösung hinzugefügt, um die Reaktion zu starten. Sobald die Färbung deutlich sichtbar ist (ca. 8 min), wird die Färbung durch dreimal waschen in 0,05 M

Tris/HCl pH 8,0 beendet. Anschließend werden die Schnitte über Nacht getrocknet und am nächsten Tag mit 100 % Ethanol und Xylene entwässert, bevor sie mit Entellan eingedeckelt und versiegelt werden.

2.2.4.3 Auswertung der Rückenmarkläsion

Nachdem das Rückenmark aller Mäuse in dem jeweiligen Experiment geschnitten und gefärbt ist, wird dieses durch eine Nummern verblindet und die Anzahl der regenerierenden Axone des CST ermittelt. Dazu wird zuerst die Qualität der Axonmarkierung mit BDA und die Qualität der Läsion beurteilt. Diejenigen Proben, die nicht den Qualitätsstandards entsprechen, werden von der weiteren Auswertung ausgeschlossen.

Um zu beurteilen, wie gut die Axone des CST markiert sind, wurde zunächst der Querschnitt jedes einzelnen Rückenmarks unter einem Mikroskop mit Durchlicht und Phasenkontrast analysiert. Folgende Kriterien führen zum Ausschluss aufgrund ungenauer Markierung des CST im Motor Kortex: eine zu geringe Färbung der CST Axone im dorso-medialen Bereich, Anfärbung von Blutgefäßen, angefärbte Axonen, die aufgrund ihrer Lage im Querschnitt nicht zum CST gezählt werden können, angefärbte Axone im gesamten Querschnitt des Rückenmarks.

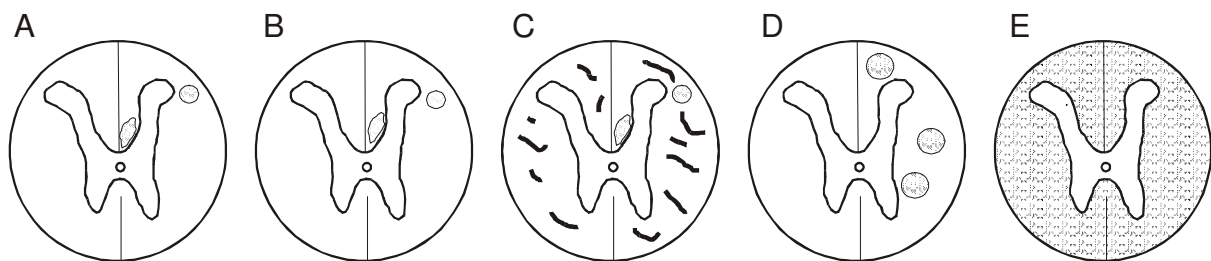


Abb. 2.2.4.3.1 Schematische Darstellung der gefärbten Querschnitte des Rückenmarks und deren Qualitätsmerkmale

A) gut gefärbt, B) zu schwach gefärbt, C) Blutgefäße angefärbt, D) Axone die nicht zum CST gehören angefärbt, E) gesamter Querschnitt angefärbt

Als nächstes wird die Läsion beurteilt. Dabei wird darauf geachtet, dass die Läsion deutlich sichtbar ist und eine ausreichende Tiefe besitzt. Bei einer Läsion, die nur im oberen dorsalen Bereich des Rückenmarks lokalisiert ist, gibt es viele markierte und sichtlich nicht lädierte Axone. Unlädierte Axone sind vor allem dadurch zu erkennen,

dass sie einen sehr geraden Verlauf hatten und über weite Strecken in einer Ebene sichtbar sind. Regenerierende Axone wachsen nicht geradeaus, sondern verlaufen irregulär und oft ektopisch. Ebenso deuten sehr viele stark verzweigte Fasern auf Höhe der Sakralsegmente auf das Vorhandensein von unlädierten Fasern.

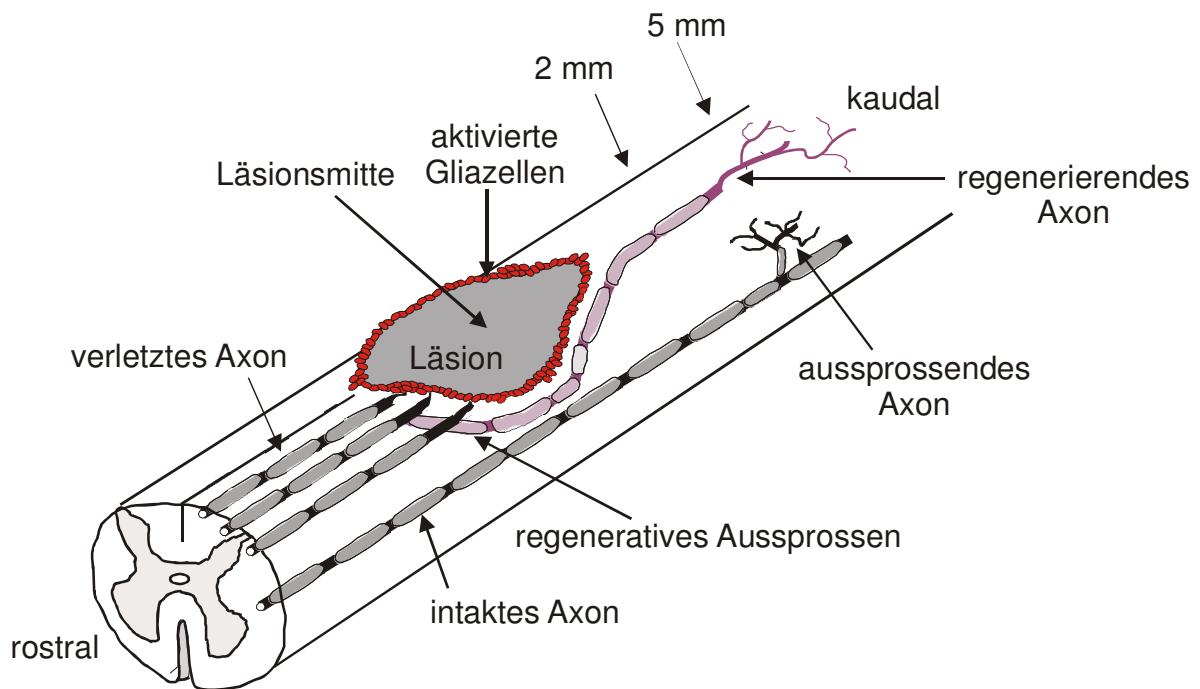


Abb. 2.2.4.3.2 Schematische Darstellung des geschädigten Rückenmarks

In der Läsion (grau) befinden sich aktivierte Gliazellen (rot), die eine Barriere für die wieder auswachsenden Axone darstellt. Nach der Läsion gibt es ungeschädigte Axone die ein reaktives Aussprossen zeigen und geschädigte Axone, die neu auswachsen. In der Läsionsmitte sowie 0,5, 2 und 5 mm kaudal der Läsion werden die regenerierten Axone (lila) gezählt.

Nach der vorherigen Beurteilung aller Rückenmärike, erfolgt die eigentliche Auswertung der verbliebenen Exemplare. Jeder Schnitt eines Rückenmarks wird an einem Phasenkontrast-Mikroskop untersucht. Die Läsionsstelle wird in die Mitte des Blickfeldes eingestellt und alle sichtbaren Axone in der Läsion gezählt. Danach werden 0,5 mm, 2 mm und 5 mm kaudal der Läsion alle Axone im Blickfeld gezählt. Die Abmessungen werden mit Hilfe des Kreuztisches und der Messskala eingestellt. Am Ende wird die Anzahl der gezählten Axone für jedes Rückenmark addiert, jedoch für die Läsionsstelle und die drei ausgewählten kaudalen Punkte getrennt. Die gezählten Axone werden anschließend auf die Anzahl der markierten Axone auf Höhe von Th4 (=100 %) normalisiert. Für jede Gruppe wird der Mittelwert und der

Standardfehler des Mittelwertes berechnet und statistisch auf signifikante Unterschiede analysiert. Für die statistische Analyse wird der Student's t-Test verwendet.

Zusätzlich werden von repräsentativen Rückenmärkern Camara-Lucida-Darstellungen gemacht. Dabei wird pro Tier von jedem einzelnen Schnitt eines Rückenmarks eine Zeichnung erstellt, die am Ende alle zusammengelegt werden. Die Aufnahmen entstanden in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Schnell, Brain Research Institut, Universität Zürich.

2.2.4.4 Injektion von CFSE markierten Th2-Zellen

Um zu untersuchen, wie lange Th2-Zellen nach der Injektion in der Läsion nachzuweisen sind und wohin sie migrieren, werden markierte Zellen verwendet (siehe 2.2.1.1.11). Die RML wurde wie unter 2.2.4.1 beschrieben durchgeführt und jeweils 1×10^5 CFSE markierte Th2-Zellen in 1 μ l PBS injiziert. Abweichend vom Protokoll wird keine Markierung des CST Zellen im Motorkortex mittels BDA durchgeführt. Nach einer Überlebenszeit von 1, 4, 6 und 10 Tagen wird das Rückenmark der jeweiligen Mäusen entnommen, fixiert und am Kryostaten geschnitten. Direkt nach dem Schneiden werden die Schnitte auf Superfrost-Objekträger aufgenommen und mit ImmuMount präserviert. Die Analyse der Schnitte erfolgt mittels Fluoreszenzmikroskop und anschließender Fotodokumentation.

2.2.5 Statistische Analysen

Von allen Ergebnissen wird zunächst für jede Gruppe der Mittelwert gebildet und anschließend die Standardabweichung bzw. der Standardfehler des Mittelwertes berechnet. Die Standardabweichung ist ein um 1860 von Francis Galton eingeführter Begriff der Statistik und der Wahrscheinlichkeitsrechnung und ein Maß für die Streuung der Werte einer Zufallsvariablen um ihren Mittelwert. Der Standardfehler des Mittelwertes liefert eine Aussage über die Güte des ermittelten Mittelwertes. Je mehr Einzelwerte es gibt, desto robuster ist der Mittelwert und desto kleiner der Standardfehler, da Fehler in der Messgenauigkeit ausgeglichen werden.

Die Statistik bezeichnet Methoden um empirische Daten zu analysieren. Dabei wird unter anderen untersucht, ob die Unterschiede zwischen Messgrößen nur durch Zufall entstehen oder provoziert werden können. Im zweiten Fall spricht man von einer Signifikanz, die mittels statistischen Tests ermittelt wird und so eine

Abschätzung der Irrtumswahrscheinlichkeit angibt. Dabei geht man meistens von einer Nullhypothese aus, die besagt, dass es keine Unterschiede zwischen den Gruppen gibt und überprüft nun, ob man die Hypothese annehmen kann oder ablehnen muss. Für die durchgeführten Experimente wurden zwei verschiedene Tests angewendet.

Die statistische Analyse der Kollagen-Kokultur und EGFP-Kokultur Experimente wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Dieser Test gehört zu den parameterfreien oder verteilungsunabhängigen statistischen Test und geht davon aus das die gemessenen Ergebnisse (Stichproben) voneinander unabhängig sind und nicht normalverteilt.

Der Student's t-Test wurde in der statistischen Analyse von Unterschieden in der Anzahl regenerierende Axone nach einer Rückenmarkläsion verwendet. Dieser Test gehört zu den parametrischen Test und geht davon aus, dass die gemessenen Ergebnisse (Stichproben) normalverteilt sind und die Varianz bei unabhängigen Stichproben in beiden Gruppen gleich ausfällt. Die Varianz ist ein Maß um zu beschreiben, wie stark die Messgröße streut.

Beide beschriebenen Tests werden unter Verwendung des Programms SPSS (Version 11) durchgeführt. Das Programm hat für beide Tests automatisch eine Verteilungsanalyse durchgeführt und zusätzlich beim Student's t-Test eine Varianzanalyse der zu vergleichenden Gruppen. Für alle errechneten Signifikanzwerte, die kleiner als 0,05 sind, wird eine statistische Signifikanz angenommen. Das bedeutete, dass mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit die weniger als 5 % beträgt, die Nullhypothese abgelehnt werden kann und sich die beiden Gruppen unterscheiden. Aufgrund der Durchführung der Experimente kann davon ausgegangen werden, dass sich zwischen zu vergleichenden Gruppen jeweils nur ein Faktor unterscheidet.

3. Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der verwendeten Zellen

Für die Arbeit wurden zum einem primäre Zellen (Lymphozyten) als auch eine Zelllinie (Plasmozytomzellen) verwendet. Die Lymphozyten als auch die Plasmozytomzellen wurden in einem Kollagen-Auswachsassay und einem EGFP-Einwachsassay verwendet. Zur Charakterisierung und um die Ergebnisse der verschiedenen Zellen miteinander vergleichen zu können, wurden alle Zellen einer Analyse ihres Zytokinexpressions-Profiles unterzogen.

Um eine optimale Zytokinexpression der Lymphozyten zu erreichen, wurden diese 5 Tage nach ihrer Präparation mit ConA in Gegenwart von APZs restimuliert. Die Aufreinigung einer CD4⁺-Population erfolgte 24h nach der Restimulation mittels MACS-Technologie von Miltenyi, wobei die Separationsqualität regelmäßig durch eine FACS-Analyse kontrolliert wurde. In der Abbildung 3.1 ist gezeigt, dass die Separation eine Zellpopulation hervorbrachte, die zu 94 % aus CD4⁺-Zellen bestand.

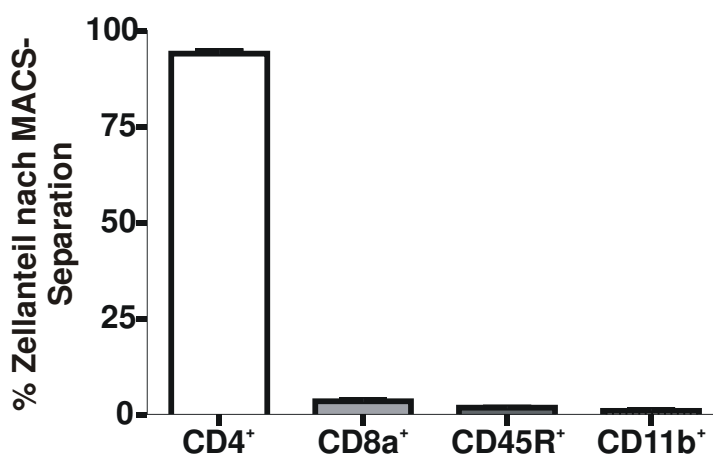


Abb. 3.1: Analyse der Lymphozytenpopulation nach MACS

Die Lymphozyten mit MACS-Beads gekoppelten Antikörpern gegen CD8, CD11b und CD45R inkubiert und über eine MACS-Säule getrennt. Zellen die unmarkiert waren, wurden durch die Säule gewaschen und aufgefangen. Eine erneute Inkubation mit fluoreszierenden Antikörpern gegen CD4, CD8, CD11b und CD45R ermöglichte eine Überprüfung der Separationsqualität mittels FACS-Analyse. Die dargestellten Ergebnisse sind Mittelwerte von 6 unabhängigen Experimenten mit/ohne Standardfehler des Mittelwertes.

Der Rest teilte sich in 3,5 % CD8⁺-, 1,5 % CD45R⁺- und 1% CD11b⁺-Zellen auf. Dieses Ergebnis konnte routinemäßig erzielt werden und entsprach den Angaben der Firma Miltenyi.

Für die Analyse des Zytokinexpressions-Pattern wurden jeweils 4,8x10⁶ CD4⁺-Lymphozyten/Plasmozytomzellen in 1200 µl Medium für 24 h kultiviert und die Menge an produzierten Zytokinen im Überstand mittels ELISA bestimmt.

Tabelle: 3.1 Zytokin Expression von T-Zellen und J558-Zellen im Überstand nach 24 h Kultivierung

Zelltyp\ Zytokine	IL-4 (pg/ml)	IL-10 (pg/ml)	IL-13 (pg/ml)	IFN-γ (pg/ml)	TGF-β (pg/ml)
Th1-Zellen	nd.	127	15	13610	nd.
Th2-Zellen	15	926	2485	nd	nd.
IL-4-depletierte Th2-Zellen	nd.	1032	3132	256	nd.
IL-10-defiziente Th2-Zellen	152	nd.	nd.	151	57
Naive Lymphozyten	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.
J558-Zellen	nd.	2135	nd.	nd.	24
IL-4-J558-Zellen	4754	2159	nd.	nd.	81

nd.: nicht detektierbar

Wie die Tabelle 3.1 zeigt, produzierten die Th2-Zellen das Zytokin IL-4 (15 pg/ml) jedoch kein IFN-γ, wohingegen die Th1-Zellen sehr viel IFN-γ (13610 pg/ml) aber kein IL-4 produzierten. Sowohl im Überstand der Th1 als auch der Th2-Zellen konnte IL-10 (127 pg/ml bzw. 926 pg/ml) und IL-13 (15 pg/ml bzw. 2485 pg/ml) detektiert werden, wobei die Menge beider Zytokine im Überstand der Th2-Zellen deutlich höher war. Th1 und Th2-Zellen produzierten beide keine detektierbare Menge an TGF-β. Der Erfolg des IL-4 Depletions-Assays konnte daran gemessen werden, dass nach der Depletion kein IL-4 mehr im Überstand der Zellen nachweisbar war. Das Niveau des produzierten IL-10 hat sich nach der IL-4-Depletion nicht geändert (1032 pg/ml), aber es konnte mehr IL-13 (3132 pg/ml) und IFN-γ (256 pg/ml) bestimmt werden, als bei Th2-Zellen ohne Depletions-Assay. Die IL-4-depletierten Zellen produzierten ebenfalls kein TGF-β. Die aus IL-10-defizienten Mäusen gewonnenen Th2-Zellen produzierten deutlich mehr IL-4 (152 pg/ml) als Th2-Zellen von Wildtyp

Tieren (15 pg/ml). Sowohl IL-10 als auch IL-13 konnte bei diesen Zellen nicht detektiert werden, jedoch befand sich TGF- β (57 pg/ml) im Überstand. Die verwendeten naiven Lymphozyten produzierten keines der gemessenen Zytokine auf einem detektierbaren Niveau. Die Messung der Überstände von Wildtyp-J558-Zellen und IL-4-J558-Zellen ergab, dass nur die IL-4-J558-Zellen messbare Level an IL-4 produzierten (4754 pg/ml). Außerdem produzieren die IL-4-J558-Zellen deutlich mehr IL-4, als Th2-Zellen. Zusätzlich zum IL-4 konnte in beiden J558-Zelltypen eine sehr hohe Konzentration an IL-10 gemessen werden (J558 = 2135 pg/ml bzw. J558-IL-4 = 2159 pg/ml), jedoch kein IL-13 oder IFN- γ . Außerdem unterschieden sich die beiden Zelltypen durch die Konzentration an TGF- β (J558= 24 pg/ml bzw. J558-IL4= 81 pg/ml).

3.2 Th2-Zellen stimulieren das axonale Auswachsen von organotypisch entorhinalen Kortex-Schnittkulturen durch IL-4

Im Folgenden sollte untersucht werden, wie Th2-Zellen das axonale Auswachsen in organotypisch entorhinalen Kortex-Schnittkulturen beeinflussen. Aus Vorarbeiten war bereits bekannt, dass sowohl spezifisch als auch unspezifisch stimulierte Th2-Zellen das axonale Auswachsen stimulieren. Aufgrund späterer *in vivo*-Experimente wurden auch für die *in vitro*-Experimente unspezifisch ConA-aktivierte Zellen verwendet. Sowohl die primären Lymphozyten als auch die organotypisch entorhinalen Kortex-Schnittkulturen wurden von Tieren mit einem Balb/C Hintergrund gewonnen. Die T-Lymphozyten der Balb/C Mäuse lassen sich besonders gut in den Th2-Phänotyp polarisieren, weshalb von den B10.PL Mäusen der Vorarbeiten abgewichen wurde. Wie unter (2.2.1.2.3) beschrieben, wurden die Zellen (~ 120000 Zellen) in einem Kollagentropfen neben der entorhinalen Kortex-Schnittkultur plziert, die anschließend 2 Tage kultiviert wurde. Danach erfolgte eine Auswertung der axonalen Dichte durch 3 unabhängige Experimentatoren. Alle Experimente sind verblindet ausgewertet worden. Zuerst wurden Th1-Zellen, Th2-Zellen und naive, das heißt unstimulierte Zellen verwendet und mit Schnittkulturen, die ohne Zellen kultiviert wurden, verglichen.

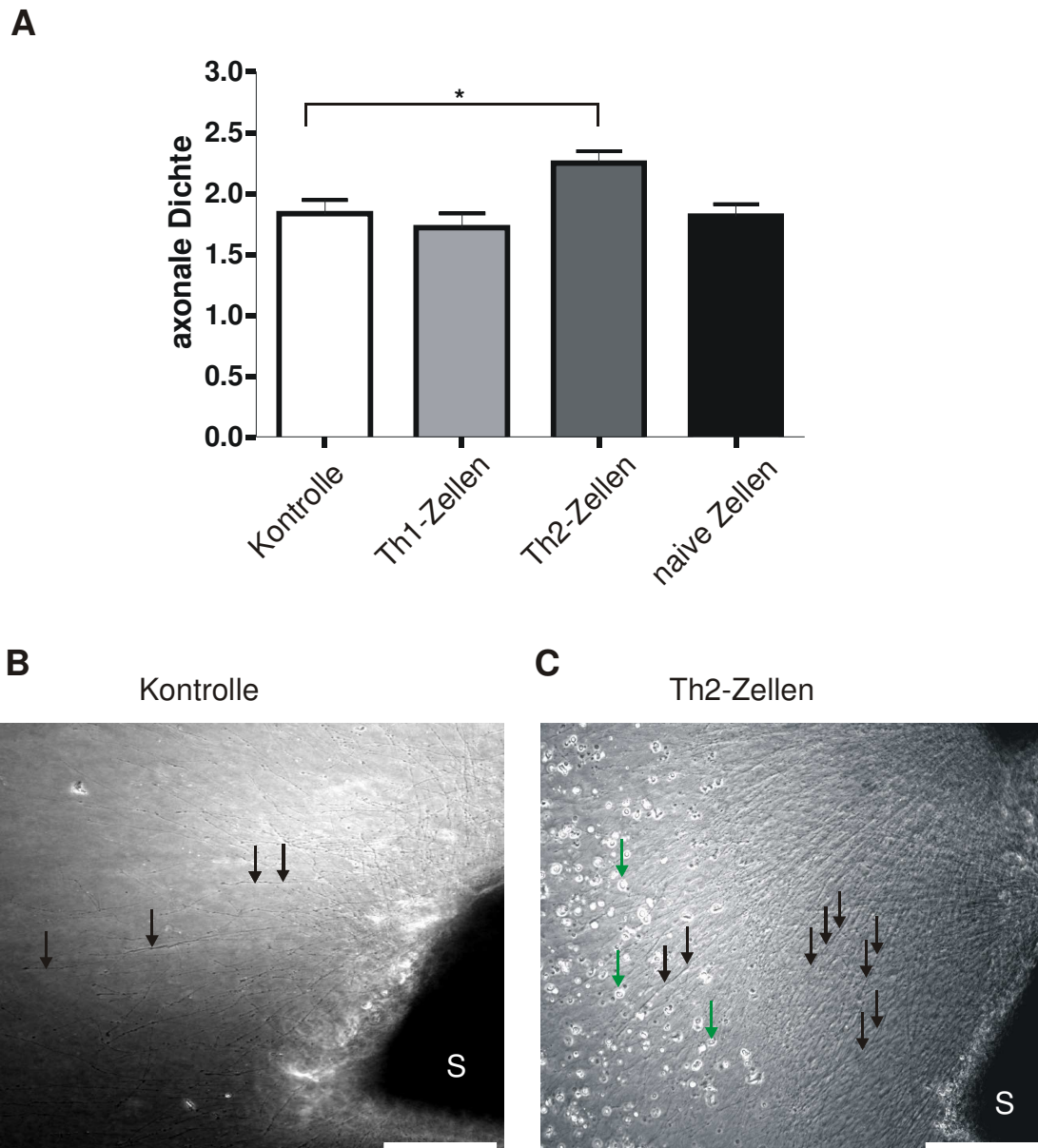


Abb. 3.2: Einfluss von ConA-stimulierten Th2-Zellen auf das axonale Auswachsen von entorhinalen Kortex-Schnittkulturen

A) $CD4^+$ -Th1-Zellen ($n = 48$), $CD4^+$ -Th2-Zellen ($n = 48$) und $CD4^+$ -naive-T-Zellen ($n = 48$) wurden mit organotypischen entorhinalen Kortex-Schnittkulturen kultiviert. Als Kontrolle dienten Schnittkulturen, die ohne T-Zellen ($n = 48$) kultiviert wurden. Die Abbildung zeigt den Mittelwert mit/ohne Standardfehler des Mittelwertes von drei unabhängigen Experimenten.

B) Die Abbildung zeigt ein exemplarisches Foto von einer Schnittkultur aus der Kontrollgruppe mit spontanem axonalem Auswachsen

C) Die Abbildung zeigt ein exemplarisches Foto einer Schnittkultur, die mit Th2-Zellen kokultiviert wurde. Der Balken entspricht einer Länge von $100 \mu\text{m}$.

Die schwarzen Pfeile zeigen ausgewachsene Axone und die grünen Pfeile kokultivierte T-Zellen. S= Schnittkultur; * = $p < 0,05$

Wie in Abbildung 3.2_A dargestellt, war das Auswachsen der Schnittkulturen nur in Gegenwart von Th2-Zellen und nicht in Gegenwart von naiven Lymphozyten oder Th1-Zellen im Vergleich zur Kontrolle signifikant erhöht. Die Abbildung 3.2_B zeigt, dass in der Kontrollgruppe ein spontanes Auswachsen beobachtet werden konnte, wobei es sich um vereinzelte Axone handelte. Ein ähnliches Auswachsen konnte in allen folgenden Experimenten in den Kontrollgruppen festgestellt werden. Der stimulierende Effekt von Th2-Zellen auf das axonale Auswachsen war durch eine höhere Anzahl an Axonen, die deutlich dichter zusammenlagen gekennzeichnet, wie Abbildung 3.2_C zeigt. Aufgrund der ELISA-Ergebnisse in 3.1 wurde deutlich, dass Balb/C-Lymphozyten nur dann das axonale Auswachsen stimulieren, wenn sie IL-4, IL-10 und IL-13 aber kein IFN- γ produzieren. Deshalb wurde im nächsten Schritt untersucht, ob spezifische Antikörper gegen die Zytokine IL-4, IL-10 und IL-13 in der Lage waren, die durch Th2-Zellen verursachte Stimulation des axonalen Auswachsens zu inhibieren. Dazu wurden alle 3 Antikörper getrennt voneinander in das Kollagen der Schnittkulturen und der Zellen gemischt und mit einem Ansatz ohne Antikörper bzw. einem Ansatz mit unspezifischen Isotyp-Kontrollantikörpern verglichen.

Die Abbildung 3.2.2_A-C zeigen, dass die zwei benutzten Isotyp-Kontrollantikörper IgG1 und IgG2b keinen Einfluss auf die Th2-vermittelte Stimulation des axonalen Auswachsens hatten. Von den spezifischen Antikörpern konnte lediglich der IL-4-Antikörper das verstärkte Auswachsen in der Anwesenheit von Th2-Zellen inhibieren. Die Antikörper gegen IL-10 und IL-13 hatten beide keinen Einfluss auf das verstärkte Auswachsen.

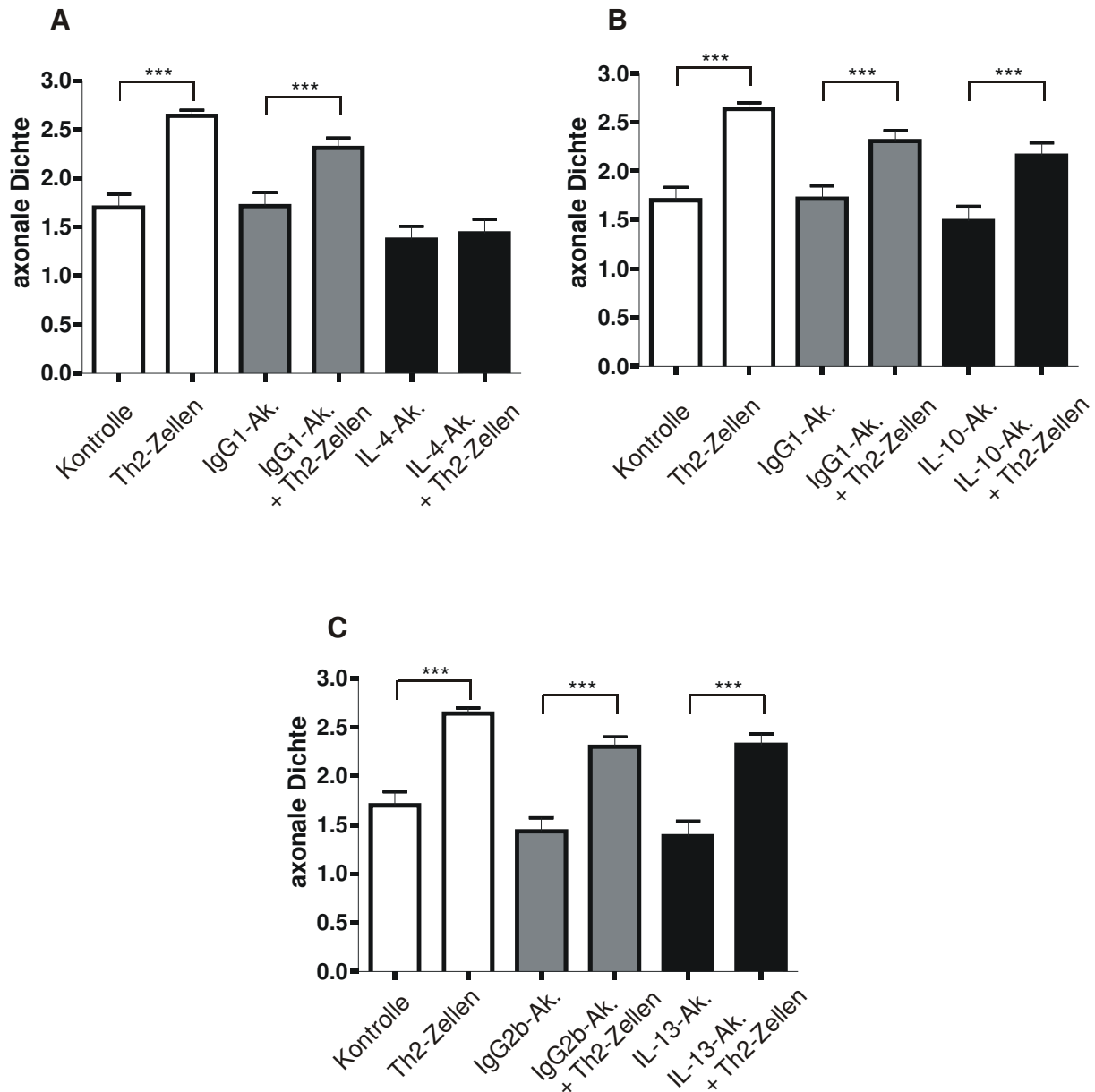


Abb. 3.2.2: Blockierende Antikörper für IL-4 inhibieren den stimulierenden Effekt von Th2-Zellen auf das axonale Auswachsen von entorhinalen Kortex-Schnittkulturen

CD4⁺-Th2-Zellen wurden mit organotypischen entorhinalen Kortex-Schnittkulturen von 2 Tage alten Balb/C-Tieren kultiviert. Als Kontrolle dienten Schnittkulturen, die ohne T-Zellen kultiviert wurden. Zusätzlich erfolgte die Zugabe von spezifisch blockierenden Antikörper gegen IL-4 und IL-10 (beide IgG1) und IL-13 (IgG2b) in einer Konzentration von 50 ng/ml (IL-4 und IL-10) bzw. 100 ng/ml (IL-13). Die Antikörper wurden sowohl in den Kollagentropfen mit den T-Zellen als auch in den überschichtenden Kollagentropfen gemischt. Die Abbildung zeigt den Mittelwert mit/ohne Standardfehler des Mittelwertes von drei unabhängigen Experimenten.

Anzahl der Schnitte in den untersuchten Gruppen:

K/Th2 n= 27/28, IgG1/IgG1+Th2 n= 27/24, IgG2/IgG2+th2 n= 24/22, α IL-4/ α IL-4+Th2 n= 22/25, α IL-10/ α IL-10+Th2 n= 19/28, α IL-13/ α IL-13+Th2 n= 21/23; *** = p < 0,005

Aufgrund dieser Ergebnisse, wurde die Rolle des IL-4 bei der Th2-vermittelten Stimulation des axonalen Auswachsens bei organotypisch entorhinalen Kortex-Schnittkulturen genauer untersucht. Dazu wurden zunächst Plasmazytomzellen verwendet, die genetisch verändert, hohe Mengen an IL-4 produzierten (siehe Tabelle 3.1) und mit Wildtyp-Plasmazytomzellen verglichen.

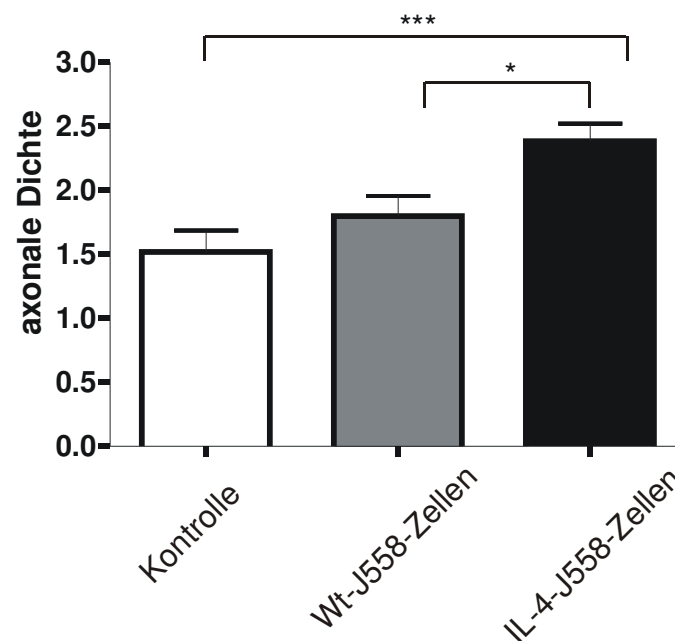


Abb. 3.2.3: Einfluss von IL-4 produzierenden Plasmazytomzellen auf das axonale Auswachsen von entorhinalen Kortex-Schnittkulturen

Wildtyp-J558-Zellen (n= 25) und IL-4-J558-Zellen (n= 25) wurden mit organotypischen entorhinalen Kortex-Schnittkulturen kultiviert. Als Kontrolle dienten Schnittkulturen, die ohne Plasmazytomzellen (n= 25) kultiviert wurden. Die Abbildung zeigt den Mittelwert mit/ohne Standardfehler des Mittelwertes von drei unabhängigen Experimenten.

* = $p < 0,05$; *** = $p < 0,005$

Wie die Abbildung 3.2.3 zeigt, gab es zwischen unbehandelten Schnittkulturen und Schnittkulturen mit Wildtyp-Plasmazytomzellen keine Unterschiede in der Menge an ausgewachsenen Axonen, jedoch hatten die IL-4-J558-Zellen einen deutlich stimulierenden Einfluss auf das axonale Auswachsen. Es konnte also gezeigt werden, dass nicht nur Th2-polarisierte-Lymphozyten in der Lage waren, das axonale Wachstum zu stimulieren, sondern auch andere Zellen, sofern sie IL-4 produzierten. Da die IL4-J558-Zellen neben IL-4 auch noch IL-10 produzierten (siehe Tabelle 3.1), konnte eine mögliche Abhängigkeit zwischen den beiden Zytokinen nicht

ausgeschlossen werden, jedoch waren die Wildtyp-Plasmozytomzellen, die nur IL-10 produzieren, nicht zu einer Stimulation befähigt.

Im folgenden Experiment wurden T-Zellen verwendet, die hohe Konzentrationen an IL-4 aufwiesen, jedoch kein IL-10 und IL-13 (siehe Tab. 3.1). Diese Zellen wurden aus IL-10-defizienten Mäusen gewonnen und unter denselben Bedingungen wie Wildtyp-Th2-Zellen kultiviert.

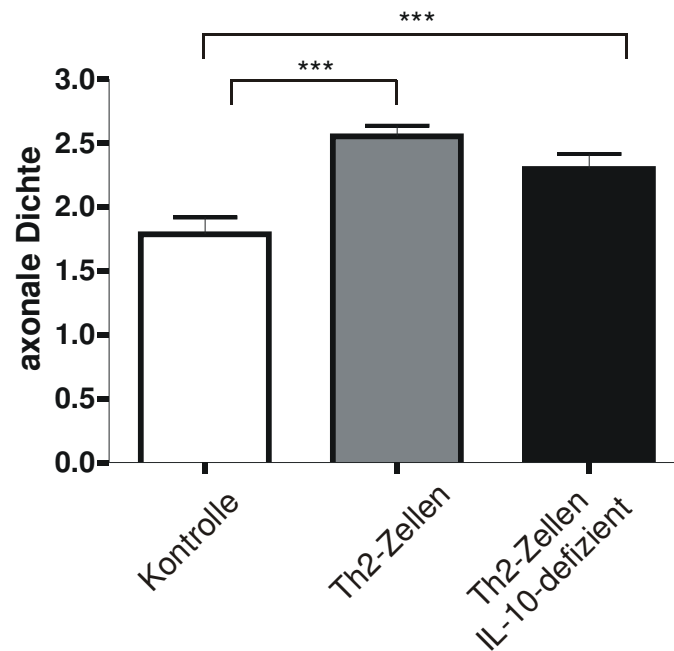


Abb. 3.2.4: Th2-Zellen stimulieren das axonale Auswachsen von entorhinalen Kortex-Schnittkulturen unabhängig von IL-10

CD4⁺-Th2-Zellen von Balb/C Mäusen (n= 31) und CD4⁺Th2-Zellen von IL-10- defizienten Mäusen (n= 33) wurden mit organotypischen entorhinalen Kortex-Schnittkulturen kultiviert. Als Kontrolle dienten Schnittkulturen, die ohne T-Zellen (n= 25) kultiviert wurden. Die Abbildung zeigt den Mittelwert mit/ohne Standardfehler des Mittelwertes von drei unabhängigen Experimenten.

*** = $p < 0,005$

Die Abbildung 3.2.4 zeigt, dass Th2-Zellen von IL-10-defizienten Mäusen das axonale Wachstum in vergleichbarem Umfang stimulieren, wie die Th2-Zellen von Balb/C Mäusen. Es konnte jedoch ebenfalls festgestellt werden, dass obwohl die Zellen von IL-10-defizienten Mäusen deutlich mehr IL-4 produzierten als die Wildtyp-Th2-Zellen (siehe Tabelle 3.1), es zu keiner weiteren Steigerung des axonalen Auswachsens kam.

Um die Spezifität von IL-4, bei der durch Th2-Zellen induzierten Steigerung des axonalen Auswachsens zu untersuchen, wurde ein weiteres Experiment

herangezogen. Für dieses Experiment wurden Th2-Zellen restimuliert und die Hälfte einem IL-4-Depletions-Assay unterzogen. Die Th2-Population bestand aus Zellen mit heterogenem Zytokinprofil. Einige Zellen produzierten IL-4 aber kein IL-10, andere produzierten beides und noch andere produzierten nur IL-10. Der Assay ermöglichte es, dass die beiden erstgenannten Zelltypen depletiert werden konnten. Wie Tab. 3.1 zeigt produzierten die gewonnenen Zellen kein IL-4, jedoch weiterhin IL-10 und IL-13. Die IL-4-depletierten Zellen, als auch die unbehandelten Th2-Zellen wurden im Kollagen-Auswachsassay eingesetzt und mit unbehandelten Schnittkulturen verglichen.

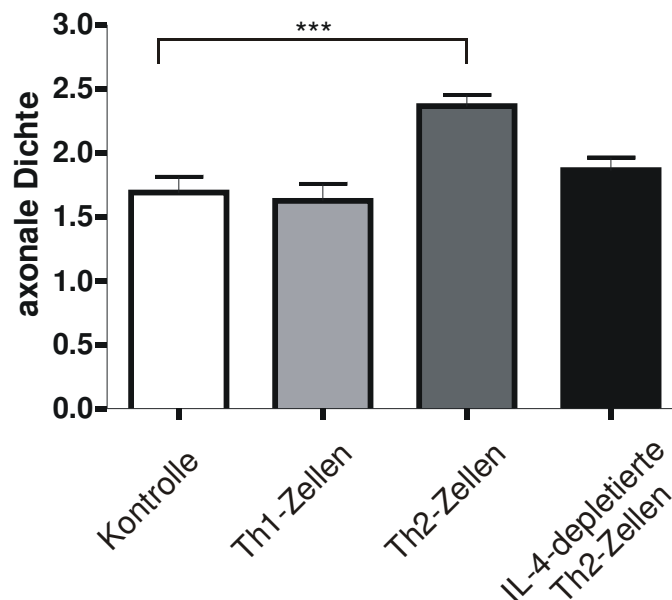


Abb. 3.2.5: Th2-Zellen stimulieren das axonale Auswachsen von entorhinalen Kortex-Schnittkulturen durch IL-4

CD4⁺-Th1-Zellen (n= 48), Balb/C-CD4⁺-Th2 (n= 48) und CD4⁺-Th2-Zellen nach einem IL-4-Depletions-Assay (n= 48) wurden mit organotypischen entorhinalen Kortex-Schnittkulturen kultiviert. Als Kontrolle dienten Schnittkulturen, die ohne T-Zellen (n= 48) kultiviert wurden. Die Abbildung zeigt den Mittelwert mit/ohne Standardfehler des Mittelwertes von drei unabhängigen Experimenten.

*** = $p < 0,005$

In Abbildung 3.2.5 wird gezeigt, dass die IL-4-depletierten Th2-Zellen das axonale Auswachsen im Vergleich zur Kontrolle nicht stimulieren können. Für die parallel hergestellten Th2-Zellen konnte erneut eine signifikante Steigerung des axonalen Auswachsens beobachtet werden.

Die bisherigen Ergebnisse zeigten, dass Zellen durch eine kontinuierliche Zufuhr von IL-4 in der Lage waren, dass axonale Auswachsen der organotypisch entorhinalen Kortex Schnitkulturen positiv beeinflussen zu können. Für einen therapeutischen Ansatz war es interessant, ob eine einmalige Gabe des Proteins denselben Effekt hat. Dazu wurde rekombinant hergestelltes und aufgereinigtes IL-4 in verschiedenen Konzentrationen (500 ng/ml, 50 ng/ml, 5 ng/ml, 500 pg/ml, 50 pg/ml und 5 pg/ml) in das Zellkulturmedium gemischt. Lediglich in der geringsten Konzentration von 5 pg/ml ließ sich eine signifikante Steigerung des axonalen Auswachsens erzielen, wie Abbildung 3.2.6 zeigt.

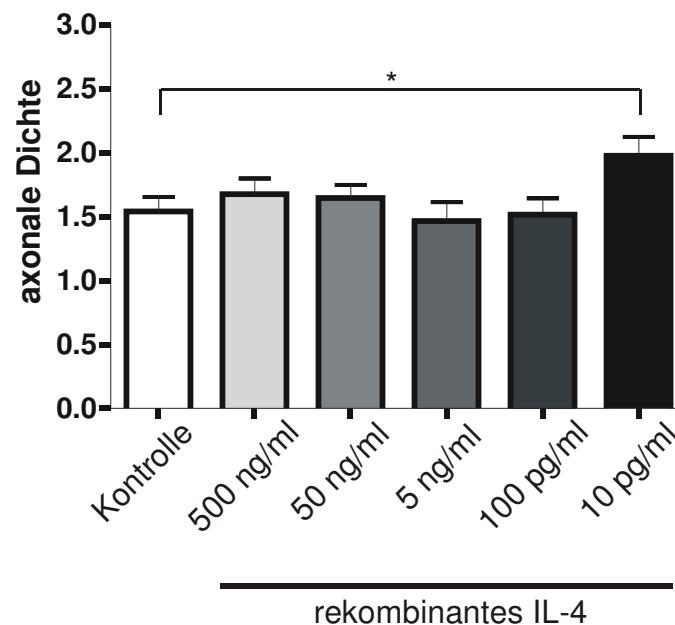


Abb. 3.2.6: Einfluss von rekombinanten IL-4 auf das axonale Auswachsen von entorhinalen Kortex-Schnittkulturen

Rekombinant hergestelltes IL-4 wurde in den Konzentrationen 500 ng/ml (n= 31), 50 ng/ml (n= 38), 5 ng/ml (n= 29), 100 pg/ml (n= 35) und 10 pg/ml (n= 40) in das Medium von organotypischen entorhinalen Kortex-Schnittkulturen gemischt. Als Kontrolle dienten Schnittkulturen, die ohne rekombinantes IL-4 (n= 40) kultiviert wurden. Nach 2 Tagen in Kultur wurden die Schnittkulturen nach festgelegten morphologischen Kriterien ausgewertet. Die Abbildung zeigt den Mittelwert mit/ohne Standardfehler des Mittelwertes von drei unabhängigen Experimenten.

* = $p < 0,05$

3.3 Expression des IL-4-Rezeptors

Bisher konnte gezeigt werden, dass die Th2-Zellen ihren stimulierenden Effekt auf das axonale Wachstum durch IL-4 vermitteln. Deshalb sollte untersucht werden, ob der IL-4-Rezeptor in den verwendeten neuronalen Geweben exprimiert wurde. Dazu

wurden RT-PCR-Analysen primärer neuronaler Zellen bzw. neuronalem Gewebe durchgeführt. Die gesamt-RNA der in Tabelle 3.2. aufgelisteten Proben wurde verwendet.

Tabelle: 3.2 Auflistung der verwendeten Zellen und Gewebe für die RT-PCR Analyse des IL-4 Rezeptors

Gewebe	primär	P2	adult
Neurone	x		
Astrozyten	x		
Mikrogliazellen	x		
2 Tage kultivierte entorhinal-hippocampale Schnittkulturen		x	
Hippocampus		x	
Entorhinaler Kortex		x	
Gesamtgehirn		x	
Rückenmark			x
Hippocampus			x
Entorhinaler Kortex			x
Gesamtgehirn			x
Niere			x
Th2-Zellen	x		

Zunächst wurde die Qualität der isolierten RNA überprüft, indem jeweils 1 µl der RNA auf einem 1,5 %igen Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch getrennt wurde. Wie Abbildung 3.3_A zeigt gab es für alle Proben sehr deutliche Banden für die 28s Untereinheit bei ca. 4,7 kb und für die 18s Untereinheit bei 1,9 kb, was als Kriterium für eine gute Qualität der RNA galt. Nach der photometrischen Quantifizierung der RNA wurden jeweils 2 µg RNA für die Reverse-Transkription (RT+) benutzt und nochmals 0,5 µg RNA für die Kontrolle (RT-), also ohne das Enzym Reverse Transkriptase inkubiert. Anschließend wurde sowohl von der Positiv- als auch von der Negativprobe 1 µl für eine β-Aktin-PCR verwendet. Die Abbildung 3.3_B zeigt, dass nur in den RT-Positivproben eine Bande von erwarteten 519 bp zu erkennen war und nicht in den RT-Negativproben. Damit konnte gezeigt werden, dass keine genomische DNA die Proben kontaminierte. Nun wurden alle RT-Positivproben für eine PCR mit Primern spezifisch für den IL-4-Rezeptor verwendet (siehe Abbildung 3.3_C). In der PCR für die primären Zellen (Neurone, Astrozyten und Mikrogliazellen) konnte eine Bande von erwarteter Größe (657 bp) in der Probe von Neuronen und besonders stark bei den Astrozyten detektiert werden, jedoch nicht bei den Mikrogliazellen. In den Gewebeproben von 2 Tage alten Mäusen ist die entsprechende Bande deutlich sichtbar bei 2 Tagen lang kultivierten Schnittkulturen

sowie frisch gewonnenen Hippocampus- und Gesamthirngewebe. Im entorhinalen Kortex von 2 Tage alten Mäusen ist die Bande schwächer als bei den primären Neuronen. Im adulten Gewebe ist eine Bande von 657 bp sowohl im Rückenmark, Gesamtgehirn, entorhinalen Kortex als auch der Niere zu erkennen. Die Gewebeprobe des Hippocampus zeigt hingegen keine Bande. Als Positivkontrolle wurden restimierte Th2-Zellen benutzt, die eine deutliche Bande für den IL-4-Rezeptor zeigen, wohingegen in der Wasserkontrolle keine Bande amplifiziert wurde.

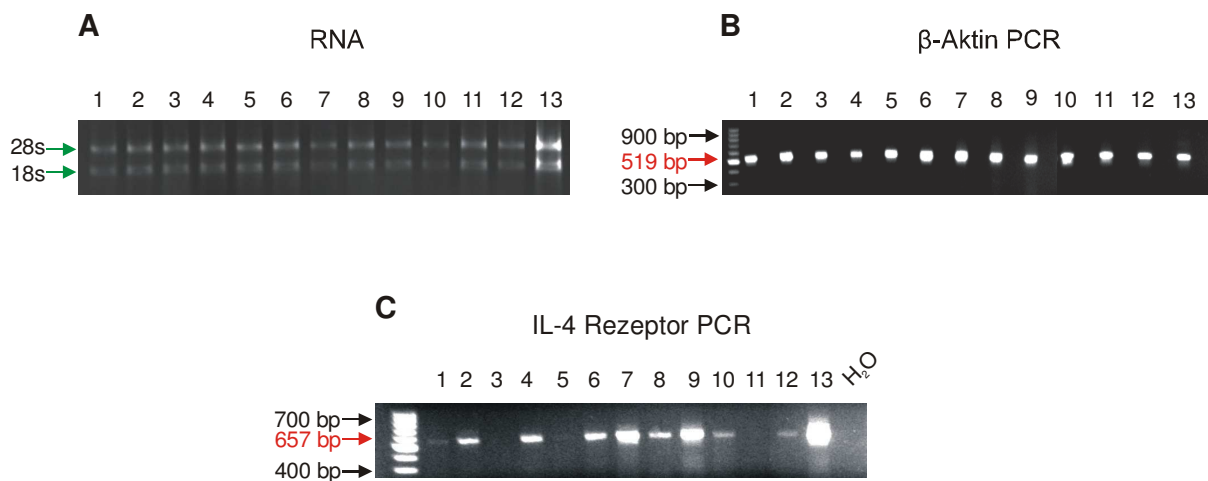


Abb. 3.3: RT-PCR verschiedener Gewebe auf den IL-4 Rezeptor

A) 1 μ g isolierter Gesamt-RNA wurde auf einem 1,5 %iges Agarosegel aufgetrennt, und das Vorhandensein der 28s- und 18s-Untereinheit als Qualitätsmerkmal der RNA herangezogen.

B) Je Probe wurden 2 μ g RNA mittels Reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben (RT+) und anschließend einer PCR mit Primern spezifisch für β -Aktin (519 bp) unterzogen. Als Kontrolle wurde jeweils eine Probe genommen, bei der die RNA ohne das Enzym Reverse Transkriptase inkubiert wurde (RT-).

C) 1 μ l der cDNA wurde für eine PCR mit Primern spezifisch für den IL-4 Rezeptor verwendet, die eine Bande von 657 bp amplifizierten.

Reihenfolge der aufgetragenen Proben:

1= primäre Neurone; 2= primäre Astrozyten; 3= primäre Mikrogliazellen; 4= Kortex-Schnittkulturen; 5= P2 entorhinaler Kortex; 6= P2 Hippocampus; 7= P2 Gesamtgehirn; 8= adultes Rückenmark; 9= adultes Gesamtgehirn; 10= adulter entorhinaler Kortex; 11= adulter Hippocampus; 12= adulte Niere; 13= primäre Th2-Zellen.

Grüne Pfeile markieren die 28s- und 18s-Untereinheit der RNA; schwarze Pfeile markieren Banden aus der 100 bp Ladder; rote Pfeile markieren amplifizierte PCR Produkte. Größenstandard= 100 bp-DNA-Ladder

3.4 Der stimulierende Effekt von Th2-Zellen auf das axonale Auswachsen von entorhinalen Kortex- Schnittkulturen wird über den IL-4-Rezeptor vermittelt

Es konnte gezeigt werden, dass Th2-Zellen spezifisch durch IL-4 das axonale Auswachsen von entorhinalen Kortex-Schnittkulturen stimulieren und gleichzeitig konnte die Expression des IL-4-Rezeptors in neuronalen Geweben nachgewiesen werden. In den folgenden Experimenten sollte gezeigt werden, dass das IL-4 der Th2-Zellen seine stimulierende Wirkung des axonalen Auswachsens über den IL-4 Rezeptor auf neuronalen Zellen in den Schnittkulturen vermittelte. Dazu wurden stimulierte Th2-Zellen mit Schnittkulturen von 3 genetisch veränderten Mauslinien (IL-4Rezeptor-defizient, Stat6-defizient und IL-4-Rezeptor-mutant) kultiviert. Als Kontrolle diente der Hintergrundstamm (Balb/C) der drei Mauslinien. Den IL-4-Rezeptor-defizienten Mäusen fehlte der Rezeptor und somit auch die Aktivierung der IL-4-Signalkaskade. Bei den Stat6-defizienten Mäusen konnte das IL-4 an den Rezeptor binden, jedoch nicht die Stat6-abhängigen intrazellulären Kaskaden aktivieren. Bei der IL-4-Rezeptor-mutanten Mauslinie war ein funktionsfähiger Rezeptor vorhanden und konnte durch IL-4 aktiviert werden. Ein Aminosäureaustausch (Y497F) führte jedoch dazu, dass das Tyrosin, welches für die spezifische Aktivierung des Akt/MAP-Kinase-Signalweges verantwortlich ist, durch ein Phenylalanin ersetzt wurde, wodurch eine durch IL-4-stimulierte Aktivierung des Akt/MAP-Kinase-Signalweges verhindert wurde.

Zunächst wurden Schnittkulturen der mutanten Mäuse mit Faktoren behandelt, die in Vorexperimenten zeigten, dass sie sehr stark das axonale Auswachsen von Schnittkulturen stimulieren können. Diese Faktoren waren NT-3 und IL-6, die jeweils mit 500 ng/ml eine hoch signifikante Steigerung des axonalen Auswachsens zeigten. Mit Hilfe dieser Experimente sollte überprüft werden, ob bei den genetisch veränderten Tieren überhaupt eine Steigerung des axonalen Auswachsens möglich war.

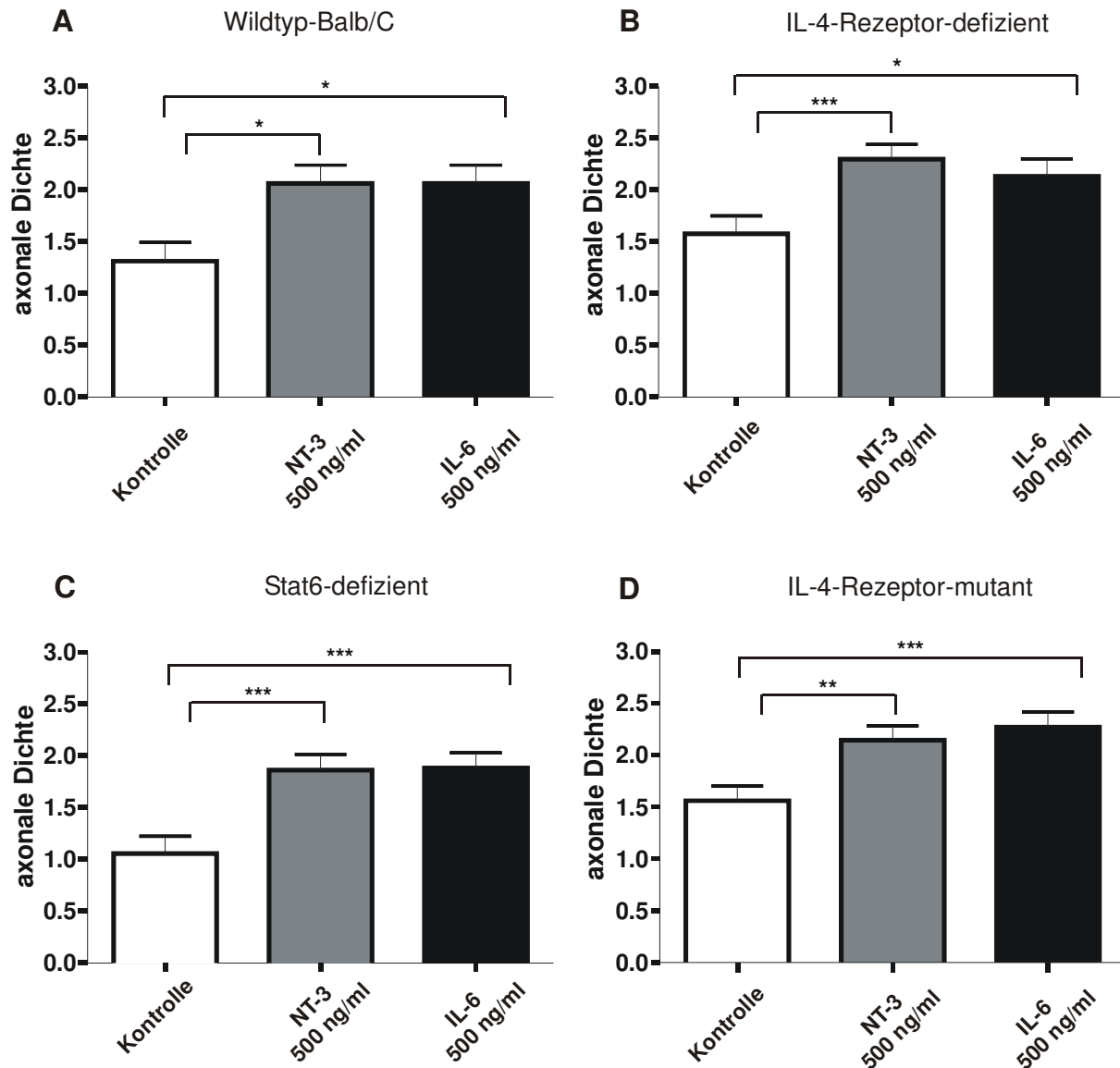


Abb. 3.4: Einfluss von NT-3 und IL-6 auf das axonale Auswachsen von entorhinalen Kortex-Schnittkulturen genetisch veränderter Mäuse

A) Schnittkulturen von Balb/C Mäusen wurden mit rekombinant hergestelltem NT-3 (n= 20) und IL-6 (n= 19) inkubiert und mit unbehandelten Schnittkulturen (n= 16) verglichen.

B) Schnittkulturen von IL-4-Rezeptor-defizienten Mäusen wurden mit rekombinant hergestelltem NT-3 (n= 16) und IL-6 (n= 16) inkubiert und mit unbehandelten Schnittkulturen (n= 19) verglichen.

C) Schnittkulturen von Stat6-defizienten Mäusen wurde mit rekombinant hergestelltem NT-3 (n= 18) und IL-6 (n= 17) inkubiert und mit unbehandelten Schnittkulturen (n= 18) verglichen.

D) Schnittkulturen von IL-4-Rezeptor-mutanten Mäusen wurde mit rekombinant hergestelltem NT-3 (n= 24) und IL-6 (n= 24) inkubiert und mit unbehandelten Schnittkulturen (n= 24) verglichen.

Die vier Abbildungen zeigen jeweils den Mittelwert mit/ohne Standardfehler des Mittelwertes von drei unabhängigen Experimenten.

* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,005$

Die Abbildungen 3.4_A-D zeigen, dass die Schnittkulturen aller verwendeten Mauslinien in der Gegenwart von NT-3 und IL-6 (500 ng/ml) eine signifikante Steigerung des axonalen Auswachsens gegenüber unbehandelten Schnittkulturen hatten. Die Schnittkulturen der Stat6-defizienten Mäuse hatten ein reduziertes Auswachsen gegenüber den Wildtyp-Schnittkulturen, was bei den Schnittkulturen von IL-4-Rezeptor-defizienten Mäusen und IL-4-Rezeptor-mutanten Mäusen nicht beobachtet werden konnte.

Die Abbildung 3.4.2 zeigt, dass das axonale Wachstum von Wildtyp-Schnittkulturen durch Th2-Zellen verstärkt werden kann, jedoch nicht bei Schnittkulturen von parallel kultivierten IL-4-Rezeptor-defizienten Mäusen. Bezüglich intrazellulärer Signalmoleküle des IL-4-Rezeptors konnte festgestellt werden, dass Stat6 kein notwendiger Faktor ist, um eine Stimulation durch Th2-Zellen zu erzielen. Die Th2-Zellen ermöglichten eine signifikante Steigerung des axonalen Auswachsens von Schnittkulturen Stat6-defizienter Mäuse (siehe Abbildung 3.4.2). Im Vergleich zu Wildtyp-Schnittkulturen ist das axonale Auswachsen von Stat6-defizienten Mäusen signifikant reduziert und kann auch durch Th2-Zellen nicht mehr auf das ursprüngliche Auswachsenniveau gebracht werden. Dahingegen ist das Vorhandensein eines Tyrosins an Position (497) des IL-4-Rezeptors notwendig, damit Th2-Zellen das Auswachsen der Schnittkulturen stimulieren können. Die Th2-Zellen können das axonale Auswachsen der Schnittkulturen von IL-4-Rezeptor-mutanten Mäusen nicht stimulieren, also den Akt/MAP-Kinase-Signalweg durch den IL-4 Rezeptor aktivieren. Das Auswachsen von Wildtyp-Schnittkulturen ohne Th2-Zellen, Schnittkulturen von IL-4-Rezeptor-defizienten Mäusen und IL-4-Rezeptor-mutanten Mäusen mit und ohne Th2-Zellen bewegte sich auf demselben Niveau.

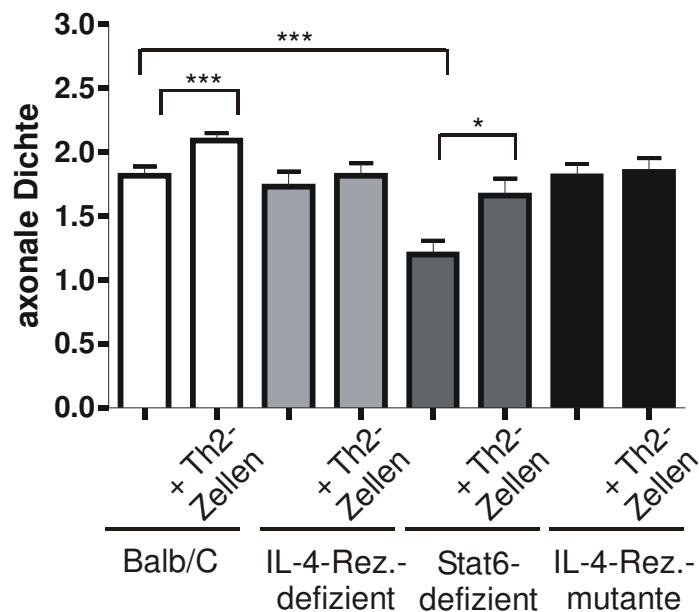


Abb. 3.4.2: Der Einfluss von Th2-Zellen auf das axonale Auswachsen von entorhinalen Kortex-Schnittkulturen durch den IL-4 Rezeptor vermittelt

CD4⁺-Th2-Zellen wurden mit organotypischen entorhinalen Kortex-Schnittkulturen von 2 Tage alten Balb/C, IL-4-Rezeptor-defizienten, Stat6-defizienten und IL-4-Rezeptor-mutanten Mäusen kultiviert. Als Kontrolle dienten Schnittkulturen des jeweiligen Genotyps, die ohne T-Zellen kultiviert wurden. Die Abbildung zeigt den Mittelwert mit/ohne Standardfehler des Mittelwertes von drei unabhängigen Experimenten.

Anzahl der Schnittkulturen +/- Th2-Zellen: Balb/C n= 48/48; IL-4R K.O. n= 48/48; Stat6 K.O. n= 40/40; IL-4Rm n= 42/42; * = p < 0,05; *** = p < 0,005

3.5 Akt- und MAP-Kinase sind an der durch Th2-Zellen vermittelten Stimulation des axonalen Auswachsens beteiligt

Um den Einfluss der Akt- bzw. MAP-Kinase in der durch Th2-Zellen vermittelten Stimulation des axonalen Auswachsens zu untersuchen, wurden spezifische Inhibitoren der Akt-Kinase (LY294002) und MAP-Kinase (U10126) verwendet. Da nicht bekannt war, in welcher Konzentration die Inhibitoren zu einer ausreichenden Hemmung der Kinase-Aktivitäten führten, mussten diese vorher bestimmt werden. Dazu wurden die Inhibitoren in einem Protein-Assay verwendet, um eine geeignete Konzentration zu finden. Das verwendete Protokoll für den Protein-Assay war bisher nur zur Analyse der Aktivierung von Trk-Rezeptoren durch Neurotrophine verwendet worden und nicht für die Aktivierung der Akt- und MAP-Kinase. Deshalb wurde der Assay zunächst auf seine Aussagefähigkeit untersucht. Dazu wurden die vier Neurotrophine NGF, NT-3, BDNF und NT-4 verwendet.

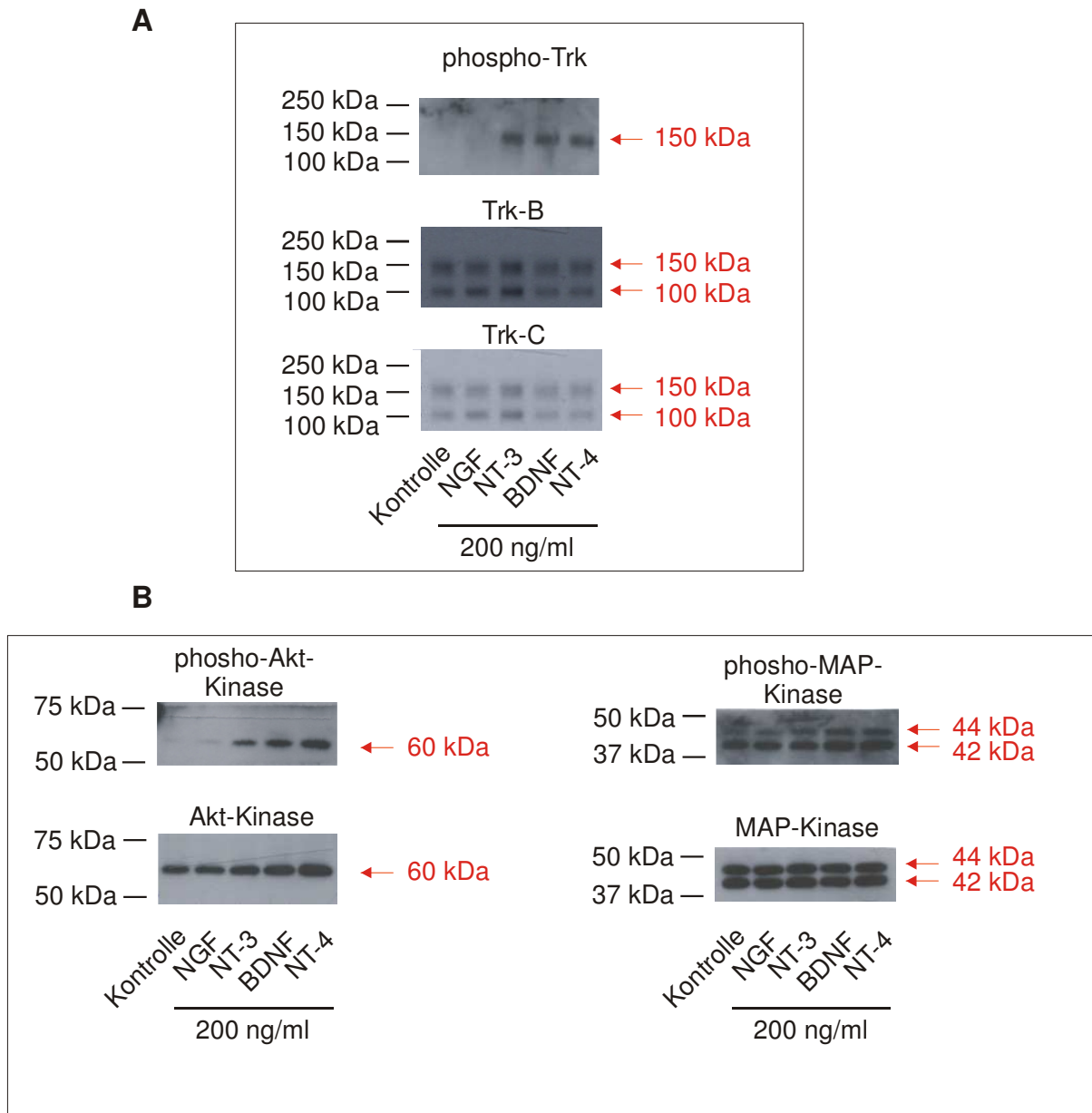


Abb. 3.5: Western-Blot-Analyse der Akt- und MAP-Kinase-Aktivierung von entorhinal-hippocampalen Schnittkulturen durch NT-3

Es wurden Schnittkulturen mit 200 ng/ml NGF, NT-3, BDNF und NT-4 für 5 min inkubiert bevor eine Proteinextraktion durchgeführt wurde. Als Kontrolle wurden unbehandelte Schnittkulturen verwendet. Es wurden 20 µg Protein auf ein 10%iges Agarosegel aufgetragen getrennt. Die Proteine wurden elektrophoretisch auf Nitrozellulosemembranen übertragen und mit Antikörpern gegen phospho-Trk (Abbildung A) bzw. phospho-Akt- und phospho-MAP-Kinase (Abbildung B) inkubiert. Die Signale wurden mit Hilfe eines Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper und nachfolgender ECL-Reaktion detektiert. Nach der Dokumentation wurde die Membranen von den Antikörpern befreit und mit Antikörpern, die nur die nicht-phosphorylierte Form von TrkB/C (Abbildung A) bzw. Akt- und MAP-Kinase (Abbildung B) erkennen, inkubiert. Die Signale wurden wie oben beschrieben detektiert.

Proteingrößenstandard: Precision Plus Protein Dual Color Standard

Die Abbildung 3.5 zeigt, dass weder in der Kontrollgruppe noch durch NGF behandelte entorhinale Kortex-Schnittkulturen eine Aktivierung, d. h. Phosphorylierung der Rezeptoren Trk-B und -C (150 kDa) bzw. der Akt-Kinase (60 kDa) und MAP-Kinase (44/42 kDa) aufwiesen. Die Faktoren NT-3, BDNF und NT-4 konnten hingegen eine Phosphorylierung der Vollängen-Form (150 kDa) der Trk-B- und -C-Rezeptoren, sowie der Akt-Kinase (60 kDa) und der MAP-Kinase-p44 (44 kDa) verursachen. Somit konnte gezeigt werden, dass der verwendete Protein-Assay sinnvoll für die Konzentrationsfindung der Akt- und MAP-Kinase-Inhibition war. Als Kontrolle wurde der pan-Trk-Rezeptor-Blocker K252a in dem Inhibierungsexperiment verwendet. Da der Trk-C-Rezeptor in entorhinalen Kortex-Schnittkulturen besonders stark exprimiert wird, wurde dessen primärer Ligand NT-3 in den folgenden Experimenten verwendet. Der Aktivierung/Phosphorylierung des Trk-C-Rezeptors folgt u.a. die Aktivierung/Phosphorylierung von Akt- als auch MAP-Kinase, weshalb alle drei Inhibitoren parallel untersucht werden konnten. Dazu wurde wie unter (2.2.3.1) beschrieben entorhinal-hippocampales Gewebe mit 100 ng NT-3 für 5 min inkubiert. Einige Proben wurden mit DMSO als Kontrolle bzw. den Trk, AKT-Kinase oder MAP-Kinase Inhibitoren in zwei Konzentrationen vorinkubiert, um eine Blockierung der Kinase-Aktivität zu erzielen. Anschließend wurde eine Proteinextraktion durchgeführt und diese in einem Immuno-Blot-Assay untersucht. Die Inhibitoren verhindern, dass die entsprechenden Proteine phosphoryliert werden und somit die Signalkaskade aktiviert wird. Im Immuno-Blot wurde nun überprüft, ob eine Phosphorylierung von Trk-C, Akt- und MAP-Kinase nach Inkubation mit NT-3 vorlag.

Die Abbildung 3.5.2 zeigt, dass NT-3 mit als auch ohne DMSO die Phosphorylierung von Trk-C, Akt- und MAP-Kinase in dem Assay bewirkt, und dieser Effekt sich durch K252a als Trk-Inhibitor in den Konzentrationen 200 nM und 800 nM bzw. LY294002 und U10126 als Akt- bzw. MAP-Kinase Inhibitor mit 100 μ M blockieren lässt. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden diese Konzentrationen für die Schnittkulturen verwendet.

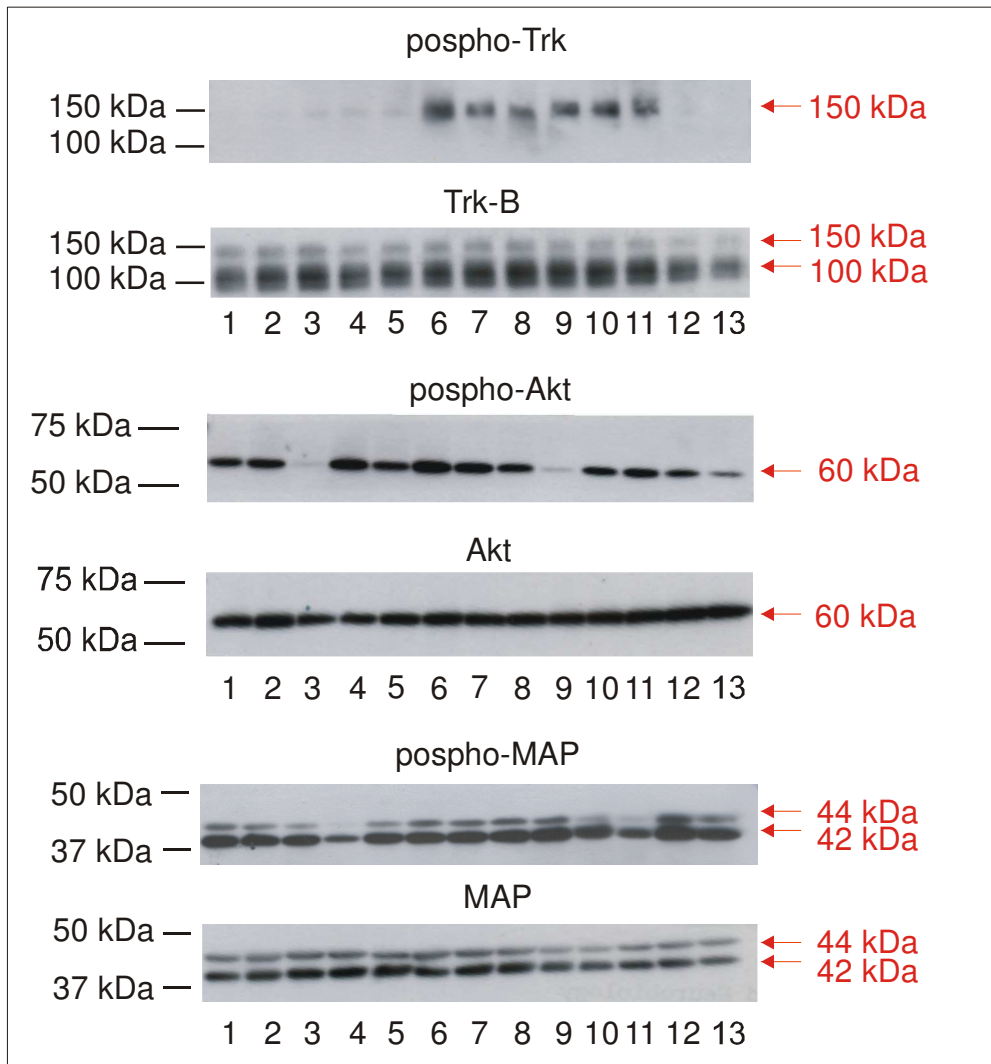


Abb. 3.5.2: Western-Blot-Analyse der Akt und MAP-Kinase Inhibition durch LY294002 bzw. U10126.

Es wurden Schnittkulturen mit dem Akt-Inhibitor LY294002, dem MAP-Inhibitor U10126 bzw. dem pan-Trk-Rezeptor-Inhibitor K252a vorinkubiert. Danach folgte eine Inkubation mit 200 ng/ml NT-3 für 5 min. Es wurden 20 µg Protein auf ein 10 %iges Agarosegel aufgetragen. Die Proteine wurden elektrophoretisch auf Nitrozellulosemembranen übertragen und mit Antikörper gegen pospho-Trk, pospho-Akt-Kinase und pospho-MAP-Kinase inkubiert. Die Signale wurden mit Hilfe eines Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper und nachfolgender ECL-Reaktion detektiert. Nach der Dokumentation wurde die Membranen von den Antikörpern befreit und mit Antikörpern, die nur die nicht-phosphorylierte Form von TrkB, Akt und MAP-Kinase erkennen, inkubiert. Die Signale wurden wie oben beschreiben detektiert. Die Proben sind in der folgenden Reihenfolge aufgetragen:

- 1= Kontrolle; 2= DMSO; 3= LY294002 100 µM; 4= U10126 100 µM; 5= K252a 800 nM;
- 6= NT-3 200 ng/ml; 7= NT-3 200 ng/ml + DMSO; 8= NT-3 200 ng/ml + LY294002 10 µM;
- 9= NT-3 200 ng/ml + LY294002 100 µM; 10= NT-3 200 ng/ml + U10126 10 µM;
- 11= NT-3 200 ng/ml + U10126 100 µM; 12= NT-3 200 ng/ml + K252a 200 nM;
- 13= NT-3 200 ng/ml + K252a 800 nM;

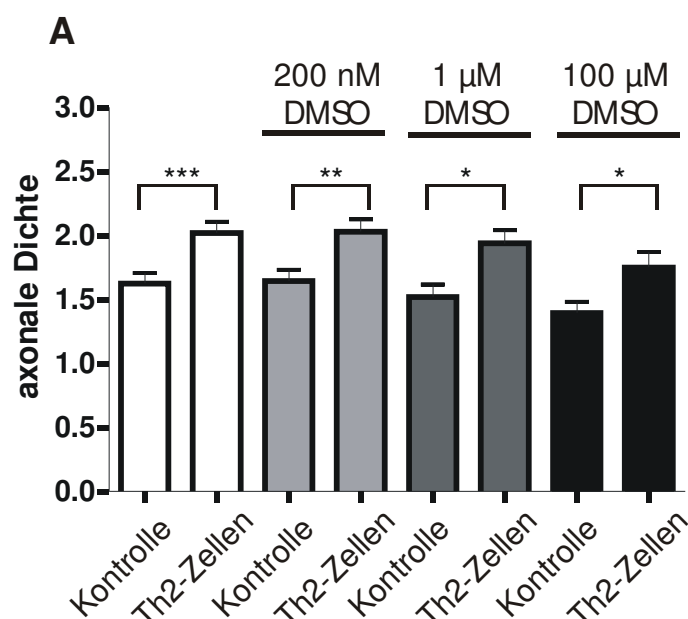
Proteingrößenstandard: Precision Plus Protein Dual Color Standard

Die IL-4-Produktion der Th2-Zellen funktioniert über einen Feedback-Mechanismus. Da der IL-4-Rezeptor auch in den T-Zellen den Akt/MAP-Kinase-Signalweg aktiviert, musste überprüft werden, ob die Inhibitoren bei den Th2-Zellen zu einer Reduktion der IL-4-Produktion führen und dadurch gegebenenfalls die Stimulation des axonalen Auswachsens inhibiert würde. Dazu wurden $4,8 \times 10^6$ CD4⁺-Th2-Zellen in 1200 μ l Medium mit den Inhibitoren K252a (200 nM), LY294002 (100 μ M) und U10126 (100 μ M) inkubiert und die Menge an IL-4 im Überstand nach 24h im ELISA gemessen. Als Kontrolle wurden unbehandelte Th2-Zellen bzw. mit DMSO inkubierte Th2-Zellen verwendet.

Tabelle: 3.5 IL-4 Expression (pg/ml) von Th2-Zellen nach 24 h in Gegenwart von Kinase-Inhibitoren

Gruppe	IL-4 (pg/ml)
Kontrolle	53
DMSO	54
K252a (200 nM)	69
LY294002 (100 μ M)	48
U10126 (100 μ M)	53

Wie die Tabelle 3.5 zeigt, gibt es zwischen den einzelnen Gruppen keine Unterschiede in der Menge an produzierten IL-4. Verglichen mit der unbehandelten Kontrolle verursachen weder das DMSO noch die drei Inhibitoren eine signifikante Änderung der IL-4-Konzentration im Überstand von kultivierten Th2-Zellen.



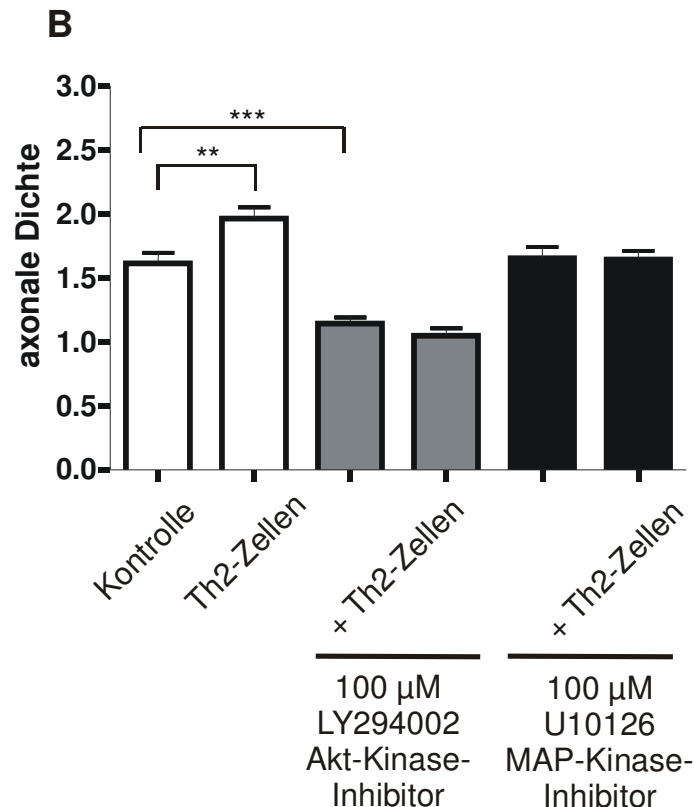


Abb. 3.5.3: Einfluss von Th2-Zellen auf das axonale Auswachsen von entorhinalen Kortex-Schnittkulturen in Abhängigkeit von Akt- und MAP-Kinase

CD4⁺-Th2-Zellen wurden mit organotypischen entorhinalen Kortex-Schnittkulturen kultiviert. Als Kontrolle dienten Schnittkulturen, die ohne T-Zellen kultiviert wurden. Die Abbildung zeigt den Mittelwert mit/ohne Standardfehler des Mittelwertes von drei unabhängigen Experimenten.

A) DMSO wurde in den Konzentrationen 200 nM, 1 µM und 100 µM dem Zellkulturmedium zugesetzt.

Alle Gruppen n= 48

B) Die Inhibitoren LY294002 bzw. U10126 wurden in einer Konzentration von jeweils 100 µM in das Zellkulturmedium gemischt. In der Kontrollgruppe wurde eine korrespondierende Menge an DMSO verwendet.

Alle Gruppen n=48; * = p < 0,05; ** = p < 0,01; *** = p < 0,005

In der Abbildung 3.5.3_A ist ein Vorversuch dargestellt, um zu überprüfen, ob das zelltoxische DMSO in Konzentrationen von 200 nM bis 100 µM einen negativen Einfluss auf das spontane Auswachsen hat und/oder den stimulierenden Effekt der Th2-Zellen auf das axonale Auswachsen beeinflusst. In allen verwendeten Konzentrationen war sowohl das spontane Auswachsen als auch der stimulierende Effekt der Th2-Zellen sichtbar.

Mit diesen beiden Voruntersuchungen war gewährleistet, dass die Akt-Kinase- bzw. MAP-Kinase-Inhibitoren jeweils in einer Konzentration von 100 µM in das Medium

der Ansätze gemischt werden konnten. Verglichen wurden die jeweiligen Ansätze mit dem Akt-Kinase- bzw. MAP-Kinase-Inhibitor gegen Ansätze in denen nur das Lösungsmittel DMSO beigemischt wurde. Auf eine weitere Kontrollgruppe von Schnittkulturen ohne DMSO wurde aufgrund der Voruntersuchungen verzichtet. Die Abbildung 3.5.3_B zeigt, dass die verwendeten Th2-Zellen in der Gegenwart von DMSO in der Lage waren, das axonale Auswachsen zu stimulieren. In der Anwesenheit des Akt- und MAP-Kinase- Inhibitoren waren die Th2-Zellen nicht in der Lage, das axonale Auswachsen der Schnittkulturen zu stimulieren. Der Inhibitor der Akt-Kinase zeigte außerdem eine signifikante Inhibierung des spontanen Auswachsens der Schnittkulturen, was auch durch Th2-Zellen nicht aufgehoben werden konnte.

Zusammengefasst konnte bisher gezeigt werden, dass Th2-Zellen durch IL-4 das axonale Auswachsen in den Kollagen-Schnittkulturen stimulieren, und dass dazu der Akt- und MAP-Kinase-Signalweg des IL-4-Rezeptors aktiviert werden muss.

3.6 Th2-Zellen stimulieren das Einwachsen von Axonen

In den bisherigen Experimenten wurde untersucht, welchen Einfluss Th2-Zellen durch das produzierte IL-4 auf axonales Auswachsen haben. Dabei sind die untersuchten Axone aus dem entorhinalen Kortex-Schnittkultur in eine Kollagenmatrix eingewandert, haben aber nie eine so genannte Zielzelle erreicht. Das organotypische entorhinal-hippocampale Modell, von Bernd Heimrich entwickelt, ist eine Verbesserung. In diesem Modell wird eine entorhinaler Kortex-Schnittkultur mit einer hippocampalen Schnittkultur zusammen in natürlicher Anordnung kultiviert. Dabei wird der entorhinale Anteil von einer EGFP-homozygoten Maus gewonnen und der hippocampale Anteil von einem Wildtyp-Tier aus demselben Wurf gewonnen. Alle Zellen aus dem entorhinalen Kortex sind EGFP-markiert und wachsen in die natürliche Formation des nicht-fluoreszierenden Hippocampus ein. Nach 2 Tagen in Kultur war es möglich, die Menge an neu eingewachsenen fluoreszierenden Fasern durch Messung der durchschnittlichen Fluoreszenz im Hippocampus in vergleichbar großen Arealen zu bestimmen. Um die Ergebnisse der Kollagen-Experimente in diesem Modell zu reproduzieren, wurden drei Schlüsselexperimente herangezogen. Es wurde untersucht, ob Th2-Zellen, IL-4-J558-Zellen oder auch rekombinantes IL-4 das Einwachsen signifikant stimulieren können. Da in diesem Modell die Schnitte auf einer Membran kultiviert wurden, mussten die Zellen und das rekombinante Protein

in das Medium unterhalb der Schnitte angeordnet werden. Die Anzahl der T-Zellen und J558-Zellen wurde von den 120000 Zellen je Kollagentropfen pro Schnitt auf die 1200 μ l Medium unter der Membran hochgerechnet. Es wurden $4,8 \times 10^6$ Th1- und Th2-Zellen verwendet pro Membran in einem 6-Well.

In der Abbildung 3.6 sind die Ergebnisse dieser Experimente dargestellt. Wie die Abbildung 3.6_A zeigt, hatten die Th1-Zellen keinen Einfluss auf das Einwachsen, von EGFP-positiven Axonen aus dem entorhinalen Kortex in den Wildtyp-Hippocampus. Dahingegen bewirkte die Kokultivierung der EGFP-Schnittkulturen mit Th2-Zellen, dass im Vergleich zu den Schnittkulturen aus der Kontrollgruppe, signifikant mehr Axone einwachsen. In Abbildung 3.6_C ist ein exemplarisches Foto einer EGFP-Schnittkultur mit eingezeichnetem Gyrus dentatus nach 2 Tagen in Kultur dargestellt. Wie auch bei den Schnittkulturen in den Experimenten, war der Tractus perforans deutlich sichtbar, wenn sich Th2-Zellen in der Kultur gefunden (siehe Abbildung 3.6_E). Im Vergleich dazu war der Tractus perforans weniger stark sichtbar in unbehandelten Schnittkulturen (siehe Abbildung 3.6_D).

Die Kultivierung der EGFP-Schnittkulturen mit rekombinanten IL-4 und IFN- γ führte zu folgenden Ergebnissen. Bei der Kultivierung der Schnittkulturen mit rekombinanten IL-4, hatte die im Kollagen-Modell verwendete Konzentration von 5 pg/ml, kein Effekt auf das Einwachsen der Axone (Ergebnis nicht gezeigt). Deshalb wurde eine Konzentrationsreihe durchgeführt, wobei sich feststellen ließ, dass eine Konzentration von 500 ng/ml einen stimulierenden Effekt hatte. Wie in Abbildung 3.6_B dargestellt, konnte nach 2 Tagen in Kultur eine deutlich gesteigerte durchschnittliche Fluoreszenz-Intensität gemessen werden. Auch nach IL-4 Inkubation ließ sich ein deutlich sichtbarer Tractus perforans nachweisen (siehe Abbildung 3.6_F). Dahingegen hatte IFN- γ keinen solchen Effekt (siehe Abbildung 3.6_B).

Das Experiment mit den J558-Zellen konnte nicht ausgewertet werden, da die Schnittkulturen nach 2 Tagen in Kokultur mit den Plasmozytomzellen alle abgestorben waren.

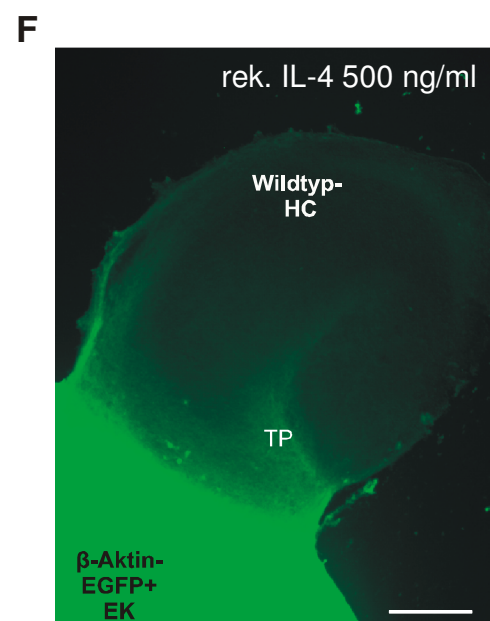
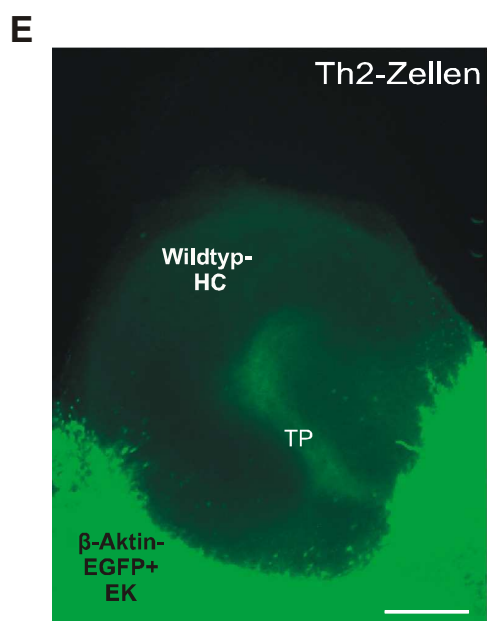
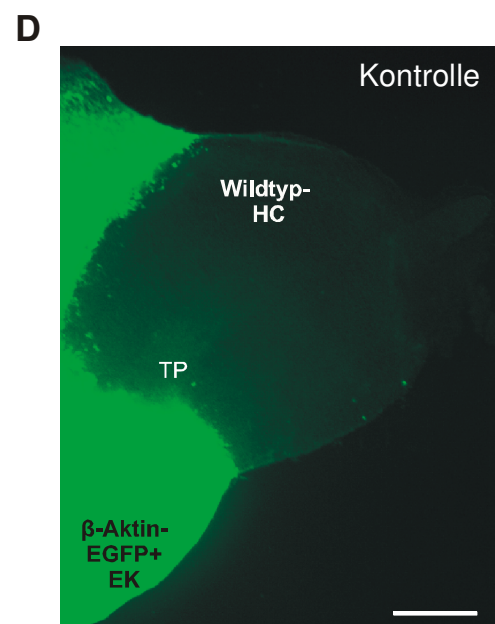
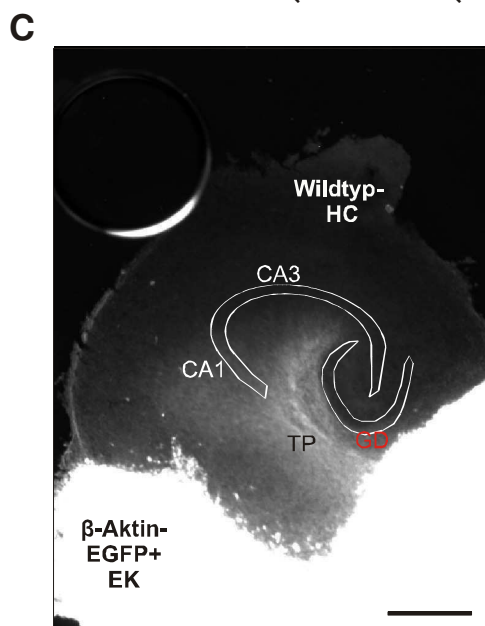
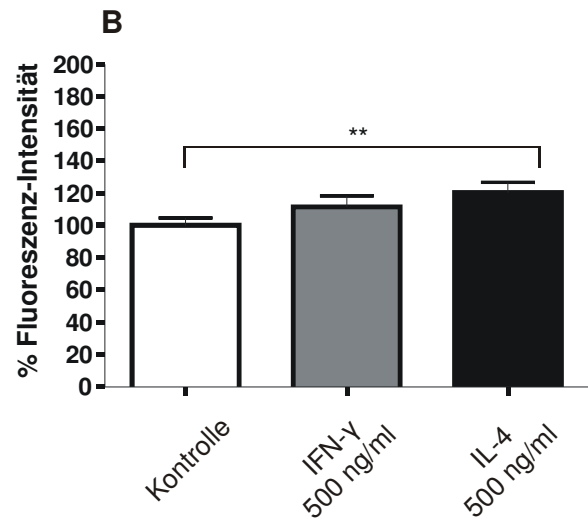
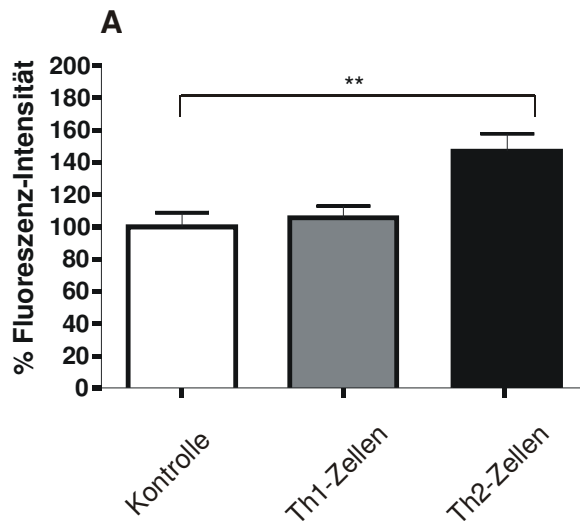


Abb. 3.6: Einfluss von Th2-Zellen und rekombinanten IL-4 auf das Einwachsen in organotypischen entorhinal-hippocampalen Schnittkulturen

A+B) Es wurden EGFP-Schnittkulturen $4,8 \times 10^6$ Th1-Zellen (n= 13) und Th2-Zellen (n= 13) bzw. rekombinant hergestelltes IFN- γ (n= 15) und IL-4 (n= 14) kultiviert. Als Kontrolle dienten Schnittkulturen, die ohne T-Zellen (n= 14) bzw. ohne rekombinantes Protein (n= 15) kultiviert wurden. Für die Auswertung wurden die Schnittkulturen fotodokumentiert und mittels einer Fotosoftware (MetaMorph) analysiert, indem die durchschnittliche Fluoreszenz-Intensität im Hippocampus gemessen wurde. Die Abbildungen A+B zeigen jeweils den Mittelwert mit/ohne Standardfehler des Mittelwertes von drei unabhängigen Experimenten.

** = $p < 0,01$;

C) Foto einer organotypisch entorhinal-hippocampalen Schnittkultur mit eingezeichneter Hippocampus-Formation bestehend aus Gyrus dentatus (GD) und den Regionen 1 und 3 des Cornu ammonis (CA). Die Zellen des Tractus perforans (TP) haben ihren Sitz in dem β -Aktin-EGFP-positiven entorhinalen Kortex (EK) und innervieren den Wildtyp-Hippocampus (HC).

D) Foto einer organotypischen entorhinal-hippocampalen Schnittkultur aus der Kontrollgruppe

E) Foto einer organotypischen entorhinal-hippocampalen Schnittkultur mit Th2-Zellen kokultiviert

F) Foto einer organotypischen entorhinal-hippocampalen Schnittkultur die mit 500 ng/ml rekombinanten IL-4 behandelt wurde

Größenstandard= 100 μ m

3.7 Zusammenhang zwischen der Th2-Zellen vermittelten Stimulation der axonalen Regeneration und Neurotrophin-Rezeptoren

In der Arbeit von Stephanie Sallach (2006) wurden mehrere Experimente durchgeführt die mittels blockierenden Antikörpern eine Beteiligung der Neurotrophine an der durch Th2-Zellen vermittelten Stimulation des axonalen Auswachsens zeigten. Zunächst wurde untersucht, ob die Th2-Zellen zu einer Hochregulation der Rezeptoren Trk-A,-B, -C und p75 führen und somit die Zellen in den entorhinalen Kortex-Schnittkulturen empfänglicher für die entsprechenden Neurotrophine würden. Dazu wurden Schnittkulturen mit Th2-Zellen kokultiviert und nach 3h, 6h und 48h eine Analyse der Expression der Rezeptoren im Verhältnis zum House-Keeping-Gen β -Aktin mittels Taqman Real-Time PCR durchgeführt.

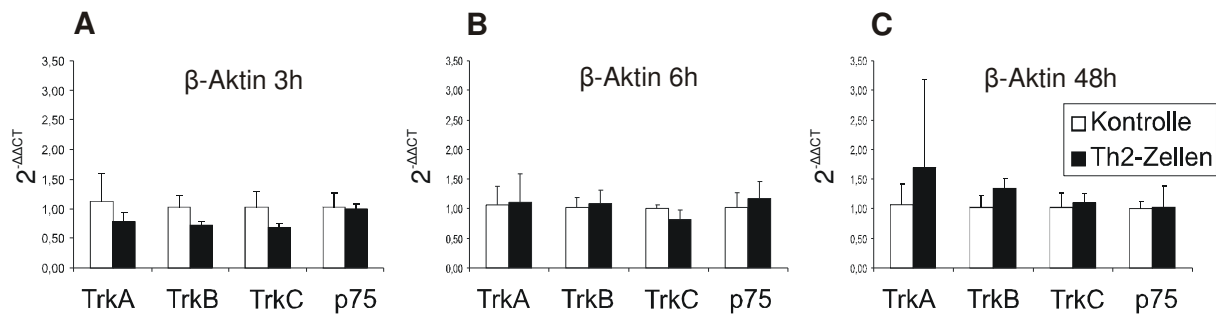


Abb. 3.7: Real-Time quantitative PCR-Analyse der Expression von Trk A-C und p75 in Schnittkulturen nach Kokultivierung mit Th2-Zellen

Es wurden organotypische entorhinal-hippocampale Schnittkulturen von 2 Tage alten Balb/C Mäusen auf einer semipermeablen Filtermembran kultiviert. Unterhalb der Membran befanden sich $4,8 \times 10^6$ ConA stimulierte CD4⁺ Th2-Zellen bzw. keine Zellen in der Kontrollgruppe. Nach einer Inkubation von 3h (Abbildung A), 6h (Abbildung B) und 48h (Abbildung C) wurden die Schnittkulturen abgenommen und die gesamt-RNA extrahiert. Nach der Umschreibung in cDNA wurde eine Real-Time quantitative PCR für Trk-A, Trk-B, Trk-C und p75 durchgeführt und auf das House-Keeping-Gen β -Aktin bezogen. Die Abbildung zeigt den Mittelwert mit/ohne Standardfehler des Mittelwertes von drei unabhängigen Experimenten

Wie in Abbildung 3.7 dargestellt, ist keiner der Rezeptoren nach Kokultivierung mit Th2-Zellen an einem der untersuchten Zeitpunkte erhöht. Nachdem keine Regulation bezüglich der Rezeptormenge festgestellt werden konnte, wurde die Abhängigkeit bezüglich des Trk-Rezeptor induzierten intrazellulären Signalweges untersucht. K252a ist in nM Konzentrationen ein spezifischer Inhibitor der Trk-Kinase-Aktivität. Wie bereits in Abbildung 3.5 gezeigt werden konnte, ist diese Konzentration in dem verwendeten Protein-Assay ausreichend für eine effektive Inhibition. Es wurden drei verschiedene Konzentrationen von K252a (200 nM, 800 nM und 5 μ M) gewählt, um die Trk-Rezeptoren zu blockieren.

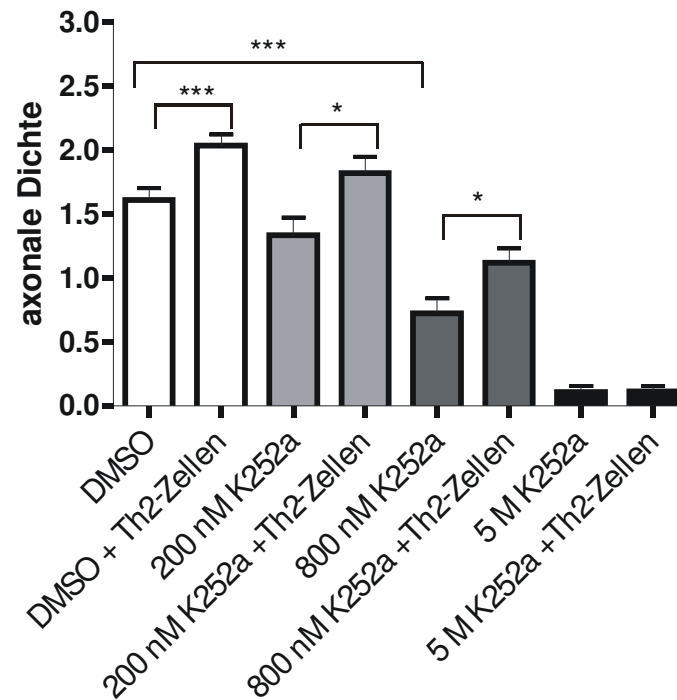


Abb. 3.7.2: Einfluss von Trk-Rezeptoren auf die von Th2-Zellen vermittelte Stimulation des axonalen Auswachsens in Schnittkulturen

CD4⁺-Th2-Zellen wurden mit organotypischen entorhinalen Kortex-Schnittkulturen kultiviert. Als Kontrolle dienten Schnittkulturen, die ohne T-Zellen kultiviert wurden. Es wurden drei verschiedene Konzentrationen (200 nM, 800 nM und 5 µM) des Trk-Inhibitors K252a in das Zellkulturmedium gemischt. DMSO diente als Kontrolle. Die Abbildung zeigt den Mittelwert mit/ohne Standardfehler des Mittelwertes von drei unabhängigen Experimenten.

Anzahl der Schnittkulturen in den ausgewerteten Gruppen:

DMSO n= 73, DMSO + Th2 n= 75, 200 nM K252a n= 33, 200 nM K252a + Th2 n= 33, 800 nM K252a n= 42, 800 nM K252a + Th2 n= 45, 5 µM K252a n= 27, 5 µM K252a + Th2 n= 30

* = p < 0,05; *** = p < 0,005

Wie in Abbildung 3.7.2 zu sehen führt eine Zunahme der K252a-Konzentration zu einem verminderten spontanen Auswachsen der Schnittkulturen. Bei Konzentrationen von 200 nM und 800 nM konnte weiterhin eine Steigerung des axonalen Auswachsens durch Th2-Zellen beobachtet werden, erreichte aber nicht das Auswachsenniveau der DMSO-Kontrollgruppe. Erst bei einer Konzentration von 5 µM, bei der das Auswachsen fast völlig inhibiert wird, ist auch eine Stimulation durch Th2-Zellen nicht mehr möglich. Im EGFP-Modell, welches zur Untersuchung des axonalen Einwachsens diente, konnte eine Konzentration von 200 nM K252a ebenfalls den Th2 Effekt nicht aufheben, auch wenn durch das K252a insgesamt ein etwas niedrigeres Auswachsenniveau festzustellen war (siehe Abbildung 3.7.3). Höhere

Konzentrationen an K252a konnten nicht verwendet werden, da es zum Absterben der Schnittkulturen führte.

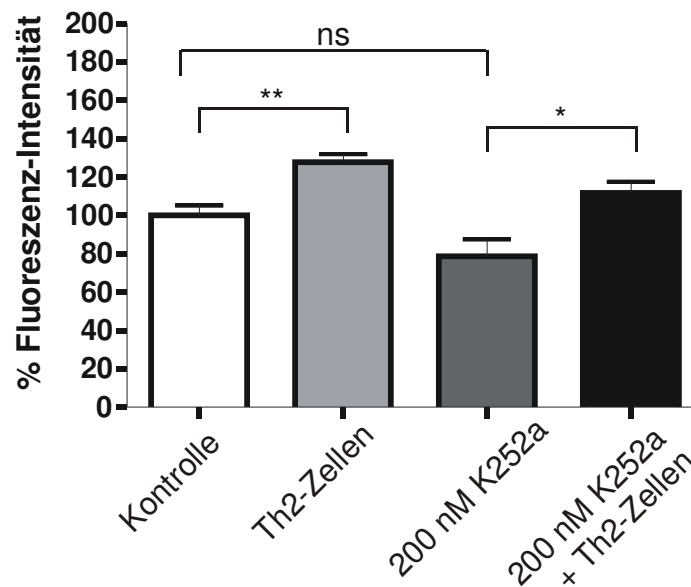


Abb. 3.7.3: Einfluss von Trk-Rezeptoren auf die von Th2-Zellen vermittelte Stimulation des axonalen Einwachsens in Schnittkulturen

Es wurden EGFP-Schnittkulturen mit $4,8 \times 10^6$ Th2-Zellen kultiviert. Zusätzlich wurde entweder DMSO (n= 12) oder 200 mM des Trk-Inhibitors K252a (n= 8) in das Zellkulturmedium gemischt. Als Kontrolle dienen Schnittkulturen ohne Th2-Zellen mit DMSO (n= 10) oder K252a (n= 5). Für die Auswertung wurden die Schnittkulturen fotodokumentiert und mittels einer Bildanalyse-Software (MetaMorph) analysiert, indem die durchschnittliche Fluoreszenzintensität im Hippocampus gemessen wurde. Die Abbildung zeigt den Mittelwert mit/ohne Standardfehler des Mittelwertes von drei unabhängigen Experimenten.

* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; ns= nicht signifikant

Um zu untersuchen, ob die einzelnen Trk-Rezeptoren einen Einfluss auf die IL-4-vermittelte axonale Stimulation des Auswachsens haben, wurden Schnittkulturen von Trk-Rezeptor-defizienten Mäusen verwendet. Die Trk-B-defizienten Mäuse sind bis zu 24h nach Geburt lebensfähig und sterben dann jedoch ab. Trk-A- oder Trk-C-defiziente Tiere werden erst gar nicht geboren, so dass diese für die Kollagen-Experimente nicht genutzt werden konnten. Lediglich die Trk-B-defizienten Mäuse konnten am Tag P0 für diese Experimente genutzt werden. Durch den Einschluss der Th2-Zellen in einen gesonderten Kollagentropfen wurde ein direkter Zell-Zell-Kontakt verhindert, so dass auch Zellen und Schnittkulturen zwei verschiedener Stämme miteinander kultiviert werden konnten (mündliche Mitteilung Herr Prof. Hans-Dieter Volk, Institut für Medizinische Immunologie, Charité). Die Trk-B-defiziente Mauslinie

hat den C57BL/6-Hintergrundstamm. Aus Voruntersuchungen war bekannt, dass sich C57BL/6-Lymphozyten nur unzureichend in den Th2-Phänotyp polarisieren lassen, weshalb in diesem Experiment auf Wildtyp-Balb/C-Lymphozyten zurückgegriffen wurde. Da sich die Wildtyp-Schnittkulturen und die Trk-B-defizienten-Schnittkulturen aus einem Wurf rekrutieren sollten, mussten jeweils zwei Eltern verpaart werden, die nur ein ausgeschaltetes Allel für den Trk-B-Rezeptor besaßen. Das hatte zu Folge, dass in einem Wurf die drei genetischen Möglichkeiten Wildtyp sowie heterozygot und homozygot defizient für den Trk-B-Rezeptor vorkommen konnten. Es wurden immer alle Tiere eines Wurfs in das Experiment genommen und pro Tier die eine Hälfte der Schnittkulturen ohne und die andere Hälfte mit Th2-Zellen kultiviert. Die Tiere wurden erst nachträglich mittels PCR charakterisiert und den drei jeweiligen genetischen Gruppen zugeordnet. Wie man in Abbildung 3.7.4 sehen kann, ist die Anwesenheit eines funktionsfähigen Trk-B-Rezeptors nicht notwendig, damit die Th2-Zellen in der Lage waren das axonale Auswachsen zu stimulieren. Für die anderen beiden Rezeptoren konnte aus bereits beschriebenen Gründen dazu keine Aussage gemacht werden.

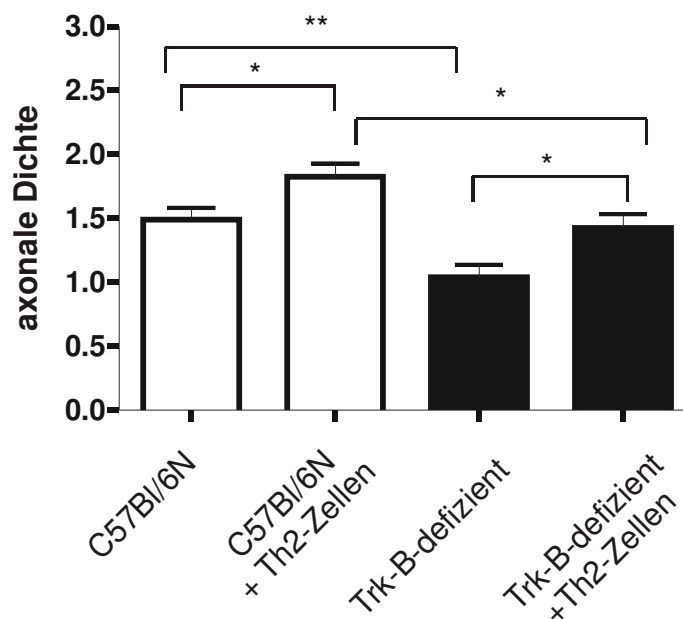


Abb. 3.7.4: Einfluss des Trk-B-Rezeptors auf die von Th2-Zellen vermittelte Stimulation des axonalen Auswachsens von entorhinalen Kortex-Schnittkulturen

CD4⁺-Th2-Zellen wurden mit organotypischen entorhinalen Kortex-Schnittkulturen von neugeborenen Wildtyp-C57Bl/6N (n= 51) bzw. Trk-B Rezeptor defizienten Tieren (n= 41) kultiviert. Als Kontrolle dienten Schnittkulturen von Wildtyp-C57Bl/6 (n= 47) bzw. Trk-B-Rezeptor-defizienten-Tieren (n= 40), die ohne T-Zellen kultiviert wurden. Die Abbildung zeigt den Mittelwert mit/ohne Standardfehler des Mittelwertes von drei unabhängigen Experimenten. * = p < 0,05; ** = p < 0,01

3.8 IL-4-produzierende Zellen stimulieren die Axon-Regeneration *in vivo*

Die bisherigen *in vitro* Experimente konnten eine Stimulierung von Th2-Zellen auf das axonale Aus- bzw. Einwachsen durch IL-4 zeigen. Im Folgenden sollte ein möglicher Einsatz *in vivo* untersucht werden. Als wichtigstes Kriterium an ein *in vivo* Modell wurde die Möglichkeit, einer quantitativen Bestimmung der Regeneration, gestellt. Dafür ist das Rückenmarkläsionsmodell sehr gut geeignet.

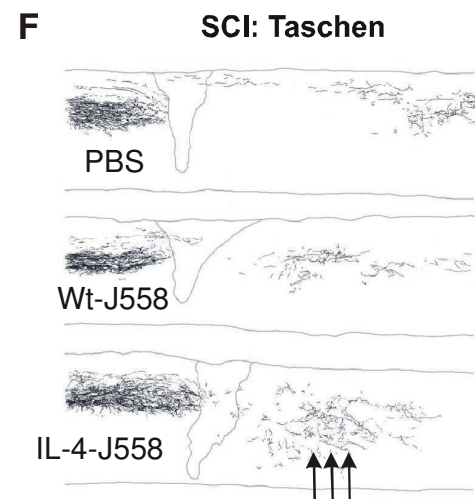
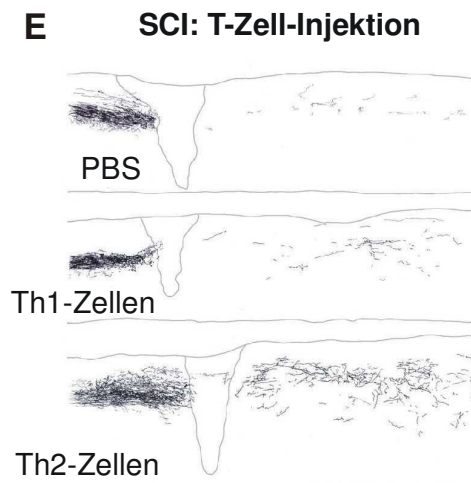
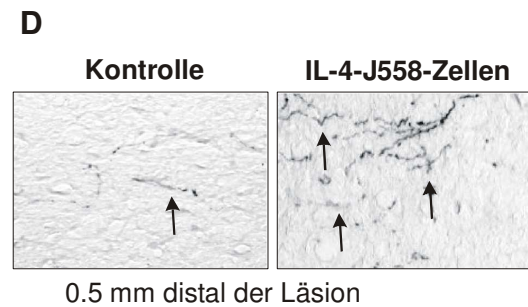
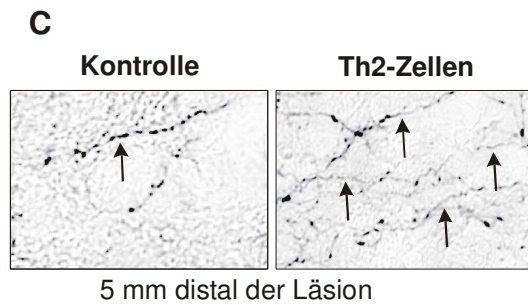
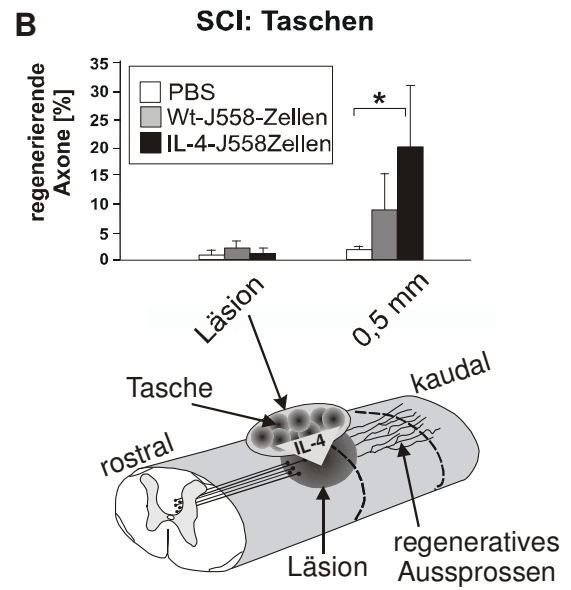
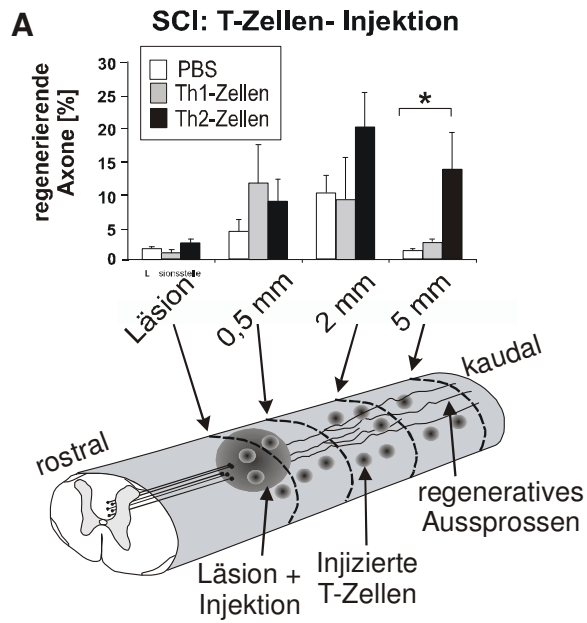
Es wurde eine Laminektomie durchgeführt, damit das Rückenmark der Maus direkt zugänglich war. Die Kontusionsläsion wurde mit einem dafür umgebauten Newton-Meter durchgeführt, indem ein gleichmäßiger Druck auf der dorsalen Seite des Rückenmarks von 10 cN ausgeübt wurde. Für diese Arbeit wurden zwei unterschiedliche experimentelle Ansätze durchgeführt. Im ersten Ansatz wurden den Testtieren Th1-Zellen bzw. Th2-Zellen direkt in das Rückenmark injiziert und den Kontrolltieren PBS. Im zweiten Ansatz wurden Wildtyp-J558-Zellen bzw. IL-4-J558-Zellen in einer Tasche aus einer semipermeablen Membran gefüllt und auf die Läsion der Testtiere gelegt. In die Taschen der Kontrolltiere wurde PBS gefüllt. In beiden Ansätzen wurde gleichzeitig ein BDA-Tracer in den Motor Kortex gespritzt. Nachdem die Tiere 14 Tage überlebt hatten, wurde das Rückenmark entnommen, fixiert, am Kryostaten geschnitten und der BDA-Tracer mit einer DAB-Färbung entwickelt.

Anschließend konnten diejenigen Axone bestimmt werden, die ein regeneratives Aussprossen zeigten. Die Quantifizierung erfolgte in den Läsionsstellen sowie 0,5 μm , 2 μm und 5 μm kaudal der Läsionen. Die Anzahl der ausgezählten Axone wurde anschließend auf die Anzahl der Axone auf Höhe von Th4 (= 100 %) normalisiert (siehe 2.2.4.3). Für alle Experimente zusammen wurde ein Mittelwert je Rückenmark von 365 ± 178 Axone auf Höhe Th4 gezählt. In der Abb. 3.8 sind die Ergebnisse dieser Versuche zusammengefasst.

In der Auswertung der Experimente mit den injizierten T-Zellen (siehe Abb. 3.8_A) zeigt sich, dass innerhalb der Läsionsstelle nur wenige markierte Axone gezählt werden konnten. Als Ergebnis ließ sich feststellen, dass in allen drei Gruppen 0,5 mm kaudal der Läsion regenerierende Axone gezählt werden konnten. In den beiden Testgruppen konnten mehr Axone gezählt werden als in der Kontrollgruppe, jedoch erreichten die Unterschiede keine statistische Signifikanz. Besonders viele Axone konnten in allen drei Gruppen 2 mm kaudal der Läsion gezählt werden, wobei die Tiere in der Th2-Gruppe die meisten regenerierenden Axone hatten. In allen drei Gruppen war die Streuung der Ergebnisse relativ hoch, so dass es zu keinen

signifikanten Unterschieden kam. Wie die Abb. 3.8_A zeigt, gab es weder bei den Kontrolltieren noch in der Testgruppe mit den Th1-Zellen eine hohe Anzahl von regenerierenden Axonen 5 mm kaudal der Läsion. Die Mäuse mit den injizierten Th2-Zellen zeigten hingegen eine sehr hohe Anzahl von regenerierenden Axone, die bis 5 mm kaudal der Läsion gewachsen waren. Verglichen mit den Kontrolltieren war eine Steigerung von über 12 % zu verzeichnen, die in diesem Fall eine statistische Signifikanz ($p < 0,05$) aufwies. In den Fotos 3.8_C wird deutlich, dass die Injektion von Th2-Zellen in die Läsion dazu führte, dass diese Tiere 5 mm kaudal der Läsion mehr regenerierende Axone hatten als die Kontrolltiere mit der PBS-Injektion. Ebenfalls deutlich wird dieses Ergebnis mittels der Camera-Lucida-Rekonstruktionen von exemplarischen Rückenmärgen aus jeder Gruppe. Die Abb. 3.8_E zeigt, dass Th2-Zellen zu einer gesteigerten Anzahl von Axonen kaudal der Läsion führte, und der Unterschied umso deutlicher wurde desto weiter von der Läsion entfernt ausgewertet wurde.

Die Abb. 3.8_B zeigt die Ergebnisse der zweiten Versuchsreihe, in der Zellen in einer Tasche auf die Läsion gelegt wurden. Auch bei diesen Experimenten konnten innerhalb der Läsion nur wenige vereinzelte Axone in allen drei Gruppen gezählt werden. Das Auszählen der regenerierenden Axone ergab folgende Ergebnisse. Unmittelbar 0,5 mm hinter der Läsion konnten bei den Kontrolltieren nur einzelne Axone gezählt werden, was sich auch durch den Einsatz von Wildtyp-J558-Zellen nicht deutlich gesteigert wurde. Dahingegen führten die IL-4-J558-Zellen dazu, dass 0,5 mm hinter der Läsion fast 18 % mehr regenerierende Axone gezählt werden konnten als bei den Kontrolltieren. Diese signifikante Steigerung ($p < 0,05$) war jedoch nur auf diesen unmittelbar, hinter der Läsion gelegenen Bereich, begrenzt. In den beiden ebenfalls ausgewerteten Bereichen 2 und 5 mm kaudal der Läsion konnte kein Unterschied in der Anzahl der Axone zu den Kontrolltieren festgestellt werden (Ergebnis nicht gezeigt). Die Wildtyp-J558-Zellen hatten ebenfalls keinen Einfluss auf die Anzahl der Axone. Auch für diese Experimente wurden exemplarisch Fotos gemacht werden, die den Unterschied zwischen den beiden Gruppen dokumentieren (siehe Abb. 3.8_D). Des Weiteren wurde der Unterschied besonders bei den Camera-Lucida-Rekonstruktionen deutlich, die viele Axone nach dem Läsionsbereich, für die Versuchsgruppe mit den IL-4-J558-Zellen, dokumentierte (siehe Abb. 3.8_F).



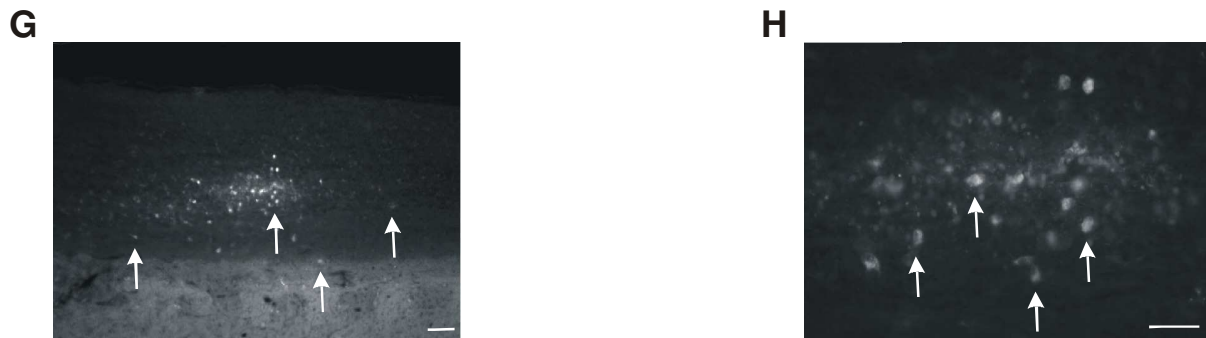


Abb. 3.8: IL-4-produzierende Zellen unterstützen die axonale Regeneration nach einer Rückenmarkläsion *in vivo*

A) Bei 8 Wochen alten Balb/C-Mäusen wurde eine Kompressionsläsion durchgeführt. In die Läsion wurden 1×10^5 Th1-Zellen (n= 7), Th2-Zellen (n= 9) bzw. PBS (n= 10) als Kontrolle gespritzt. Regenerierende Axone wurden in der Läsionsstelle sowie 0,5 mm, 2 mm und 5 mm kaudal der Läsion gezählt und auf die Anzahl der Axone in Höhe Th4 normalisiert. Die Abbildung zeigt den Mittelwert mit/ohne Standardfehler des Mittelwertes von zwei unabhängigen Experimenten.

B) Bei 8 Wochen alten Balb/C Mäusen wurde eine Kompressionsläsion durchgeführt. Auf die Läsion wurden semipermeable Taschen mit Wildtyp Plasmazytomzellen (n= 8), IL-4 produzierenden Plasmazytomzellen (n= 9) bzw. PBS (n= 10) als Kontrolle gelegt. Regenerierende Axone wurden in der Läsionsstelle sowie 0,5 mm, 2 mm und 5 mm kaudal der Läsion gezählt und auf die Anzahl der Axone in Höhe Th4 normalisiert. Die Abbildung zeigt den Mittelwert mit/ohne Standardfehler des Mittelwertes von zwei unabhängigen Experimenten.

C) Foto von markierten Fasern 5 mm distal der Läsion von PBS bzw. Th2-Zellen injizierten Tieren. Größenstandard = 50 μ m; Pfeile markieren Fasern

D) Foto von markierten Fasern 0,5 mm distal der Läsion von Tieren aus der Kontrollgruppe bzw. mit IL-4-J558-Zellen.

Größenstandard = 50 μ m; Pfeile markieren Fasern

E) Camera-Lucida-Rekonstruktionen eines exemplarischen Rückenmarks aus jeder Gruppe

F) Camera-Lucida-Rekonstruktionen eines exemplarischen Rückenmarks aus jeder Gruppe

G) Intraläsional injizierte CFSE-markierte Th2-Zellen am Tag 6 nach Läsion. Größenstandard = 50 μ m; Pfeile markieren CFSE-markierte Th2-Zellen

H) Vergrößerung von Abbildung 3.10_G. Größenstandard = 50 μ m; Pfeile markieren CFSE-markierte Th2-Zellen

Die injizierten Th2-Zellen konnten eine signifikante Steigerung des Auswachsens von mechanisch verletzten CST-Axonon über einen relativ großen Abstand von 5 mm hinter der Läsion vermitteln. Demgegenüber konnten die IL-4-J558-Zellen eine solche Steigerung nur für den Bereich, unmittelbar 0,5 mm hinter der Läsion, bewirken. Dieser Bereich befand sich unmittelbar unterhalb der Tasche mit den darin eingeschlossenen Zellen.

Um zu untersuchen, wie sich die Th2-Zellen nach der Injektion in die Läsion verhalten, wurden CFSE-markierte Th2-Zellen verwendet. Diese Zellen wurden ebenfalls in das Rückenmark von Mäusen gespritzt, die am Tag 1, 2, 4, 6, 10 und 14 nach der Operation untersucht wurden. Dazu wurde allen Tieren das Rückenmark entnommen und kryogeschritten, bevor sie mit einem Fluoreszenzmikroskop analysiert wurden. Bis zum Tag 6 nach Operation und Injektion konnten CFSE-markierte Th2-Zellen im Rückenmark gefunden werden wie die Abb. 3.8_E+H zeigen. Die Zellen waren zum Teil noch in der Läsion aber auch kaudal der Läsion in den regenerativen Arealen zu finden. Diese regenerativen Areale waren bis zu 5 mm hinter der Läsion lokalisiert.

Somit konnte gezeigt werden, dass IL-4-produzierende Zellen nicht nur *in vitro*, sondern auch in einem erheblichen Umfang *in vivo*, an der axonalen Regeneration von mechanisch verletzten Axonen beteiligt sind.

4 Diskussion

4.1 Th2-Zellen stimulieren das axonale Auswachsen

Welchen Einfluss Immunzellen nach einer mechanischen Verletzung im ZNS haben, ist Gegenstand intensiver Forschung [138, 251, 252], wobei es zum Teil kontroverse Ergebnisse bezüglich der Rolle von T-Lymphozyten gibt. Es gibt einerseits Ergebnisse, die zeigen, dass T-Lymphozyten einen negativen Einfluss haben und vor allem an einer sekundären Schädigung des Gewebes beteiligt sind [253]. Auf der anderen Seite gibt es wiederum auch Ergebnisse, die zeigen, dass T-Lymphozyten durchaus einen förderlichen Charakter auf eine Regeneration im ZNS haben können [136, 254]. Die meisten dieser Ergebnisse basierten auf Untersuchungen, bei denen der Einfluss von infiltrierenden Zellen nach einer mechanischen Läsion beobachtet wurde [136, 189, 190, 195]. Ergebnisse aus der eigenen Arbeitsgruppe zeigten, dass T-Lymphozyten einen unterschiedlichen Effekt im Zusammenhang mit Neuroprotektion haben können. Dabei war entscheidend, ob es einen Zell-Zell-Kontakt zwischen den Lymphozyten und den neuronalen Zellen gab oder ob der Kontakt über sezernierte Faktoren vermittelt wurde. Während die Lymphozyten bei einem Zell-Zell-Kontakt nicht in der Lage waren, das neuronale Überleben zu unterstützen, hatten Lymphozyten ohne direkten Kontakt zu den neuronalen Zellen, eine protektive Wirkung gegenüber einer NMDA-Schädigung [206]. Zusätzlich konnte festgestellt werden, dass die beiden bekanntesten Subpopulationen der T-Lymphozyten die Th1- und die Th2-Zellen unterschiedliche Effekte vermittelten [206, 208]. Die Th1-Zellen sind durch eine Produktion von hohen Mengen an IFN- γ gekennzeichnet, während die Th2-Zellen besonders viel IL-4 produzieren [9]. In der Arbeit von Wolf et. al. 2002 wurde erstmals gezeigt, dass die Th2-Zellen ein deutlich höheres Potential hatten, die neuronalen Zellen in dem verwendeten organotypischen entorhinal-hippocampalen Schnittkulturenmodell vor einer NMDA-Schädigung zu schützen. Dabei wurden die Schnittkulturen von den T-Zellen durch eine semipermeable Membran getrennt, so dass es zu keinem Zell-Zell-Kontakt kam. Aufgrund dieser Tatsache wurde davon ausgegangen, dass die beobachtete neuroprotektive-Wirkung der Th2-Zellen durch einen oder mehrere sezernierte Faktoren verursacht wurde. Da es sich dabei um einen Faktor handeln muss der Th2-Zellen spezifisch ist, wurde besonderes Augenmerk auf die Zytokine gerichtet.

Es ist bekannt, dass das Zytokinprofil in Abhängigkeit des T-Zellen-Subtyps grundsätzlich verschieden sein kann, wie z. B. zwischen Th1- und Th2-Zellen [1, 9]. Nach einer mechanischen Verletzung im ZNS kommt es neben der primären Schädigung, zeitlich versetzt, zu einer sekundären Schädigung von Zellen, die den primären Schaden unverletzt überlebt haben [172]. Das hat zur Folge, dass am Ende das geschädigte neuronale Gewebe im größeren Maße betroffen ist, als primär angesehen. Die Verhinderung bzw. Eindämmung der sekundären neuronalen Schädigung ist ein Ziel der neuronalen Forschung. Ein weiteres Ziel ist es, die neuronale Regeneration zu stimulieren. Das Auswachsen geschädigter Axone ist aufgrund mehrerer Mechanismen blockiert, was häufig zu einem Funktionsverlust führt [255, 256]. Nachdem für Th2-Zellen gezeigt werden konnte, dass sie ein neuroprotektives Potential besitzen, wurde die Frage aufgeworfen, ob sie möglicherweise auch eine unterstützende Wirkung auf das axonale Auswachsen haben können. Für diese Untersuchungen wurde ein bereits gut etabliertes neurobiologisches Kokulturmodell modifiziert [243]. Es wurden entorhinale Schnittkulturen von 3 Tage alten Mäusen mit unterschiedlichen primären T-Lymphozyten in einer Kollagenmatrix kokultiviert und nach 2 Tagen die in die Matrix eingewanderten Axone bezüglich ihrer Dichte ausgewertet. Die Arbeit von Dr. Stephanie Sallach 2006 [223, 257] konnte zeigen, dass die Schnittkulturen, die als Modell für einen mechanisch gesetzten Primärschaden dienten, nach 2 Tagen ein spontanes Auswachsen von Axonen zeigten. Das beobachtete, spontane axonale Auswachsen der Schnittkulturen ließ sich in der Gegenwart von aktivierten Th2-Zellen signifikant steigern. Dieser Effekt war unabhängig davon, ob die Th2-Zellen spezifisch mit MBP oder OVA oder unspezifisch mit ConA stimuliert wurden. Th1-Zellen und nicht stimulierte so genannte naive Zellen zeigten keinen förderlichen Effekt auf das Auswachsen der Schnittkulturen [223, 224]. Da auch in diesem Modell kein Zell-Zell-Kontakt möglich war, musste der Effekt durch sezernierte Faktoren vermittelt werden. Ein direkter Nachweis, welcher der möglichen Faktoren dafür verantwortlich war, konnte bisher nicht beantwortet werden.

In der vorgelegten Arbeit wurde untersucht, welcher Faktor von Th2-Zellen für die Stimulation verantwortlich ist, und ob der identifizierte Faktor auch in einem T-Zellen freien Kontext dieselbe Wirkung hat. Somit könnte ein neuer therapeutischer Ansatz zur Behandlung von mechanischen ZNS-Schäden vorgestellt werden.

Zunächst wurde überprüft, ob sich die grundlegende Aussage der Arbeit von Dr. Stephanie Sallach [223] auch auf ein leicht abgewandeltes Modell übertragen ließ. Dazu wurden die primären T-Zellen ausschließlich aus Balb/C Mäusen gewonnen, unspezifisch mit ConA aktiviert und mit Schnittkulturen von Tieren mit Balb/C-Hintergrund kokultiviert. Die Verwendung von Zellen aus Balb/C Mäusen, die mit ConA stimuliert wurden, hatte deutliche Vorteile gegenüber Zellen aus B.10 Tieren. Einerseits ließen sich diese Zellen sehr viel besser in den Subtyp der Th2-Zellen polarisieren, was sich vor allem durch eine deutlich gesteigerte Sekretion der Zytokine bemerkbar machte. Andererseits konnten dieselben unspezifisch mit ConA aktivierten Zellen direkt in das Gewebe von Mäusen mit einer Rückenmarkläsion injiziert werden. Da die Zellen unspezifisch stimuliert wurden, konnte davon ausgegangen werden, dass nur ein sehr geringer Anteil der Zellen ZNS-spezifisch war. Dadurch konnte bereits im Vorfeld die mögliche Induzierung EAE-ähnlicher Symptome bei den Mäusen reduziert werden, nachdem es bezüglich MBP-spezifischer Zellen entsprechende Berichte gab [189, 191].

Der Vergleich von naiven T-Lymphozyten, Th1- und Th2-Zellen ergab, dass auch unter diesen experimentellen Bedingungen nur Th2-Zellen in der Lage waren, das axonale Auswachsen der kokultivierten Schnittkulturen zu steigern. Die Auswertung aller Kollagen-Kokulturrexperimente erfolgte nach derselben, in unserem Labor gut standardisierten Methode. Die zellzugewandte Seite der Schnittkulturen wurde von drei unabhängigen Experimentatoren nach Verblindung bezüglich der Dichte an ausgewachsenen Axonen ausgewertet, indem die Schnittkulturen mit den Ziffern 0 für kein Auswachsen und 3 für sehr starkes Auswachsen bewertet wurden. Anschließend wurde der Mittelwert der Auswertung für jede einzelne Schnittkultur bestimmt. Alle Experimente wurden mindestens dreimal unabhängig voneinander wiederholt, um zufällige Ergebnisse auszuschließen. Diese semiquantitative Auswertung hat sich als sehr verlässlich und reproduzierbar herausgestellt. Alle vorgestellten Experimente bezüglich der Kollagen-Kokulturen wurden später wiederholt und mit einer zweiten Methode ausgewertet. Dazu entwickelte Herr Francesco Boato (Anatomie, Charité) eine Auswertung von fotodokumentierten Schnittkulturen, bei der die Dichte und die Länge der Axone bestimmt wurden. Alle in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse bezüglich der Axondichte konnten durch diese zweite Methode bestätigt werden [224, 258]. Neben der gesteigerten axonalen Dichte von Schnittkulturen, kokultiviert mit Th2-Zellen, konnte mit der zweiten

Methode auch ein gesteigertes Längenwachstum der Axone beobachtet werden [224]. Die Verwendung von Th2-Zellkulturüberständen führte zu keiner Steigerung des axonalen Wachstums im Kollagen-Auswachsassay (Ergebnis nicht gezeigt). Dabei muss jedoch beachtet werden, dass die Kultivierung der T-Zellen in dem verwendeten Inkubationsmedium für Kollagen-Schnittkulturen den T-Zellen nicht die optimalen Bedingungen lieferte, und IL-4 lediglich eine Halbwertszeit zwischen Sekunden und Minuten hat [259]. Das könnte möglicherweise zur Folge gehabt haben, dass die IL-4 Konzentration nach einer einmaligen Zugabe des rekombinanten Proteins schneller abfiel, als es mit kokultivierten Th2-Zellen der Fall war. Andererseits überlebten die Schnittkulturen nicht im Kultivierungsmedium für T-Zellen (Ergebnis nicht gezeigt), was die Durchführung der Experimente mit präkultiviertem Medium erschwerte.

In den folgenden Experimenten sollte untersucht werden, welcher der Th2-spezifischen Faktoren für das gesteigerte Auswachsen der Schnittkulturen verantwortlich war. Aufgrund der Untersuchungen des Zytokin-Expressionsprofils war bekannt, dass sich die Th2 Zellen durch eine Produktion von IL-4 und IL-13 sowie einer deutlich höheren Produktion von IL-10 und der Abwesenheit von IFN- γ von den Th1 Zellen unterscheiden. Außerdem wurde eine Analyse von Th1- und Th2-Zellen spezifischen Transkriptionsfaktoren durchgeführt. Die GATA/T-bet Ratio zeigte zusätzlich zu dem Zytokinprofil, dass es sich bei den als Th1 und Th2 bezeichneten Zellen um zwei unterschiedliche Zelltypen handelte [224]. Mit Hilfe von funktionsblockierenden Antikörpern gegen IL-4, IL-10 und IL-13 wurde deren Beteiligung am Auswachsen untersucht. Aufgrund von Vorergebnissen war bekannt, dass die Konzentration der eingesetzten Antikörper limitiert war. Die unspezifischen Isotypkontroll-Antikörper verhinderten in Konzentration größer als 500 ng/ml die Stimulation des Auswachsens von Schnittkulturen in Gegenwart von Th2-Zellen. Deshalb wurde zunächst eine Konzentrationsreihe mit verschiedenen Konzentrationen durchgeführt, um zu testen, bei welcher Konzentration an Isotypkontrollantikörper im Kollagen die Th2-Zellen noch in der Lage waren, das axonale Auswachsen der Schnittkulturen zu stimulieren. Für den IgG1-Antikörper wurde eine Konzentration von 50 ng/ml und für den IgG2-Antikörper eine Konzentration von 100 ng/ml bestimmt. Dieselben Konzentrationen wurden für die IL-Antikörper verwendet und entsprachen den Herstellerangaben, die für eine Blockierung von >95% eine Konzentration der Antikörper von 50-300 ng/ml angaben.

Die Kultivierung der Schnittkulturen in Gegenwart von IL-4-, IL-10- und IL-13-blockierenden Antikörpern führte in den Kontrollgruppen, also ohne Th2-Zellen, zu keiner Veränderung des spontanen axonalen Auswachsens. Das sprach dafür, dass das spontane Auswachsen der Schnittkulturen unanhängig von den drei Zytokinen war. Dies wird durch die Tatsache bestätigt, dass in dem Kultivierungsmedium von Schnittkulturen auch nach 3-5 Tagen kein IL-4, IL-10 und IL-13 detektiert werden konnte. Im Vergleich dazu produzierten die Zellen der Schnittkulturen jedoch sehr hohe Mengen an Neurotrophinen [223]. Von den eingesetzten Antikörpern war nur der Antikörper gegen IL-4 in der Lage, den stimulierenden Effekt, den Th2-Zellen auf das axonale Auswachsen von entorhinalen Schnittkulturen haben, zu inhibieren. Damit wurde erstmals gezeigt, dass ein Zytokin von Th2-Zellen entscheidend an der Stimulation des axonalen Auswachsens von entorhinalen Schnittkulturen beteiligt war. Bei dem identifizierten Faktor handelte es sich um IL-4. Bezüglich einer Unterscheidung der Zytokine von Th1- und Th2-Zellen ist, wie bereits beschrieben, besonders die Produktion von IL-4 auf Seite der Th2 Zellen hervorzuheben.

Die Rolle der Zytokine im Kontext von neuronalen Erkrankungen und eventuellen Therapien nach neurodegenerativen Erkrankungen wird intensiv und kontrovers in der Literatur diskutiert. Dabei scheinen mehrere Faktoren am Ausgang dieser Experimente beteiligt zu sein. Es ist z. B. entscheidend, welcher Zelltyp oder welche Konzentration an Zytokinen verwendet wurden. Außerdem war die Dauer der Inkubation mit den Zytokinen [260] bedeutend. So zeigten sowohl *in vitro* als auch *in vivo* Untersuchungen mit IL-1, dass niedrige Konzentrationen (nM-Mengen) eine neuroprotektive Wirkung und hohe Konzentrationen (μ M-Mengen) eine neurodegenerative Wirkung hatten [261, 262]. Für die Zytokine IL-4, IL-5, IL-7 und IL-8 zeigten niedrige Konzentrationen (nM/ μ M-Mengen) bei kurzer Inkubationsdauer (1-2 Tage) einen neuroprotektiven und in hohen Konzentrationen (mM-Mengen) bei langer Inkubationsdauer (7 Tage) einen neurodegenerativen Effekt [260, 263]. Die Zytokine IL-6 und IL-13 zeigten unabhängig von ihrer Konzentration bei langen Inkubationszeiten einen neurodegenerativen Effekt [260].

Die meisten bisherigen Untersuchungen bezogen sich jedoch ausschließlich auf die Frage, ob die Zytokine das neuronale Überleben fördern oder reduzieren. Die Frage ob primär geschädigte Neurone wieder auswachsen oder überlebende Zellen durch reaktives Sprouting intakter Axonendigungen zur Reinnervation geschädigten Hirngewebes beitragen können, wurde kaum beantwortet. In dieser Arbeit konnte

erstmals gezeigt werden, dass das Zytokin IL-4, welches von Th2-Zellen produziert wurde, eine entscheidende Rolle bei der Stimulation des axonalen Auswachsens hat. Anschließend wurde die Notwendigkeit von IL-4 für die gesteigerte Regeneration untersucht. Dazu wurden Plasmazytomzellen verwendet, die nach einem Gentransfer sehr viel höhere Mengen an IL-4 produzieren, als die gleiche Anzahl primärer Th2-Zellen. Da diese Zellen auch IL-10 produzierten, konnte gleichzeitig untersucht werden, ob IL-10 allein (Wildtyp-Plasmazytomzellen) oder in Kombination mit IL-4 (IL-4 Plasmazytomzellen) eine Steigerung des axonalen Auswachsens bewirken kann. Nach den vorliegenden Ergebnissen ließ sich feststellen, dass eine kontinuierliche Produktion von IL-10 (Wildtyp-Plasmazytomzellen) alleine nicht ausreichend war, um das axonale Auswachsen zu steigern. Dahingegen waren Plasmazytomzellen, die sowohl IL-10 als auch IL-4 produzierten, durchaus in der Lage, das Auswachsen zu stimulieren. Aufgrund der semiquantitativen Auswertung war die Interpretation des gesteigerten Auswachsens limitiert. So zeigte die Auswertung durch Herrn Francesco Boato, dass die IL-4-Plasmazytomzellen das axonale Auswachsen stärker beeinflussten, als es die stimulierten Th2-Zellen konnten [224].

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob IL-10 und IL-4 zusammen für den beobachteten Effekt verantwortlich sind, oder ob IL-4 dazu auch allein fähig ist. Dazu wurden Zellen von IL-10 defizienten Mäusen verwendet, die zusätzlich auch kein IL-13 produzieren, wie die ELISA-Analyse ihres Zellkulturmediums zeigte. Somit wurden Zellen verwendet, die zwar vergleichsweise hohe Mengen an IL-4, jedoch kein IL-10 oder IL-13 produzierten. Als Ergebnis ließ sich feststellen, dass T-Zellen, die nur IL-4 aber kein IL-10 oder IL-13 produzierten, in der Lage waren, das axonale Auswachsen von entorhinalen Schnittkulturen zu stimulieren. Das bedeutet, dass IL-4 unabhängig von den anderen Th2-Zytokinen IL-10 und IL-13 in der Lage ist, das axonale Auswachsen der Schnittkulturen zu steigern.

Im Gegenzug zu den bisherigen Untersuchungen sollte nun gezeigt werden, dass die Abwesenheit von IL-4 dazu führt, dass die Zellen nicht mehr in der Lage waren, das Auswachsen signifikant zu stimulieren. Aufgrund der vorliegenden Literatur war es nicht sinnvoll, T-Zellen von homozygot IL-4-defizienten Mäusen zu verwenden. Untersuchungen konnten zeigen, dass deren T-Lymphozyten wenig bis keine Th2-Zellen spezifischen Zytokine produzieren [264, 265]. Diese Zellen bildeten weder IL-4 noch IL-10 oder IL-13, wodurch eine Spezifität für IL-4 nicht mehr untersucht werden

konnte. Deshalb wurde auf ein Verfahren zurückgegriffen, bei dem die IL-4-produzierenden-Zellen in der Th2-Zellkultur mit einem MACS-bead gekoppelten Antikörper markiert und anschließend mittels Positivselektion entfernt wurden. Anschließend wurden die Zellen in frischem Medium kultiviert, um den Erfolg der Separation zu überprüfen. Im Medium ließ sich auch nach 24 h kein IL-4 nachweisen, wobei die Produktion aller weiteren untersuchten Zytokine nicht verändert wurde. Der Vergleich von IL-4-depletierten Th2-Zellen gegen unbehandelte, also IL-4-produzierende Th2-Zellen zeigte, dass nur die T-Zellen, die IL-4 produzierten, in der Lage waren, das axonale Auswachsen signifikant zu stimulieren. Somit konnte erstmals ein deutlicher Zusammenhang zwischen dem Zytokin IL-4 und einer Regeneration von entorhinalen Axonen nach einer mechanischen Verletzung gezeigt werden. In den bisherigen Experimenten wurden entweder Zellen verwendet, die IL-4 in eher geringen Konzentrationen produzierten, wie die Th2-Zellen oder in sehr hohen Konzentrationen, wie bei den IL-4-Plasmozytomzellen. In beiden Fällen konnte nach Vorexperimenten davon ausgegangen werden, dass die Produktion von IL-4 über einen längeren Zeitpunkt aufrecht gehalten wurde. Die Frage die sich dabei stellte, war, ob auch eine einmalige Dosis am Anfang der Kultivierung einen entscheidenden Einfluss auf das Auswachsen haben würde und welche Konzentration dafür notwendig wäre. Von den verwendeten Konzentrationen konnte nur die geringste Konzentration von IL-4 (5 pg/ml) eine statistisch signifikante Steigerung des Auswachsens bewirken. Das Auswachsen konnte nicht so deutlich gesteigert wurde, wie es bei der Kokultivierung mit Th2-Zellen oder IL-4-Plasmozytomzellen der Fall war. Bezüglich des IL-4 ist auch im Zusammenhang mit Angiogenese bekannt, dass niedrige Level positiv wirken, hohe Level jedoch inhibierend wirken [266]. Außerdem ist nicht auszuschließen, dass es bei der Kokultivierung von T-Zellen und Schnittkulturen zu einer gegenseitigen Beeinflussung kommt. Möglicherweise reichen dann auch geringe Mengen an IL-4 aus, um den beobachteten Effekt zu erzielen.

Das verwendete Modell der organotypischen Schnittkulturen ermöglichte eine Untersuchung des axonalen Auswachsens unter komplexeren Bedingungen, als die Verwendung von dissoziierten Zellkulturen. Leider ermöglichten die Schnittkulturen es nicht, zwischen einer direkten Beeinflussung von neuronalen Zellen durch einen Faktor und einer indirekten Beeinflussung, vermittelt z. B. durch Gliazellen, zu unterscheiden. In mehreren Arbeiten konnte die Expression des IL-4-Rezeptors auf

Astrozyten nachgewiesen werden [267-269], jedoch gibt es wenig Hinweise bezüglich neuronaler Zellen. Die in dieser Arbeit vorgestellte Untersuchung mittels RT-PCR von primären Zellkulturen zeigte, dass hippocampale Neuronen den IL-4-Rezeptor exprimieren, jedoch auf einem sehr viel niedrigeren Niveau als primäre Astrozyten. Aufgrund dieser Ergebnisse scheint eine direkte Beeinflussung der Neurone durch IL-4 möglich. Dagegen konnte für primäre Mikrogliazellen keine Expression des IL-4-Rezeptors nachgewiesen werden. Für die Untersuchungen standen primäre Oligodendrozyten nicht zur Verfügung, weshalb an dieser Stelle keine Aussage getroffen werden konnte. Die Untersuchung der verschiedenen neuronalen Gewebe zeigte ebenfalls, dass der IL-4-Rezeptor in z. B. Schnittkulturen oder dem Rückenmark exprimiert wird, jedoch konnte nicht bestimmt werden, auf welchem Zelltyp. Eine histochemische Analyse mittels IL-4-Rezeptor-Antikörper war zu dem Zeitpunkt weder im Rückenmark noch auf Schnittkulturen erfolgreich, da der verwendete Antikörper sehr unspezifisch markierte. Für spätere Analysen stand ein neuer Antikörper zur Verfügung, mit dem eine histochemische Analyse möglich war. So konnte gezeigt werden, dass zwei Tage nach einer Läsion des Corticospinalen Traktes der IL-4-Rezeptor auf neuronalen Zellen im Layer V des Motorkortex hochreguliert wurde. Die Expression war bei nicht lädierten Tieren und IL-4-Rezeptor-defizienten Mäusen nicht sichtbar [224].

Um die Untersuchungen bezüglich des IL-4 und dessen Wirkung auf das Auswachsen von geschädigten Axonen zu vervollständigen, wurde ebenfalls untersucht, wie IL-4 seinen stimulierenden Effekt vermittelt. Dazu wurden Schnittkulturen von genetisch veränderten Mäusen verwendet, bei denen spezifische Stellen des IL-4-Signalweges ausgeschaltet waren. Die Verwendung der IL-4-Rezeptor-defizienten-Mauslinie machte deutlich, dass ein funktionsfähiger IL-4-Rezeptor auf Zellen in der Schnittkultur notwendig war, damit die Th2-Zellen ihre stimulierende Wirkung auf das axonale Auswachsen vermitteln konnten. Darüberhinaus war es auch notwendig, dass ein bestimmter Signalweg durch IL-4 aktiviert wird. Während Stat6 für eine Stimulation des Auswachsens durch IL-4 nicht notwendig war, verhinderte eine Punktmutation der Aminosäure 497 des IL-4-Rezeptors dieses. An Position 497 des IL-4 Rezeptors befindet sich ein Tyrosin, das nach Bindung von IL-4 an den Rezeptor phosphoryliert wird und direkt mit der Aktivierung von Akt- und MAP-Kinase assoziiert ist [47]. Beide Signalmoleküle sind ihrerseits mit Überleben als auch Auswachsen von Axonen in Verbindung gebracht

worden [51, 52]. Dabei lässt sich feststellen, dass IL-4 als auch Neurotrophine wie NGF oder NT-3 diese Signalmoleküle verwenden, um ihre Funktion intrazellulär zu vermitteln [101]. Die spezifische Blockierung von Akt- und MAP-Kinase mit blockierenden Substanzen zeigte ebenfalls, dass die beobachtete Stimulation des axonalen Auswachsens durch das IL-4 der Th2-Zellen über die beiden Signalmoleküle vermittelt wurde. Dabei ist nicht auszuschließen, dass auch andere Signalwege, die notwendig für das axonale Auswachsen sind und Akt- und MAP-Kinase verwenden, inhibiert wurden. Eine spezifische Inhibition von Akt- und MAP-Kinase innerhalb des IL-4 Signalweges ist mit den Inhibitoren nicht möglich.

Aufgrund von Ergebnissen aus der eigenen Arbeitsgruppe kann nicht immer ein direkter Vergleich von Einzelzellen mit organotypischen Schnittkulturen vollzogen werden. Die organotypischen Schnittkulturen stellen dabei ein sehr viel komplexeres System dar, das die *in vivo* Situation wesentlich besser darstellt aufgrund von möglichen Zell-Zell-Interaktionen. Untersuchungen bezüglich des Einflusses von Hypothermie auf das axonale Auswachsen machten deutlich, dass es zu erheblichen Unterschieden zwischen dissoziierten Einzelzellkulturen und organotypischen Schnittkulturen kommen kann. Während die Hypothermie für die Einzelzellen eher nachteilig war [270], konnte in Schnittkulturen eine deutliche Steigerung des axonalen Auswachsens beobachtet werden [257].

Bei den bisherigen Untersuchungen wurde lediglich der Einfluss von Th2-Zellen auf das Auswachsen untersucht. Dabei wuchsen die Axone in eine Kollagenmatrix ein, fanden aber keine so genannten Zielzellen. Mit der Verwendung des organotypischen entorhinal-hippocampalen Schnittkulturenmodells mit β -Aktin-EGFP Mäusen wurde dieser Umstand verändert. In dem Modell wuchsen die Axone aus dem entorhinalen Kortex in einen Hippocampus ein, was einer Reinnervation entsprach [245, 248, 249]. Obwohl das Kollagen-Auswachsmodell und das EGFP-Einwachsmodell im Prinzip sehr ähnlich sind, konnten auch deutliche Unterschiede festgestellt werden. Während die Schnittkulturen in dem Einwachsmodell über einen langen Zeitraum von 2-3 Wochen kultiviert werden konnten, überlebten die Schnittkulturen in der Kollagen-Matrix lediglich bis zu 3 Tage. Danach zeigten sowohl die Schnittkulturen, als auch die ausgewachsenen Axone deutliche Zeichen des Absterbens. Die Schnittkultur färbte sich bräunlich und die Axone zeigten deutliche morphologische Veränderungen, was sich auch durch frisches Medium nicht verhindern ließ. Das Absterben lässt sich entweder durch eine

Unverträglichkeit der Schnittkulturen mit der Kollagenmatrix oder durch das Fehlen überlebenswichtiger Faktoren erklären. Bei den überlebenswichtigen Faktoren könnte es sich um Neurotrophine handeln. Die Neurotrophine werden z. B. im Hippocampus exprimiert und garantieren das Überleben von eingewachsenen Axonen und deren Ursprungszellen [89-91]. Da es sich bei dem Einwachsmodell um ein komplexeres System handelte als das Kollagen-Einwachsmodell, wurde untersucht, ob sich die bisherigen Ergebnisse reproduzieren lassen. Wie auch in dem Kollagen-Modell ließ sich in dem EGFP-Modell ein spontanes Einwachsen unter Kontrollbedingungen messen, welches durch die Kokultivierung mit Th2-Zellen deutlich gesteigert wurde. Die Th1-Zellen hatten auch in diesem Modell weder einen positiven noch einen negativen Einfluss auf das Einwachsen. Anders als bei den Kollagen-Auswachs experimenten (10 pg/ml) konnte nur eine hohe Dosis von IL-4 (500 ng/ml) eine signifikante Steigerung des axonalen Einwachsens hervorrufen. Dieser deutliche Unterschied in der benötigten Konzentration von rekombinanten IL-4 lässt sich möglicherweise durch die Unterschiede der Modelle erklären. So zeigten die beiden Modelle auch gegenüber einer Kultivierung mit den einzelnen Neurotrophinen unterschiedliche Ergebnisse. Während BDNF, NT-3 und NT-4 im EGFP-Auswachsmodell zu einer signifikanten Steigerung des axonalen Einwachsens in den Hippocampus führen, hatte im Kollagen-Auswachsmodell nur NT-3 eine stimulierende Wirkung auf das axonale Auswachsen [271].

Um die Frage zu beantworten, ob es sich bei der durch IL-4 vermittelten Steigerung des axonalen Auswachsens um eine direkte Beeinflussung der Neurone handelt, wurden weitere Experimente durchgeführt. Dazu wurden primäre hippocampale Neurone kultiviert. Die Auswertung der Kultivierung primärer Neurone in Gegenwart von 100 pg IL-4 zeigte, dass die Axonlänge eine 30 %ige Steigerung im Vergleich zu den Neuronen in der unbehandelten Kontrollgruppe aufwies. Zusätzlich wurde der Axonplexus (Summe der Länge der Axone und aller Verzweigungen) ausgewertet. Er zeigte eine signifikante Steigerung nach einer IL-4 Zugabe [224]. Ähnlich wie bei den Experimenten mit Schnittkulturen in einer Kollagenmatrix konnte gezeigt werden, dass eine einmalige Zugabe von IL-4 in einer geringen Konzentration einen stimulierenden Effekt auf das axonale Auswachsen hatte. Das Experiment wurde anschließend mit Neuronen aus Mäusen, die einen mutierten IL-4 Rezeptor (Y500F), exprimieren wiederholt, wobei keine Steigerung der Axonlänge und des Axonplexus beobachtet werden konnte [224]. Somit wird deutlich, dass IL-4 eine direkte Wirkung

auf neuronale Zellen hat und zumindest zum Teil direkt an der Steigerung des axonalen Auswachsens beteiligt ist. Außerdem konnte erneut die entscheidende Funktion der Akt- und MAP-Kinase verdeutlicht werden. Ausgeschlossen werden konnte ebenfalls, dass IL-4 die Zellproliferation oder das Zellüberleben beeinflusst und deshalb mehr auswachsende Axone gemessen werden konnten [217]. Dazu wurden morphologische Analysen und ein MTT-Assay durchgeführt, die alle keine Unterschiede bezüglich neuronalen Zelltodes feststellen konnten. Ein ebenfalls durchgeführter Neuroprotektions-Assay durch B-27-Entzug konnte ebenfalls keine Unterschiede zwischen IL-4-behandelten und unbehandelten Neuronen feststellen [224].

4.2 Zusammenhang von IL-4 und Neurotrophinen beim axonalen Auswachsen

Es konnte gezeigt werden, dass Th2-Zellen mit Hilfe ihres Markerzytokins IL-4 die axonale Regeneration positiv beeinflussen können. Zusätzlich ist auch gezeigt worden, dass rekombinantes IL-4 in einer geringen Dosis (10 pg/ml) das Auswachsen in dem Kollagen-Auswachsmodell und rekombinantes IL-4 in einer hohen Dosis (500 ng/ml) in dem EGFP-Einwachsmodell ebenfalls eine Steigerung des axonalen Wachstums bewirken kann. Darüber hinaus stellte sich die Frage, ob es sich dabei um eine direkte Beeinflussung von Neuronen durch das IL-4 handelte, oder ob das IL-4 über z. B. Gliazellen eine indirekte Beeinflussung bewirkte, bzw. eine Kombination aus beiden vorlag. Hinweise auf eine möglicherweise indirekte Wirkung gibt es durch Untersuchungen, die zeigen konnten, dass die Th2-Markerzytokine IL-4 und IL-10 einen Anstieg an astrozytären NGF bewirken [269, 272, 273], wohingegen z. B. IFN- γ als Th1-Markerzytokin die NGF-Sekretion hemmt [272, 274]. Die NGF-Sekretion von Astrozyten konnte in Experimenten ebenfalls durch eine Kokultivierung mit Th2-Zellen gesteigert werden [275]. Das Protein NGF gehört wie auch BDNF, NT-3 und NT-4 zu der Gruppe der Neurotrophine, welche als wichtige Faktoren bei Auswachsvorgängen sowie bei Reorganisationsprozessen im ZNS beschrieben wurden [89, 95, 96, 101]. Im Detail spielen Neurotrophine eine entscheidende Rolle der Neurotrophine *in vitro* als auch *in vivo* bei Entwicklung, Differenzierung, Plastizität, dem axonalen Wachstum sowie Überleben von Neuronen nach Verletzungen im ZNS. Die Kokultivierung von entorhinal-hippocampalen Schnittkulturen mit Th2-Zellen führte jedoch anders als erwartet nicht zu einer gesteigerten Expression der untersuchten Neurotrophine

[223, 224]. Es wurde festgestellt, dass sich die Menge an NGF, NT-3 und NT-4 nach Kokultivierung mit Th2-Zellen im Vergleich zu Schnittkulturen ohne Th2-Zellen nicht weiter steigern ließ. Außerdem wurde festgestellt, dass T-Zellen zwar Neurotrophine produzieren, jedoch die Menge nicht besonders hoch war. Dies wird besonders deutlich im Vergleich zu den Neurotrophin-Spiegel, die im Unterstand von Schnittkulturen gemessen werden konnten [223]. Die Analyse der Zellkulturüberstände der verwendeten Th1- und Th2-Zellen ergab, dass beide kein BDNF produzieren, was als ein Hauptfaktor der T-Zellen-induzierten Neuroregeneration und der Remission im Zusammenhang mit MS angesehen wurde [218]. Insgesamt ist die Datenlage bezüglich der Neurotrophin-Sekretion autoreaktiver T-Zellen sehr unterschiedlich [188, 276]. Die BDNF⁺-T-Zellen, isoliert aus humanen MS-Gehirnen, wurden bezüglich ihres Phänotyps nicht weiter charakterisiert. Dies scheint jedoch von Bedeutung, da mittlerweile verschiedene Subtypen von T-Zellen identifiziert wurden, die sich teilweise erheblich in ihrem Zytokinprofil unterscheiden [9, 10, 16, 17].

Die Durchführung von Experimenten mit funktionsblockierenden Antikörpern für NGF, NT-3 und NT-4 zeigten, dass die Stimulation des axonalen Auswachsens durch Th2-Zellen blockiert werden konnte [223, 224]. Aufgrund dieses Ergebnisses wurde auf einen Zusammenhang von Th2-Zellen und Neurotrophinen geschlossen. Deshalb wurde zunächst die Expression der Neurotrophin Rezeptoren in Schnittkulturen nach einer Kokultivierung mit Th2-Zellen untersucht. Es wurden histochemische Analysen der Schnittkulturen durchgeführt und als Ergebnis wurde eine signifikante Steigerung der Expression von Trk-A, -B, -C und p75 nach Kokultivierung mit Th2-Zellen gefunden [223]. Daraus wurde geschlossen, dass die gesteigerte Expression der Neurotrophin-Rezeptoren für das gesteigerte Auswachsen verantwortlich wäre [223]. Um dieses Ergebnis genauer zu untersuchen, wurden in der vorgestellten Arbeit die mRNA-Expression der Rezeptoren Trk-A, -B, -C und p75 in Schnittkulturen mittels einer Taqman Real-Time PCR, zu bestimmten Zeitpunkten nach Kokultivierung mit Th2-Zellen, untersucht. Dabei wurde das Verhältnis zwischen der β -Aktin-Expression als internes Kontrollgen mit der Expression der einzelnen Rezeptoren verglichen. Als Ergebnis konnte festgestellt werden, dass sich die Expression der untersuchten Rezeptoren nicht durch eine Kokultivierung mit Th2-Zellen steigern ließ. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch mit der vorher zitierten Arbeit. Eine Analyse der in der zitierten Arbeit verwendeten Antikörper gegen die Neurotrophin-Rezeptoren ergab,

dass sie sowohl im Western-Blot als auch bei anderen histochemischen Färbungen eine sehr starke Unspezifität aufwiesen (Beobachtungen der eigenen Arbeitsgruppe). Daher müssen die Ergebnisse bezüglich einer Hochregulation der Expression von Neurotrophin-Rezeptoren kritisch hinterfragt werden.

Um den Zusammenhang zwischen Th2-Zellen bzw. IL-4, Neurotrophin-Rezeptoren und gesteigertem axonalen Auswachsen genauer untersuchen zu können, wurde ein Inhibitor von Neurotrophin Rezeptoren verwendet. K252a ist ein nicht-selektiver Tyrosin-Kinase Inhibitor der in nM Konzentrationen überwiegend die Neurotrophin-Rezeptoren blockiert und nicht andere Tyrosin-Kinasen [277-279]. Dabei ist K252a weder in der Lage p75 zu blockieren, noch in höheren Konzentrationen (ab μM) eine Neurotrophin-Rezeptoren-spezifische Inhibierung zu induzieren. Weder im Kollagen-Auswachsmodell noch im EGFP-Einwachsmodell konnte eine Konzentration von 200 nM K252a eine Steigerung des axonalen Wachstums in Gegenwart von Th2-Zellen verhindern. Höhere Konzentrationen von K252a führten im EGFP-Modell dazu, dass die Schnittkulturen abstarben, weshalb eine Auswertung nicht mehr möglich war. Im Kollagen-Modell führte auch eine Konzentration von 800 nM K252a nicht zu einer Blockierung der durch Th2-Zellen vermittelten Steigerung des axonalen Auswachsens. Jedoch war das gesamte Auswachsenniveau der Schnittkulturen bei 800 nM K252a gegenüber Schnittkulturen mit 200 nM K252 und DMSO reduziert. Erst bei einer Neurotrophin-Rezeptor-unspezifischen Konzentration von 5 μM K252a konnte keine Steigerung des Auswachsens in Gegenwart von Th2-Zellen beobachtet werden. Bei einer Konzentration von 5 μM K252a war das axonale Auswachsen fast vollständig blockiert, vermutlich durch eine Hemmung aller Tyrosin-Kinasen [278]. Deshalb konnte mit diesen Ergebnissen keine eindeutige Schlussfolgerung bezüglich eines Zusammenhangs von IL-4 und Neurotrophin Rezeptoren gezogen werden.

Um den Zusammenhang von IL-4 und Neurotrophin-Rezeptoren weiter zu untersuchen, wurden Experimente mit Neurotrophin-Rezeptoren-defizienten Tieren geplant. Dabei musste festgestellt werden, dass lediglich die homozygoten Trk-B-defizienten Nachkommen für die Experimente verwendet werden konnten. Homozygot defiziente Trk-A und Trk-C Tiere starben bereits während ihrer Embryonalentwicklung. Da die homozygot defizienten Trk-B-Tiere innerhalb eines Tages nach der Geburt verstarben, wurde das Protokoll für dieses Experiment verändert. Anstelle von drei Tage alten Tieren wurden neugeborene Mäuse für die

Präparation der Schnittkulturen verwendet. Dabei ließ sich feststellen, dass Trk-B nicht an der durch Th2-Zellen vermittelten Stimulation des axonalen Auswachsens beteiligt sein konnte. Es zeigte sich, dass neben den Schnittkulturen der Wildtyp-Mäuse auch die Schnittkulturen der homozygot Trk-B-defizienten Tiere eine signifikante Steigerung des axonalen Auswachsens, in Gegenwart von Th2-Zellen zeigten. Da die Funktion der beiden anderen Rezeptoren Trk-A und Trk-C nicht untersucht werden konnte, ließ sich lediglich Trk-B als notwendiger Rezeptor ausschließen. Aufgrund von bereits veröffentlichten Arbeiten [93] und Untersuchungen in der eigenen Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass Trk-A drei Tage nach der Geburt weder im Hippocampus noch im entorhinalen Kortex von Mäusen exprimiert wird (Mitteilung Greta Gölz, Anatomie, Charité). Außerdem konnte auch eine Hochregulation der Trk-A Expression ausgeschlossen werden. Zusammenfassend erscheint es unwahrscheinlich, dass Trk-A eine Rolle bei der Steigerung des axonalen Auswachsens durch Th2-Zellen spielt. Diese Ergebnisse deuten auf eine besonders wichtige Rolle von Trk-C im Zusammenhang mit dem Auswachsen von entorhinalen Schnittkulturen hin. Dies wurde durch eigene Vorarbeiten unterstützt, die zeigten, dass lediglich NT-3 in einer sehr hohen Konzentration (500 ng/ml) im Kollagen-Auswachsmo- dell eine signifikante Steigerung des axonalen Auswachsens bewirkte. Die Neurotrophine NGF, NT-4 und BDNF zeigten keine Wirkung.

Eine weitere Möglichkeit des Zusammenhangs von IL-4 und Neurotrophinen wurde durch Untersuchungen angestoßen, die zeigten, dass Zytokine die intrazelluläre Signalübertragung von Rezeptoren über die Adaptermoleküle beeinflussen können. Es konnte gezeigt werden, dass IL-1 β den zellprotektiven Effekt von BDNF und NT-3 durch eine Beeinflussung der intrazellulären Signalmoleküle aufhob [280, 281]. Die genaueren Untersuchungen sind Gegenstand weiterer Experimente in der Arbeitsgruppe.

Es wurde auch untersucht, ob eine primäre Neuronenkultur durch Kultivierung mit IL-4 sensitiver für Wachstumsfaktoren wird, die von einer primären Gliazellkultur exprimiert werden. Als Ergebnis ließ sich feststellen, dass Neurone die mit dem Überstand von Gliazellen kultiviert wurden, sich nicht signifikant von den unbehandelten Neuronen unterschieden. Eine Präinkubation der Neurone mit IL-4 führte jedoch dazu, dass das Gliazellmedium sowohl Länge der Axone als auch den Axonplexus signifikant um 50 % bzw. 45% steigern konnte [224]. Somit konnte eine

direkte Beeinflussung der Neurone durch IL-4 nachgewiesen werden. Zu einer der wichtigsten Proteingruppe, die Gliazellen exprimieren, gehören die Neurotrophine. Die Ergebnisse geben einen Hinweis auf einen Zusammenhang von IL-4 und den Neurotrophinen.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, hat das IL-4 keinen Einfluss auf das Expressionsniveau der Neurotrophin-Rezeptoren, aber es gibt Hinweise auf eine Beeinflussung von IL-4 auf die Neurotrophin-Signalkaskade. Deshalb wurde in einer primären Neuronenkultur die Aktivierung von bekannten intrazellulären Signalmolekülen wie PLC- γ 1, Akt- und MAP-Kinase untersucht. Während PLC- γ 1 nur innerhalb der Signalkaskade der Neurotrophin Rezeptoren verwendet wird, gibt es bei Akt- und MAP-Kinase eine Überschneidung zwischen Neurotrophin- und IL-4 Rezeptoren [47]. Die Ergebnisse zeigten, dass IL-4 allein nicht in der Lage war, die Aktivierung von PLC- γ 1 und der MAP-Kinase (p42/p44) zu bewirken. Eine Präinkubation mit IL-4 bewirkte, dass die Aktivierung der intrazellulären NT-3-Signalmoleküle, sowohl im Vergleich zu unbehandelten Neuronen als auch zu ausschließlich NT-3-behandelten Neuronen gesteigert werden konnte. Die Steigerung der Aktivierung war signifikant für PLC- γ 1 und für MAP-Kinase p44, jedoch nicht für MAP-Kinase p42 [224]. Die durch IL-4 und NT-3 gesteigerte Aktivierung der Signalmoleküle ließ sich durch den pan-Trk-Rezeptorblocker K252a aufheben. Die beobachteten Effekte ließen sich nicht mit Neuronen aus IL-4-Rezeptor-defizienten Tieren reproduzieren. Dieselben Ergebnisse konnten bei der Verwendung einer primären kortikalen Mischkultur beobachtet werden. Die Mischkultur zeichnete sich durch einen höheren Anteil an Astrozyten und Mikrogliazellen in der Kultur aus, als es bei der primären neuronalen Zellkultur der Fall war (Mitteilung Greta Gölz, Anatomie, Charité). Somit konnte erstmals eine Beeinflussung des NT-3 Signalkaskade durch IL-4 beschrieben werden, was als eine mögliche Erklärung für die Steigerung des axonalen Auswachsens durch IL-4 interpretiert wurde. Interessanterweise ließ sich keine direkte Aktivierung der MAP-Kinase in der primären Neuronenkultur durch IL-4 nachweisen. Dies ist überraschend, da der IL-4-Rezeptor auf Neuronen exprimiert wird und die MAP-Kinase ein Schlüsselprotein in der Signalkaskade des IL-4-Rezeptors ist. Dieser Umstand lässt sich möglicherweise mit der nur geringen Aktivierung der MAP-Kinase durch IL-4 erklären, die mit der verwendeten Methode nicht detektierbar war. Eine weitere Erklärung wäre, dass IL-4 in den Neuronen vor allem Akt- und weniger die

MAP-Kinase aktivierte. Die Untersuchungen der Akt-Aktivierung waren bisher erfolglos. Der verwendete Antikörper zeigte bei den mitgeführten Kontrollen keine konsistenten Ergebnisse. An dieser Stelle könnte eine Immunpräzipitation von Akt-Kinase von Vorteil sein, gefolgt von einer Analyse mit einem Antikörper gegen phospho-Tyrosin. Möglichweise könnte so der Zusammenhang von IL-4 und der Neurotrophin-Signalkaskade besser untersucht werden.

4.3 Th2-Zellen stimulieren das axonale Auswachen im *in vivo* Modell der Rückenmarkläsion

Das ZNS ist in seiner Regenerationsfähigkeit stark eingeschränkt [76, 77], was nach einer Schädigung zu fortbestehenden Funktionsausfällen führen kann. Diese Schädigungen können z. B. durch Tumorerkrankungen oder nach mechanischen Verletzungen wie Operationen oder Unfällen entstehen. Besonders häufig sind Unfälle der Grund für mechanische Verletzungen des Rückenmarks. Weltweit leben mehr als 2,5 Millionen Menschen mit chronischen Rückenmarkverletzungen, die zu über 75 % Männer betreffen und meistens im Alter zwischen 16 und 30 erworben wurden. In den USA zeigt die Statistik, dass die meisten Rückenmarkverletzungen durch Motorradunfälle, Stürze, Gewaltanwendung und nach sportlicher Betätigung auftraten. Dabei handelt es sich meistens um Verletzungen, die durch eine Quetschung des Rückenmarks entstanden sind und seltener durch eine völlige Durchtrennung (10-20 %) des Rückenmarks [282]. Weltweit gibt es große Anstrengungen, sowohl den Verlauf solcher Verletzungen in der akuten Phase zu behandeln, als auch bei chronischen Zuständen eine Verbesserung der Lebensqualität zu erzielen. Auf pharmakologischer Seite hat sich eine Therapie mit Methylprednisolon innerhalb weniger Stunden nach der Verletzung als einziges Mittel durchgesetzt [283-285], da es den weiteren Verlauf der Schädigung positiv zu beeinflussen scheint. Wie in der NASCIS (National Acute Spinal Cord Injury Study) II und III Studie gezeigt werden konnte [286], kann die sekundäre Gewebeschädigung durch hochdosiertes Methylprednisolon eingedämmt werden. Bei der sekundären Gewebeschädigung kommt es z. B. durch Gefäßschädigung zur Ischämie, zum Ödem, zu Blutungen und im weiteren Verlauf zu einem Entzündungsprozess [287]. Im Rahmen des Entzündungsprozesses werden Lipidperoxidasen und freie Radikale freigesetzt, die eine weitere Zerstörung von Neuronen und Gliazellen bewirken können [288-290]. Dieser autodestruktive Prozess kann einen ursprünglich

inkompletten Querschnitt mit guter Prognose in einen irreversiblen kompletten Querschnitt verwandeln und auch zum Aufsteigen der Läsionshöhe um einige Segmente führen [290]. Ein weiteres Verfahren, das teilweise erfolgreich eingesetzt wird, ist die Hypothermie. Dabei wird kontrolliert die Körpertemperatur der Patienten mit einer Rückenmarkverletzung zeitweise reduziert [291, 292]. Die Idee dahinter ist es, durch eine Reduktion des zellulären Stoffwechsels die Anfälligkeit besonders der neuronalen Zellen auf die sekundäre Schädigung zu reduzieren. Gleichzeitig findet eine Reduzierung der ohnehin geschwächten Immunantwort statt, was sich in einer erhöhten Anfälligkeit der behandelten Patienten für Infektionen widerspiegelt [209, 210, 293]. Neben der Reduktion des sekundären Schadens gibt es auch therapeutische Ansätze, die versuchen, ein normalerweise reduziertes Wiederauswachsen von geschädigten Axonen oder auch ein funktionelles Sprouting zu unterstützen [294, 295]. Dabei wird einerseits versucht Faktoren, die an einer Inhibierung des Auswachsens beteiligt sind, zu blockieren, oder das Auswachsen von Axonen direkt zu stimulieren. Sowohl die Verwendung von Chondroitinasen, die Chondroitinsulfat-Proteoglykane abbauen [79, 296], als auch die Verwendung von Nogo-Antikörpern scheinen vielversprechende Ansätze zu sein [255, 297-299]. Der Einsatz von Wachstumsfaktoren wie NGF, NT-3 oder BDNF erscheint ebenfalls sinnvoll [300-303], wobei eine Überdosierung durchaus negativ für das Überleben und somit das Auswachsen der Neurone sein kann [304]. Außerdem werden Neurotrophine mit neuropathischen Schmerzen in Verbindung gebracht, was wiederum den Einsatz von Neurotrophinen einschränkt [305, 306].

Aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit lässt sich schlussfolgern, dass eventuell auch der Einsatz von primär als immunologisch angesehenen Faktoren ein wirksamer therapeutischer Ansatz bei mechanischen Rückenmarkverletzungen sein könnte. Um dies zu untersuchen, wurde das Modell der Rückenmarkläsion gewählt. Dabei wurde eine Kontusionsläsion durchgeführt, da diese im klinischen Alltag häufiger vorkommt als eine Schnittverletzung [282]. Zunächst wurden für diese Arbeit ConA aktivierte Th1- und Th2-Zellen bzw. PBS direkt in das Läsionsgebiet injiziert und die axonale Regeneration nach 14 Tagen ausgewertet. Für die Auswertung wurden die Kriterien so gewählt, dass unlädierte, markierte Axone zum Ausschluss des Tieres für das Experiment führten. So wurde versucht, eine Verfälschung der Resultate durch reaktives Sprouting zu eliminieren und vor allem tatsächliches Wiederauswachsen zu untersuchen. Die Versuche haben ergeben, dass nur Th2-Zellen und nicht Th1-

Zellen im Vergleich zu den PBS Kontrollen zu einem signifikant gesteigerten Auswachsen von lädierten Axonen des CST führten. Besonders hervorzuheben ist die Tatsache, dass sich dieser positive Effekt vor allem auf Axone bezog, die bis 5 mm distal der Läsion wuchsen. Dabei ist der hohe Level an axonaler Regeneration nach Th2-Zell-Injektion vergleichbar mit dem Level an Regeneration mit Anti-Nogo-Therapie (mündliche Mitteilung Frau Dr. Lisa Schnell, ETH Zürich) nach einer Rückenmarkverletzung. In diesem Experiment konnte eine signifikante Wiederherstellung der Motorfunktion gezeigt werden [307-309]. Unsere Versuche zeigen erstmals, dass Th2-Zellen nicht nur *in vitro* sondern auch *in vivo* einen positiven Einfluss auf axonale Regenerationsprozesse haben und somit eine neue Therapieoption mechanischer Rückenmarkverletzungen eröffnet werden konnte. Für einen therapeutischen Ansatz war es wichtig zu untersuchen, ob die gesteigerte Regeneration von Axonen im *in vivo* Modell ebenfalls durch IL-4 alleine induziert werden könnte. Dazu wurden IL-4-Plasmozytomzellen verwendet. Diese wurden, in semipermeable Taschen verschlossen, auf die Läsion gelegt. Die Membran war deshalb von Vorteil, da das IL-4 sie passieren konnte, während die Plasmozytomzellen keine infiltrierenden bösartigen Tumore bilden konnten, welche das Ergebnis der Versuchsreihe massiv beeinflusst hätte [230]. Die Versuche zeigten, dass die IL-4-Plasmozytomzellen zu einem gesteigerten axonalen Auswachsen von lädierten Axonen des CST in einem Bereich von 0,5 mm distal der Läsion führten, verglichen mit den PBS behandelten Kontrollmäusen. Die Wildtyp-Plasmozytomzellen hatten dabei keinen Einfluss auf das Auswachsen der lädierten CST-Axone. Somit konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass das IL-4 als ein immunologisch wirksamer Faktor ebenfalls in der Therapie von ZNS-Verletzungen hilfreich sein könnte. Im Vergleich zum Experiment mit den injizierten Th2-Zellen war jedoch der Effekt der IL-4-Plasmozytomzellen in den semipermeablen Taschen nur unmittelbar auf das Gebiet unterhalb der Tasche begrenzt. Dies lässt sich möglicherweise dadurch erklären, dass die Plasmozytomzellen in den verschlossenen Taschen eingeschlossen waren und nicht, wie die injizierten Th2-Zellen, eine Zellmigration im Rückenmarksgewebe durchführen konnten. Die injizierten Th2-Zellen waren in der Lage, sich innerhalb des Rückenmarks zu verteilen und somit ihre unterstützende Wirkung auf das Wachstum über einen größeren Bereich zu vermitteln. Um diese Frage zu beantworten, sollten die Th2-Zellen in einem zukünftigen Experiment ebenfalls in semipermeable Membranen

eingesetzt werden, da somit einerseits eine Zellmigration und andererseits ein Zell-Zell-Kontakt verhindert würde. Der Zell-Zell-Kontakt könnte eventuell zu einer Restimulation der injizierten Th2-Zellen im Rückenmark führen. Somit könnte untersucht werden, ob fixierte Th2-Zellen ebenfalls eine nur lokal begrenzte Regeneration verursachen können.

Zusätzlich zu dieser Studie wurden in der Arbeitsgruppe weitere Untersuchungen durchgeführt, um die Ergebnisse dieser Arbeit zu unterstützen. In der vorgestellten Arbeit konnte gezeigt werden, dass im intakten adulten Rückenmark eine Expression des IL-4-Rezeptors nachweisbar ist. Eine Analyse von Neuronen im Motorkortex zeigte, dass zwei Tage nach einer Läsion eine deutlich höhere Expression des IL-4-Rezeptors nachweisbar ist als bei Kontrolltieren ohne Läsion. Die Spezifität dieses Nachweises wurde durch eine Wiederholung der Experimente mit Tieren, die IL-4-Rezeptor-defizient waren, erzielt. In diesen Tieren war keine Hochregulation der Expression des IL-4-Rezeptors nach Läsion des CST festzustellen [224]. Die Injektion von Th2-Zellen in die Läsion einer Rückenmarkschädigung führte zu mehr ausgewachsenen Axonen, die anterograd markiert waren. Umgekehrt führte ein retrogrades Markieren von Neuronen mit Fluorogold, das kaudal der Läsion appliziert wurde, bei Tieren mit injizierten Th2-Zellen zu signifikant mehr markierten Zellkörpern im Motorkortex. Bei Kontrolltieren, denen PBS oder Th1-Zellen injiziert wurden, konnten signifikant weniger markierte Zellkörper detektiert werden. Das bedeutete je mehr Regeneration durch Th2-Zellen, umso mehr retrograder Transport von Fluorogold zu den Zellkörpern. Außerdem wurde eine Analyse des Zellüberlebens im Motorkortex durchgeführt. Dabei konnte keine Veränderung des Zellüberlebens nach Injektion von Th2-Zellen im Vergleich zu PBS oder TH1-Zellen festgestellt werden [249]. Diese Experimente lassen darauf schließen, dass die Axone neu ausgewachsen waren und keine gesteigerte Neuroprotektion vorlag.

Wie bereits beschrieben wurde, konnten die injizierten T-Zellen im Rückenmark migrieren, was für eine umfangreichere Regeneration von Axonen gegenüber den lokal fixierten Plasmazytomzellen führte. Die Migration war dabei nicht nur auf das kaudale Gebiet nach der Läsion begrenzt, sondern konnte natürlich auch im rostralen Bereich beobachtet werden. Eine Analyse im rostralen Bereich der Läsion bezüglich kollateralem Sprouting ergab, dass keine Steigerung durch die IL-4 produzierenden Plasmazytomzellen oder der Th2-Zellen gegenüber den Tieren in den Kontrollgruppen festgestellt werden konnte. Auch bei den *in vivo*-Experimenten

stellte sich die Frage, ob die neuronalen Zellen direkt beeinflusst wurden, oder ob z. B. eine Veränderung des periläsionalen Milieus für den beobachteten Effekt verantwortlich war. Um diese Frage beantworten zu können, wurde die Mikroglia/Makrophagen-Reaktion, die Astrozytose, die De- und Remyelinisierung und die extrazelluläre Matrix auf Chondroitinsulfat-Proteoglykane untersucht. Es wurde jeweils ein früher (2 Tage), ein mittlerer (7 Tage) und ein später (14 Tage) Zeitpunkt nach Läsion von PBS-Kontrolltieren und Th2-Zell injizierten Tieren verglichen. Die Analyse der Remyelinisierung ergab, dass 14 Tage nach der Läsion in der Th2-Zellen Versuchsgruppe mehr Remyelinisierung nachweisbar war als in der PBS-Kontrollgruppe. Diese Beobachtung steht sicherlich im Zusammenhang mit dem Ergebnis, dass mehr Axone nach Th2-Zell-Injektion regenerieren, da diese nach dem Auswachsen neu mit einer Myelinschicht ummantelt werden. Die Analyse der Mikroglia/Makrophagen Reaktion, der Astrozytose und der Menge an Chondroitinsulfat-Proteoglykane in der extrazellulären Matrix ergaben keine deutlichen Unterschiede, so dass davon ausgegangen werden muss, dass die Th2-Zellen keine Beeinflussung des periläsionalen Milieus bewirken, sondern eher direkt auf die Neurone wirken [224].

Für einen therapeutischen Einsatz von IL-4 oder IL-4-produzierenden-Zellen war es außerdem notwendig, eine Verbesserung des neurologischen Ausgangs nach einer Rückenmarkverletzung zu zeigen. Dazu wurden lokomotorische Tests mit der Basso Maus Skala [310] und Experimente im Laufrad durchgeführt. Für beide Tests zeigten sich signifikante Lang-Zeit Verbesserungen bei Mäusen, denen intraläsional Th2-Zellen gespritzt wurden. Diese Verbesserungen erreichten fast Werte, wie sie bei unlädierten Tieren zu messen waren. Zusätzlich ließ sich bei ihnen auch eine signifikante Verbesserung der Bewegungsabläufe beim Laufen feststellen. Dagegen zeigten die PBS-Mäuse alle deutliche Zeichen einer durch Läsion induzierten Behinderung der Lokomotion, gekennzeichnet durch Schritt-, Schwanz- oder Rumpfinstabilität auch noch lange Zeit nach der Läsion. Die Analyse der Lauffähigkeiten als Indikator für eine CST-Funktion [311, 312] zeigte, dass Th2-Zellen das System der Regeneration unterstützen. Dabei ist jedoch davon auszugehen, dass auch andere spinale Motor-Systeme positiv beeinflusst wurden, diese jedoch in diesen Ansätzen nicht untersucht wurden.

Somit konnte erstmals gezeigt werden, dass IL-4 nicht nur eine morphologische Verbesserung von Reorganisationsprozessen nach einer Läsion bewirken kann,

sondern dass diese morphologischen Verbesserungen auch zu einer tatsächlichen Verbesserung der Bewegungsleistung führen. Somit könnte ein neuer Weg in der Therapie von mechanischen Schäden eröffnet werden.

4.4 Th2-Zellen und IL-4 als Therapie nach mechanischen Verletzungen des ZNS

Die vorliegenden Ergebnisse weisen darauf hin, dass der Phänotyp der endogen einwandernden T-Zellen nach einer mechanischen Läsion [128, 129] entscheidend für den Verlauf der Regeneration sein könnte [138]. Viele bisher vorgelegte Untersuchungen lassen den Schluss zu, dass es sich dabei vermutlich vermehrt um Th1-Zellen handelt. Dies ließe sich durch die Tatsache erklären, dass Chemokine wie z. B. Rantes/CCL5, IP-10/CXCL10 oder MIP-1 α nach einer mechanischen Verletzung des ZNS hochreguliert werden [313-318]. Wie unter 1.1.3 beschrieben, haben Chemokine eine anziehende Wirkung auf Zellen mit den dazu passenden Chemokinrezeptoren. Vergleicht man z. B. Th1- und Th2-Zellen miteinander, so kann man feststellen, dass Th1-Zellen vor allem die Chemokinrezeptoren CXCR-3 und CCR-5 [319] und Th2-Zellen eher die Chemokinrezeptoren CCR-3 und CCR-8 [320, 321] exprimieren. Für die Chemokine Rantes, IP-10 und MIP-1 α sind vor allem die Rezeptoren CXCR-3 und CCR-5 beschrieben [322], wodurch eher Th1-Zellen als Th2-Zellen in das verletzte Gebiet einwandern würden.

Bei einer natürlich verlaufenden neuroimmunologischen Reaktion in Folge einer Verletzung im ZNS werden vermutlich nicht nur T-Lymphozyten einer Subpopulation angezogen, sondern mehrere gleichzeitig. Wie bereits beschrieben, lassen sich Th1-, Th2-, Th3-, Th17- und Treg-Zellen vor allem aufgrund ihres Zytokinprofils [16, 17, 24, 27] unterscheiden. Dabei sind es vor allem die Th2-Zellen, die deutliche Mengen an IL-4 produzieren. Obwohl davon auszugehen ist, dass auch diese T-Zellen in das geschädigte Gewebe infiltrieren, wird die Menge an produzierten IL-4 nur unzureichend sein [224], um eine Neuroregeneration genügend zu unterstützen. Dies gilt besonders, wenn man bedenkt, wie viele aktivierte Th2-Zellen für die vorgelegten Ergebnisse verwendet wurden. Hinzu kommt der Umstand, dass nach einer Verletzung die pro-inflammatorischen Zytokine wie IL-1 β , IL-6 und TNF- α sehr früh nach der Verletzung hochreguliert werden [323, 324] und eher von Th1-Zellen produziert werden. Th1-Zellen können über IFN- γ die Aktivität von Th2-Zellen reduzieren, wodurch die anti-inflammatorischen und vielleicht auch regenerativen Eigenschaften der Th2-Zellen reduziert werden.

Da die Rolle von endogenen T-Zellen zwischen einer protektiven Autoimmunität und einer weiteren Destruktivität schwanken [136, 191], ließe sich darüber spekulieren, welchen Phänotyp die rekrutierten T-Zellen in den jeweiligen Experimenten hatten. Diese Frage wurde in den Arbeiten nicht genauer untersucht, könnte aber nach den vorliegenden Ergebnissen eine entscheidende Rolle gespielt haben. Darüber hinaus ist unklar, welchen Einfluss systemisch injizierte autoimmune T-Zellen und Impfstrategien mit encephalogenen Antigen vor einer ZNS-Schädigung [136, 325] auf das Immunsystem haben. Möglicherweise führen sie zu einer systemischen Th2-Immunantwort, wodurch mehr IL-4 produzierende Zellen einwandern können [138]. Um diese Fragestellung beantworten zu können, wurde untersucht, ob eine systemische Th2-Immunantwort vor einer ZNS-Schädigung ebenfalls einen positiven Effekt auf die axonale Regeneration des CST hat. Dazu wurden Mäuse nach einem etablierten Modell mit Ovalbumin und Aluminiumhydroxid mehrfach immunisiert, indem beides gemischt subcutan gespritzt wurde [326, 327]. Das Gemisch aus Ovalbumin und Aluminiumhydroxid führte zu einer atopischen Dermatitis, die durch eine starke Th2-Immunantwort bzw. IgE-Produktion charakterisiert ist [328-330]. Dazu wurden Mäuse mit Ovalbumin und kompletten Freundesches Adjuvants behandelt, was zu einer entzündlichen Dermatitis wie der Kontaktdermatitis führt, die durch eine starke Th1/Th-17-Immunantwort geprägt ist [331-333]. Als Ergebnis (Daten nicht gezeigt) konnte bei beiden Dermatitis-Modellen keine verbesserte Regeneration festgestellt werden, jedoch auch keine Verschlechterung gegenüber den Kontrolltieren. Anders als in der Analyse von regionalen Lymphknoten, die nach entsprechender Immunantwort auf die Hautreaktionen deutliche Anzeichen einer Th1- bzw. einer Th2- Immunantwort aufwiesen [334, 335], konnten in Analysen der systemischen Immunzellen eine solche deutliche Polarisierung nicht gezeigt werden (Daten nicht gezeigt). Die Analyse der Zytokine IFN- γ und IL-4 sprach eher für eine gemischte Immunantwort, wobei deutliche Mengen an IFN- γ und IL-4 im Überstand derselben Zellen gemessen werden konnte. Diese gemischte Polarisation könnte erklären, warum keine gesteigerte Regeneration nach einer atopischen Dermatitis zu erkennen war, da nicht genügend Th2-Zellen aktiviert wurden. Aufgrund dieser Ergebnisse wird deutlich, wie schwierig eine eindeutige periphere Polarisation als therapeutische Möglichkeit wäre. Obwohl bekannt ist, dass bestimmte Infektionen zu einer Th2-Zellen dominierten Immunantwort führen, ist nicht bekannt, ob gleichzeitig nicht auch Th1-Zellen aktiviert werden und ob eine Impfung mit den entsprechenden

Antigenen ausreichen würde, um eine ähnlich starke Immunantwort zu erzielen. So führt beim Menschen z. B. die chronische Infektion mit *Helicobacter pylori* zu einer starken Th2-Immunantwort [336, 337]. *H. pylori* ist ein gramnegatives Bakterium, das im Magen vorkommt und mit der Ätiologie von Magengeschwüren assoziiert ist [338]. Mit den vorgelegten Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass eine Stimulation der axonalen Regeneration nach mechanischer Schädigung unabhängig von der Antigen-Spezifität der T-Zellen erfolgte. Alle Ergebnisse wurden mit Antigen-unabhängig stimulierten T-Zellen erzielt, was eine Alternative gegenüber den bisher vorgeschlagenen encephalogen spezifischen T-Zellen [135, 195, 222, 339] darstellt. Mit unspezifischen ConA aktivierten Th2-Zellen würde die Möglichkeit der Induzierung einer EAE respektive von MS-Schüben verhindert. Es scheint auch möglich, dass anti-inflammatorische Th2-Zellen dazu beitragen, das Mikromilieu der Läsion zu modulieren. Dabei könnten die vorhandenen und einwandernden Zellen in ihren regenerativen Eigenschaften verstärkt werden. Ein so genannter adaptiver T-Zelltransfer von *ex vivo* stimulierten Zellen wird in der Behandlung von Tumorerkrankungen eingesetzt. Dabei finden sowohl zytotoxische CD8⁺-Zellen als auch CD4⁺-Zellen eine mittlerweile viel versprechende Verwendung [340-343].

Bisher ist nur festgestellt worden, dass Th2-Zellen für einen längeren Zeitraum nach Injektion in der Läsion verweilen und sich in dem Gewebe verteilen, um so möglicherweise die Regeneration zu unterstützen. Aufgrund der vorgelegten Ergebnisse ist davon auszugehen, dass sie ihre regenerativen Eigenschaften über ihr Markerzytokin IL-4 induzieren. Bisher ist jedoch nicht untersucht worden, ob sich die applizierten und aktivierten T-Zellen in der Läsion teilen, wie lange sie IL-4 produzieren, ob sie im ZNS-Gewebe restimuliert werden oder endogen einwandernde Immunzellen beeinflussen.

In der angewandten Therapie von ZNS-Schäden, vor allem von Rückenmarkverletzungen, wird das Medikament Methylprednisolon eingesetzt [283]. Dabei wird sowohl die Bildung von Lipidperoxidasen verhindert, was als primäres Agens für die Bildung von sekundären Schäden angesehen wird [288, 289], als auch die Bildung eines Ödems eingeschränkt. Außerdem führt es auch zu einer Immunsupprimierung, die ebenfalls als vorteilhaft für die Vermeidung von Sekundärschäden angesehen wird. In den vorliegenden experimentellen Ansätzen wurden die Th2-Zellen direkt im Anschluss an die gesetzte Läsion injiziert, während endogene T-Zellen zeitlich verzögert und in einem deutlich geringeren Umfang in

eine Läsion einwandern. Es ist denkbar, dass die anti-inflammatorischen Th2-Zellen lokal die Wirkung des Methylprednisolons imitieren und das IL-4 eine Unterdrückung der lokalen Entzündungsreaktion bewirken könnte. Es konnte zwar keine Beeinflussung der Makrophagen-Aktivität beobachtet werden, aber die Untersuchung weiterer Entzündungsparameter wie Histamin, Prostaglandine, Kinine, Serotonin, Akute-Phasen-Reaktion Proteinen (z. B. CRP) und Lipidperoxidasen wären sinnvoll, um diese Frage beantworten zu können. Zusätzlich sollte das Verhältnis von Entzündungs-assoziierten Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B, Zelladhäsionsmolekülen und bestimmten Zellen wie Mastzellen und neutrophile-, basophile- und eosinophile-Granulozyten untersucht werden.

Die gesammelten Ergebnisse der Arbeitsgruppe weisen auf eine IL-4 induzierte Modulation der Neurotrophin-Signalwege hin. Dabei konnte sowohl im ZNS-Modell [224] als auch im PNS-Modell [344] gezeigt werden, dass IL-4 die Wirkung von NT-3 auf die Stärke der Akt-Kinase und PLC- γ Aktivierung steigert und darüber hinaus im PNS-Modell deutlich das Auswachsen von Axonen stimuliert [344]. Es konnte gezeigt werden, dass das Zuführen von Neurotrophinen zu einer Steigerung der Regeneration führte und somit als Therapieansatz in Frage kommen könnte [300, 345-347]. Nach den vorgelegten Ergebnissen wäre es denkbar, dass das IL-4 dabei hilft, die Funktion der Neurotrophine zu verbessern, indem es das intrazelluläre Signal der Neurotrophine verstärkt. Zusätzlich gibt es Untersuchungen, die zeigen konnten, dass die Produktion von IL-4 durch NT-3 stimuliert werden kann, wodurch bereits geringe Mengen beider Faktoren zu einem gesteigerten Effekt beitragen könnten [348]. Für zukünftige Experimente erscheint es demnach sehr sinnvoll, den Effekt einer Kombination von IL-4 und Neurotrophinen zu untersuchen. Möglicherweise könnte eine weitere Steigerung der Regeneration beobachtet werden, oder es könnten geringere Dosen beider Faktoren verwendet werden. Zumindest für die Neurotrophine konnte gezeigt werden, dass eine Überdosierung teilweise eher negative Folgen für die Regeneration haben kann [304]. Außerdem sollte eine Kombination mit einer Anti-Nogo-Therapie oder mit Chondroitinsulfat-abbauenden Enzymen erwogen werden, da somit gleichzeitig an verschiedenen Mechanismen einer ZNS-Regeneration angesetzt werden könnte. Die Verwendung von immunsupprimierenden Substanzen sollte nach den vorgelegten Ergebnissen überdacht werden, da somit der Beitrag von Th2-Zellen an Reorganisationsprozessen nach einer mechanischen Verletzung unterdrückt würde.

5 Literatur

1. Janeway, C.A. and P. Travers, Immunbiologie. 1997: 2. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag.
2. Medzhitov, R. and C.A. Janeway, Jr., Innate immune recognition and control of adaptive immune responses. *Semin Immunol*, 1998. **10**(5): p. 351-3.
3. Campos, M. and D.L. Godson, The effectiveness and limitations of immune memory: understanding protective immune responses. *Int J Parasitol*, 2003. **33**(5-6): p. 655-61.
4. Carroll, M.C. and A.P. Prodeus, Linkages of innate and adaptive immunity. *Curr Opin Immunol*, 1998. **10**(1): p. 36-40.
5. Moura, R., et al., B cells from the bench to the clinical practice. *Acta Reumatol Port*, 2008. **33**(2): p. 137-54.
6. Fabbri, M., C. Smart, and R. Pardi, T lymphocytes. *Int J Biochem Cell Biol*, 2003. **35**(7): p. 1004-8.
7. Waldmann, T.A., The IL-2/IL-2 receptor system: a target for rational immune intervention. *Immunol Today*, 1993. **14**(6): p. 264-70.
8. Streeck, H., et al., Recognition of a defined region within p24 gag by CD8+ T cells during primary human immunodeficiency virus type 1 infection in individuals expressing protective HLA class I alleles. *J Virol*, 2007. **81**(14): p. 7725-31.
9. Liew, F.Y., T(H)1 and T(H)2 cells: a historical perspective. *Nat Rev Immunol*, 2002. **2**(1): p. 55-60.
10. Del Prete, G., The concept of type-1 and type-2 helper T cells and their cytokines in humans. *Int Rev Immunol*, 1998. **16**(3-4): p. 427-55.
11. Romagnani, S., Th1 and Th2 in human diseases. *Clin Immunol Immunopathol*, 1996. **80**(3 Pt 1): p. 225-35.
12. Lucey, D.R., M. Clerici, and G.M. Shearer, Type 1 and type 2 cytokine dysregulation in human infectious, neoplastic, and inflammatory diseases. *Clin Microbiol Rev*, 1996. **9**(4): p. 532-62.
13. Biedermann, T., M. Rocken, and J.M. Carballido, TH1 and TH2 lymphocyte development and regulation of TH cell-mediated immune responses of the skin. *J Invest Dermatol Symp Proc*, 2004. **9**(1): p. 5-14.
14. Romagnani, S., Development of Th 1- or Th 2-dominated immune responses: what about the polarizing signals? *Int J Clin Lab Res*, 1996. **26**(2): p. 83-98.
15. Parronchi, P., et al., Role of type 2 T helper cells (Th2) in allergic disorders. *Adv Exp Med Biol*, 1996. **409**: p. 359-63.
16. Awasthi, A., G. Murugaiyan, and V.K. Kuchroo, Interplay Between Effector Th17 and Regulatory T Cells. *J Clin Immunol*, 2008.
17. Romagnani, S., The Th1/Th2 paradigm. *Immunol Today*, 1997. **18**(6): p. 263-6.
18. Annunziato, F., et al., Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J Exp Med*, 2007. **204**(8): p. 1849-61.
19. Harrington, L.E., P.R. Mangan, and C.T. Weaver, Expanding the effector CD4 T-cell repertoire: the Th17 lineage. *Curr Opin Immunol*, 2006. **18**(3): p. 349-56.
20. Weaver, C.T., et al., Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. *Immunity*, 2006. **24**(6): p. 677-88.
21. Weaver, C.T., et al., IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annu Rev Immunol*, 2007. **25**: p. 821-52.

22. Alber, G. and T. Kamradt, Regulation of Protective and Pathogenic Th17 Responses. *Current Immunology Review*, 2007. **3**(1): p. 3-16.
23. Tesmer, L.A., et al., Th17 cells in human disease. *Immunol Rev*, 2008. **223**: p. 87-113.
24. Piccirillo, C.A., Regulatory T cells in health and disease. *Cytokine*, 2008. **43**(3): p. 395-401.
25. Piccirillo, C.A., et al., CD4(+)Foxp3(+) regulatory T cells in the control of autoimmunity: in vivo veritas. *Curr Opin Immunol*, 2008.
26. Shevach, E.M., CD4+ CD25+ suppressor T cells: more questions than answers. *Nat Rev Immunol*, 2002. **2**(6): p. 389-400.
27. Weiner, H.L., Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells. *Immunol Rev*, 2001. **182**: p. 207-14.
28. Khan, F.A., A.N. Shukla, and S.C. Joshi, Anaemia and cancer treatment: a conceptual change. *Singapore Med J*, 2008. **49**(10): p. 759-64.
29. Barroso, O., I. Mazzoni, and O. Rabin, Hormone abuse in sports: the antidoping perspective. *Asian J Androl*, 2008. **10**(3): p. 391-402.
30. Czygier, M., L. Dakowicz, and M. Szmitkowski, The effect of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) on the activity of granulocyte enzymes in children with cancer who developed neutropenia after chemotherapy. *Adv Med Sci*, 2008.
31. Vermersch, P., et al., Combination of IFN beta-1a (Avonex) and mycophenolate mofetil (Cellcept) in multiple sclerosis. *Eur J Neurol*, 2007. **14**(1): p. 85-9.
32. Bellecave, P. and D. Moradpour, A fresh look at interferon-alpha signaling and treatment outcomes in chronic hepatitis C. *Hepatology*, 2008. **48**(4): p. 1330-3.
33. Arron, J.R., M.C. Walsh, and Y. Choi, TRAF-mediated TNFR-family signaling. *Curr Protoc Immunol*, 2002. **Chapter 11**: p. Unit 11 9D.
34. Hehlgans, T. and K. Pfeffer, The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology*, 2005. **115**(1): p. 1-20.
35. Murdoch, C. and A. Finn, Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases. *Blood*, 2000. **95**(10): p. 3032-43.
36. Cosman, D., et al., A new cytokine receptor superfamily. *Trends Biochem Sci*, 1990. **15**(7): p. 265-70.
37. Marone, G., et al., Mechanisms of IgE elevation in HIV-1 infection. *Crit Rev Immunol*, 2000. **20**(6): p. 477-96.
38. Wurster, A.L., et al., Interleukin-4-mediated protection of primary B cells from apoptosis through Stat6-dependent up-regulation of Bcl-xL. *J Biol Chem*, 2002. **277**(30): p. 27169-75.
39. Carey, G.B., et al., IL-4 protects the B-cell lymphoma cell line CH31 from anti-IgM-induced growth arrest and apoptosis: contribution of the PI-3 kinase/AKT pathway. *Cell Res*, 2007. **17**(11): p. 942-55.
40. Nakanishi, K., et al., IL-4 and anti-CD40 protect against Fas-mediated B cell apoptosis and induce B cell growth and differentiation. *Int Immunol*, 1996. **8**(5): p. 791-8.
41. Tamada, K., et al., IL-4-producing NK1.1+ T cells are resistant to glucocorticoid-induced apoptosis: implications for the Th1/Th2 balance. *J Immunol*, 1998. **161**(3): p. 1239-47.
42. Zamorano, J. and A.D. Keegan, Regulation of apoptosis by tyrosine-containing domains of IL-4R alpha: Y497 and Y713, but not the STAT6-docking tyrosines, signal protection from apoptosis. *J Immunol*, 1998. **161**(2): p. 859-67.

43. Maeda, S. and Y. Yanagihara, [Inflammatory cytokines (IL-4, IL-5 and IL-13)]. *Nippon Rinsho*, 2001. **59**(10): p. 1894-9.
44. Kuperman, D.A. and R.P. Schleimer, Interleukin-4, interleukin-13, signal transducer and activator of transcription factor 6, and allergic asthma. *Curr Mol Med*, 2008. **8**(5): p. 384-92.
45. Ghoreschi, K., et al., Interleukin-4 therapy of psoriasis induces Th2 responses and improves human autoimmune disease. *Nat Med*, 2003. **9**(1): p. 40-6.
46. Keegan, A., K. Nelms, and W.E. Paul, The IL-4 receptor--signaling mechanisms. *Adv Exp Med Biol*, 1994. **365**: p. 211-5.
47. Nelms, K., et al., The IL-4 receptor: signaling mechanisms and biologic functions. *Annu Rev Immunol*, 1999. **17**: p. 701-38.
48. Pernis, A., et al., Gamma chain-associated cytokine receptors signal through distinct transducing factors. *J Biol Chem*, 1995. **270**(24): p. 14517-22.
49. Keegan, A.D., et al., Similarities and differences in signal transduction by interleukin 4 and interleukin 13: analysis of Janus kinase activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. **92**(17): p. 7681-5.
50. Keegan, A.D., et al., An IL-4 receptor region containing an insulin receptor motif is important for IL-4-mediated IRS-1 phosphorylation and cell growth. *Cell*, 1994. **76**(5): p. 811-20.
51. Tornieri, K., et al., Control of neurite outgrowth and growth cone motility by phosphatidylinositol-3-kinase. *Cell Motil Cytoskeleton*, 2006. **63**(4): p. 173-92.
52. Atwal, J.K., et al., The TrkB-Shc site signals neuronal survival and local axon growth via MEK and P13-kinase. *Neuron*, 2000. **27**(2): p. 265-77.
53. Orton, R.J., et al., Computational modelling of the receptor-tyrosine-kinase-activated MAPK pathway. *Biochem J*, 2005. **392**(Pt 2): p. 249-61.
54. Shaulian, E. and M. Karin, AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene*, 2001. **20**(19): p. 2390-400.
55. Chuang, L.M., et al., Signal transduction pathways for interleukin 4 and insulin in human hepatoma cells. *J Biochem*, 1996. **120**(1): p. 111-6.
56. Pernis, A., et al., Interleukin 4 signals through two related pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. **92**(17): p. 7971-5.
57. Blaeser, F., et al., Targeted inactivation of the IL-4 receptor alpha chain I4R motif promotes allergic airway inflammation. *J Exp Med*, 2003. **198**(8): p. 1189-200.
58. Trepel, M., *Neuroanatomie, Struktur und Funktion*. 3. Auflage ed, ed. Auflage. Vol. 3. Auflage. 2003: 3. Auflage, Urban & Fischer Verlag.
59. Zilles, K. and G. Rehkämper, *Funktionelle Neuroanatomie*. 1998: 3. Auflage, Springer Verlag.
60. Amaral, D.G. and M.P. Witter, The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience*, 1989. **31**(3): p. 571-91.
61. Benninghoff, A. and D.H. Drenckhahn, *Anatomie, Band 2*: 2004, Elsevier. Urban und Fischer Verlag.
62. Amaral, D.G. and M.P. Witter, Hippocampal Formation, in *The Rat Nervous System*. 1995, Academic Press.
63. Turner, D.A., et al., Morphological features of the entorhinal-hippocampal connection. *Prog Neurobiol*, 1998. **55**(6): p. 537-62.
64. Blackstad, T.W., On the termination of some afferents to the hippocampus and fascia dentata; an experimental study in the rat. *Acta Anat (Basel)*, 1958. **35**(3): p. 202-14.

65. Insausti, R., M.T. Herrero, and M.P. Witter, Entorhinal cortex of the rat: cytoarchitectonic subdivisions and the origin and distribution of cortical efferents. *Hippocampus*, 1997. **7**(2): p. 146-83.
66. Andersen, P., et al., Lamellar organization of hippocampal excitatory pathways. *Acta Physiol Scand*, 1969. **76**(1): p. 4A-5A.
67. Papez, J.W., A proposed mechanism of emotion. 1937. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*, 1995. **7**(1): p. 103-12.
68. Kandal, E.R., J.H. Schwartz, and T.M. Jessel, *Neurowissenschaften*. Vol. 1. deutsche Auflage. 1996: Spektrum Akademischer Verlag.
69. Faraji, J., et al., Rats with hippocampal lesion show impaired learning and memory in the ziggurat task: a new task to evaluate spatial behavior. *Behav Brain Res*, 2008. **189**(1): p. 17-31.
70. van Norden, A.G., et al., Subjective cognitive failures and hippocampal volume in elderly with white matter lesions. *Neurology*, 2008. **71**(15): p. 1152-9.
71. Kitayama, H., et al., Human immunodeficiency virus type-1 vulnerates nascent neuronal cells. *Microbiol Immunol*, 2008. **52**(2): p. 78-88.
72. Ando, Y., et al., Primary target cells of herpes simplex virus type 1 in the hippocampus. *Microbes Infect*, 2008.
73. Brandt, M.D. and A. Storch, [Neurogenesis in the adult brain: from bench to bedside?]. *Fortschr Neurol Psychiatr*, 2008. **76**(9): p. 517-29.
74. Wehner, R. and W. Gehring, *Zoologie*. Vol. 23. Auflage. 1995: Thieme Verlag.
75. Brosamle, C. and M.E. Schwab, Cells of origin, course, and termination patterns of the ventral, uncrossed component of the mature rat corticospinal tract. *J Comp Neurol*, 1997. **386**(2): p. 293-303.
76. Schwab, M.E. and D. Bartholdi, Degeneration and regeneration of axons in the lesioned spinal cord. *Physiol Rev*, 1996. **76**(2): p. 319-70.
77. Jacobs, W.B. and M.G. Fehlings, The molecular basis of neural regeneration. *Neurosurgery*, 2003. **53**(4): p. 943-48; discussion 948-50.
78. Wanner, I.B., et al., A new in vitro model of the glial scar inhibits axon growth. *Glia*, 2008. **56**(15): p. 1691-709.
79. Del Rio, J.A. and E. Soriano, Overcoming chondroitin sulphate proteoglycan inhibition of axon growth in the injured brain: lessons from chondroitinase ABC. *Curr Pharm Des*, 2007. **13**(24): p. 2485-92.
80. Bradbury, E.J., et al., Chondroitinase ABC promotes functional recovery after spinal cord injury. *Nature*, 2002. **416**(6881): p. 636-40.
81. Schwab, M.E. and P. Caroni, Oligodendrocytes and CNS myelin are nonpermissive substrates for neurite growth and fibroblast spreading in vitro. *J Neurosci*, 1988. **8**(7): p. 2381-93.
82. Huber, A.B. and M.E. Schwab, Nogo-A, a potent inhibitor of neurite outgrowth and regeneration. *Biol Chem*, 2000. **381**(5-6): p. 407-19.
83. Chen, M.S., et al., Nogo-A is a myelin-associated neurite outgrowth inhibitor and an antigen for monoclonal antibody IN-1. *Nature*, 2000. **403**(6768): p. 434-9.
84. Xie, F. and B. Zheng, White matter inhibitors in CNS axon regeneration failure. *Exp Neurol*, 2008. **209**(2): p. 302-12.
85. Kubo, T., et al., The therapeutic effects of Rho-ROCK inhibitors on CNS disorders. *Ther Clin Risk Manag*, 2008. **4**(3): p. 605-15.
86. Hallbook, F., et al., Gene functional analysis in nervous system. *Methods Enzymol*, 2000. **314**: p. 148-67.
87. Lanave, C., et al., Molecular evolution of the neurotrophin family members and their Trk receptors. *Gene*, 2007. **394**(1-2): p. 1-12.

88. Lindsay, R.M., et al., Neurotrophic factors: from molecule to man. *Trends Neurosci*, 1994. **17**(5): p. 182-90.
89. Bibel, M. and Y.A. Barde, Neurotrophins: key regulators of cell fate and cell shape in the vertebrate nervous system. *Genes Dev*, 2000. **14**(23): p. 2919-37.
90. Oppenheim, R.W., Cell death during development of the nervous system. *Annu Rev Neurosci*, 1991. **14**: p. 453-501.
91. Levi-Montalcini, R., The nerve growth factor 35 years later. *Science*, 1987. **237**(4819): p. 1154-62.
92. Levi-Montalcini, R., The saga of the nerve growth factor. *Neuroreport*, 1998. **9**(16): p. R71-83.
93. Knusel, B., et al., Regulated neurotrophin receptor responsiveness during neuronal migration and early differentiation. *J Neurosci*, 1994. **14**(3 Pt 2): p. 1542-54.
94. Barbacid, M., Neurotrophic factors and their receptors. *Curr Opin Cell Biol*, 1995. **7**(2): p. 148-55.
95. Huang, E.J. and L.F. Reichardt, Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci*, 2001. **24**: p. 677-736.
96. Chao, M., et al., Neurotrophin receptors: mediators of life and death. *Brain Res Brain Res Rev*, 1998. **26**(2-3): p. 295-301.
97. Patapoutian, A. and L.F. Reichardt, Trk receptors: mediators of neurotrophin action. *Curr Opin Neurobiol*, 2001. **11**(3): p. 272-80.
98. Barbacid, M., The Trk family of neurotrophin receptors. *J Neurobiol*, 1994. **25**(11): p. 1386-403.
99. Barbacid, M., Structural and functional properties of the TRK family of neurotrophin receptors. *Ann N Y Acad Sci*, 1995. **766**: p. 442-58.
100. Maness, L.M., et al., The neurotrophins and their receptors: structure, function, and neuropathology. *Neurosci Biobehav Rev*, 1994. **18**(1): p. 143-59.
101. Reichardt, L.F., Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2006. **361**(1473): p. 1545-64.
102. Klein, R., et al., Expression of the tyrosine kinase receptor gene *trkB* is confined to the murine embryonic and adult nervous system. *Development*, 1990. **109**(4): p. 845-50.
103. Valenzuela, D.M., et al., Alternative forms of rat TrkC with different functional capabilities. *Neuron*, 1993. **10**(5): p. 963-74.
104. Beck, K.D., et al., Induction of noncatalytic TrkB neurotrophin receptors during axonal sprouting in the adult hippocampus. *J Neurosci*, 1993. **13**(9): p. 4001-14.
105. Nishimura, T., et al., Potentiation of nerve growth factor-induced neurite outgrowth by fluvoxamine: role of sigma-1 receptors, IP3 receptors and cellular signaling pathways. *PLoS ONE*, 2008. **3**(7): p. e2558.
106. Dechant, G., et al., The neurotrophin receptor p75 binds neurotrophin-3 on sympathetic neurons with high affinity and specificity. *J Neurosci*, 1997. **17**(14): p. 5281-7.
107. Barker, P.A., p75NTR is positively promiscuous: novel partners and new insights. *Neuron*, 2004. **42**(4): p. 529-33.
108. Bibel, M., E. Hoppe, and Y.A. Barde, Biochemical and functional interactions between the neurotrophin receptors *trk* and p75NTR. *EMBO J*, 1999. **18**(3): p. 616-22.

109. Brennan, C., K. Rivas-Plata, and S.C. Landis, The p75 neurotrophin receptor influences NT-3 responsiveness of sympathetic neurons in vivo. *Nat Neurosci*, 1999. **2**(8): p. 699-705.
110. Blochl, A. and R. Blochl, A cell-biological model of p75NTR signaling. *J Neurochem*, 2007. **102**(2): p. 289-305.
111. Lee, R., et al., Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science*, 2001. **294**(5548): p. 1945-8.
112. Nykjaer, A., et al., Sortilin is essential for proNGF-induced neuronal cell death. *Nature*, 2004. **427**(6977): p. 843-8.
113. Yamashita, T., H. Higuchi, and M. Tohyama, The p75 receptor transduces the signal from myelin-associated glycoprotein to Rho. *J Cell Biol*, 2002. **157**(4): p. 565-70.
114. Wang, K.C., et al., P75 interacts with the Nogo receptor as a co-receptor for Nogo, MAG and OMgp. *Nature*, 2002. **420**(6911): p. 74-8.
115. Wong, S.T., et al., A p75(NTR) and Nogo receptor complex mediates repulsive signaling by myelin-associated glycoprotein. *Nat Neurosci*, 2002. **5**(12): p. 1302-8.
116. Mi, S., et al., LINGO-1 is a component of the Nogo-66 receptor/p75 signaling complex. *Nat Neurosci*, 2004. **7**(3): p. 221-8.
117. Mingorance, A., et al., Regeneration of lesioned entorhino-hippocampal axons in vitro by combined degradation of inhibitory proteoglycans and blockade of Nogo-66/NgR signaling. *FASEB J*, 2006. **20**(3): p. 491-3.
118. Freund, P., et al., Anti-Nogo-A antibody treatment enhances sprouting of corticospinal axons rostral to a unilateral cervical spinal cord lesion in adult macaque monkey. *J Comp Neurol*, 2007. **502**(4): p. 644-59.
119. Engelhardt, B. and R.M. Ransohoff, The ins and outs of T-lymphocyte trafficking to the CNS: anatomical sites and molecular mechanisms. *Trends Immunol*, 2005. **26**(9): p. 485-95.
120. Hickey, W.F., B.L. Hsu, and H. Kimura, T-lymphocyte entry into the central nervous system. *J Neurosci Res*, 1991. **28**(2): p. 254-60.
121. Schluessener, H.J. and H. Wekerle, Autoaggressive T lymphocyte lines recognizing the encephalitogenic region of myelin basic protein: in vitro selection from unprimed rat T lymphocyte populations. *J Immunol*, 1985. **135**(5): p. 3128-33.
122. Anderson, A.C., et al., High frequency of autoreactive myelin proteolipid protein-specific T cells in the periphery of naive mice: mechanisms of selection of the self-reactive repertoire. *J Exp Med*, 2000. **191**(5): p. 761-70.
123. Hickey, W.F., Leukocyte traffic in the central nervous system: the participants and their roles. *Semin Immunol*, 1999. **11**(2): p. 125-37.
124. Hickey, W.F. and H. Kimura, Graft-vs.-host disease elicits expression of class I and class II histocompatibility antigens and the presence of scattered T lymphocytes in rat central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1987. **84**(7): p. 2082-6.
125. Maikos, J.T. and D.I. Shreiber, Immediate damage to the blood-spinal cord barrier due to mechanical trauma. *J Neurotrauma*, 2007. **24**(3): p. 492-507.
126. Sandoval, K.E. and K.A. Witt, Blood-brain barrier tight junction permeability and ischemic stroke. *Neurobiol Dis*, 2008. **32**(2): p. 200-19.
127. Morganti-Kossmann, M.C., et al., Inflammatory response in acute traumatic brain injury: a double-edged sword. *Curr Opin Crit Care*, 2002. **8**(2): p. 101-5.
128. Babcock, A.A., et al., Chemokine expression by glial cells directs leukocytes to sites of axonal injury in the CNS. *J Neurosci*, 2003. **23**(21): p. 7922-30.

129. Schnell, L., et al., Lymphocyte recruitment following spinal cord injury in mice is altered by prior viral exposure. *Eur J Neurosci*, 1997. **9**(5): p. 1000-7.
130. Schnell, L., et al., Acute inflammatory responses to mechanical lesions in the CNS: differences between brain and spinal cord. *Eur J Neurosci*, 1999. **11**(10): p. 3648-58.
131. Bechmann, I., et al., Circulating monocytic cells infiltrate layers of anterograde axonal degeneration where they transform into microglia. *FASEB J*, 2005. **19**(6): p. 647-9.
132. Lunemann, A., et al., Macrophage/microglia activation factor expression is restricted to lesion-associated microglial cells after brain trauma. *Glia*, 2006. **53**(4): p. 412-9.
133. Chen, S., J.D. Pickard, and N.G. Harris, Time course of cellular pathology after controlled cortical impact injury. *Exp Neurol*, 2003. **182**(1): p. 87-102.
134. Hailer, N.P., A. Grampp, and R. Nitsch, Proliferation of microglia and astrocytes in the dentate gyrus following entorhinal cortex lesion: a quantitative bromodeoxyuridine-labelling study. *Eur J Neurosci*, 1999. **11**(9): p. 3359-64.
135. Hirschberg, D.L., et al., Accumulation of passively transferred primed T cells independently of their antigen specificity following central nervous system trauma. *J Neuroimmunol*, 1998. **89**(1-2): p. 88-96.
136. Moalem, G., et al., Autoimmune T cells protect neurons from secondary degeneration after central nervous system axotomy. *Nat Med*, 1999. **5**(1): p. 49-55.
137. Bechmann, I., et al., Presence of B7--2 (CD86) and lack of B7--1 (CD80) on myelin phagocytosing MHC-II-positive rat microglia is associated with nondestructive immunity in vivo. *FASEB J*, 2001. **15**(6): p. 1086-8.
138. Hendrix, S. and R. Nitsch, The role of T helper cells in neuroprotection and regeneration. *J Neuroimmunol*, 2007. **184**(1-2): p. 100-12.
139. Bechmann, I. and R. Nitsch, Plasticity following lesion: help and harm from the immune system. *Restor Neurol Neurosci*, 2001. **19**(3-4): p. 189-98.
140. Ransohoff, R.M., et al., Chemokines and chemokine receptors in model neurological pathologies: molecular and immunocytochemical approaches. *Methods Enzymol*, 1997. **287**: p. 319-48.
141. Ransohoff, R.M., Chemokines in neurological disease models: correlation between chemokine expression patterns and inflammatory pathology. *J Leukoc Biol*, 1997. **62**(5): p. 645-52.
142. Ransohoff, R.M., The chemokine system in neuroinflammation: an update. *J Infect Dis*, 2002. **186 Suppl 2**: p. S152-6.
143. Hanisch, U.K., Microglia as a source and target of cytokines. *Glia*, 2002. **40**(2): p. 140-55.
144. Streit, W.J., Microglia as neuroprotective, immunocompetent cells of the CNS. *Glia*, 2002. **40**(2): p. 133-9.
145. Merrill, J.E. and E.N. Benveniste, Cytokines in inflammatory brain lesions: helpful and harmful. *Trends Neurosci*, 1996. **19**(8): p. 331-8.
146. Panek, R.B. and E.N. Benveniste, Class II MHC gene expression in microglia. Regulation by the cytokines IFN-gamma, TNF-alpha, and TGF-beta. *J Immunol*, 1995. **154**(6): p. 2846-54.
147. Minghetti, L. and G. Levi, Microglia as effector cells in brain damage and repair: focus on prostanooids and nitric oxide. *Prog Neurobiol*, 1998. **54**(1): p. 99-125.

148. Kreutzberg, G.W., Microglia, the first line of defence in brain pathologies. *Arzneimittelforschung*, 1995. **45**(3A): p. 357-60.
149. Kreutzberg, G.W., Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci*, 1996. **19**(8): p. 312-8.
150. Hailer, N.P., et al., Adhesion molecule expression on phagocytic microglial cells following anterograde degeneration of perforant path axons. *Hippocampus*, 1997. **7**(3): p. 341-9.
151. Aloisi, F., et al., Relative efficiency of microglia, astrocytes, dendritic cells and B cells in naive CD4⁺ T cell priming and Th1/Th2 cell restimulation. *Eur J Immunol*, 1999. **29**(9): p. 2705-14.
152. Aloisi, F., F. Ria, and L. Adorini, Regulation of T-cell responses by CNS antigen-presenting cells: different roles for microglia and astrocytes. *Immunol Today*, 2000. **21**(3): p. 141-7.
153. Bechmann, I. and R. Nitsch, Astrocytes and microglial cells incorporate degenerating fibers following entorhinal lesion: a light, confocal, and electron microscopical study using a phagocytosis-dependent labeling technique. *Glia*, 1997. **20**(2): p. 145-54.
154. Bechmann, I. and R. Nitsch, Identification of phagocytic glial cells after lesion-induced anterograde degeneration using double-fluorescence labeling: combination of axonal tracing and lectin or immunostaining. *Histochem Cell Biol*, 1997. **107**(5): p. 391-7.
155. Konno, H., et al., Wallerian degeneration induces Ia-antigen expression in the rat brain. *J Neuroimmunol*, 1989. **25**(2-3): p. 151-9.
156. Stoll, G., B.D. Trapp, and J.W. Griffin, Macrophage function during Wallerian degeneration of rat optic nerve: clearance of degenerating myelin and Ia expression. *J Neurosci*, 1989. **9**(7): p. 2327-35.
157. Popovich, P.G., P. Wei, and B.T. Stokes, Cellular inflammatory response after spinal cord injury in Sprague-Dawley and Lewis rats. *J Comp Neurol*, 1997. **377**(3): p. 443-64.
158. Beyer, M., et al., Phagocytosis of neuronal or glial debris by microglial cells: upregulation of MHC class II expression and multinuclear giant cell formation in vitro. *Glia*, 2000. **31**(3): p. 262-6.
159. Cornet, A., et al., Role of astrocytes in antigen presentation and naive T-cell activation. *J Neuroimmunol*, 2000. **106**(1-2): p. 69-77.
160. Zeinstra, E., N. Wilczak, and J. De Keyser, Reactive astrocytes in chronic active lesions of multiple sclerosis express co-stimulatory molecules B7-1 and B7-2. *J Neuroimmunol*, 2003. **135**(1-2): p. 166-71.
161. Matsumoto, Y., K. Ohmori, and M. Fujiwara, Immune regulation by brain cells in the central nervous system: microglia but not astrocytes present myelin basic protein to encephalitogenic T cells under in vivo-mimicking conditions. *Immunology*, 1992. **76**(2): p. 209-16.
162. Meinl, E., et al., Multiple sclerosis. Immunomodulatory effects of human astrocytes on T cells. *Brain*, 1994. **117** (Pt 6): p. 1323-32.
163. Weber, F., et al., Human astrocytes are only partially competent antigen presenting cells. Possible implications for lesion development in multiple sclerosis. *Brain*, 1994. **117** (Pt 1): p. 59-69.
164. Gimsa, U., et al., Astrocytes protect the CNS: antigen-specific T helper cell responses are inhibited by astrocyte-induced upregulation of CTLA-4 (CD152). *J Mol Med*, 2004. **82**(6): p. 364-72.
165. Sedgwick, J.D., et al., Major histocompatibility complex-expressing nonhematopoietic astroglial cells prime only CD8⁺ T lymphocytes: astroglial

- cells as perpetuators but not initiators of CD4+ T cell responses in the central nervous system. *J Exp Med*, 1991. **173**(5): p. 1235-46.
166. Williams, K.C., et al., Antigen presentation by human fetal astrocytes with the cooperative effect of microglia or the microglial-derived cytokine IL-1. *J Neurosci*, 1995. **15**(3 Pt 1): p. 1869-78.
 167. Benveniste, E.N., Cytokines: influence on glial cell gene expression and function. *Chem Immunol*, 1997. **69**: p. 31-75.
 168. Hailer, N.P., et al., Fluorescent dye prelabelled microglial cells migrate into organotypic hippocampal slice cultures and ramify. *Eur J Neurosci*, 1997. **9**(4): p. 863-6.
 169. Aloisi, F., B. Serafini, and L. Adorini, Glia-T cell dialogue. *J Neuroimmunol*, 2000. **107**(2): p. 111-7.
 170. Aloisi, F., et al., CD40-CD154 interaction and IFN-gamma are required for IL-12 but not prostaglandin E2 secretion by microglia during antigen presentation to Th1 cells. *J Immunol*, 1999. **162**(3): p. 1384-91.
 171. Aloisi, F., et al., Functional maturation of adult mouse resting microglia into an APC is promoted by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interaction with Th1 cells. *J Immunol*, 2000. **164**(4): p. 1705-12.
 172. Weil, Z.M., et al., The injured nervous system: a Darwinian perspective. *Prog Neurobiol*, 2008. **86**(1): p. 48-59.
 173. Streit, W.J., S.A. Walter, and N.A. Pennell, Reactive microgliosis. *Prog Neurobiol*, 1999. **57**(6): p. 563-81.
 174. Kalb, R., The protean actions of neurotrophins and their receptors on the life and death of neurons. *Trends Neurosci*, 2005. **28**(1): p. 5-11.
 175. Jones, T.B., E.E. McDaniel, and P.G. Popovich, Inflammatory-mediated injury and repair in the traumatically injured spinal cord. *Curr Pharm Des*, 2005. **11**(10): p. 1223-36.
 176. Hohlfeld, R., et al., The neuroprotective effect of inflammation: implications for the therapy of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*, 2000. **107**(2): p. 161-6.
 177. Holmoy, T. and A.L. Hestvik, Multiple sclerosis: immunopathogenesis and controversies in defining the cause. *Curr Opin Infect Dis*, 2008. **21**(3): p. 271-8.
 178. Holmoy, T., The immunology of multiple sclerosis: disease mechanisms and therapeutic targets. *Minerva Med*, 2008. **99**(2): p. 119-40.
 179. Imam, S.A., et al., Increased calpain correlates with Th1 cytokine profile in PBMCs from MS patients. *J Neuroimmunol*, 2007. **190**(1-2): p. 139-45.
 180. Kroenke, M.A. and B.M. Segal, Th17 and Th1 responses directed against the immunizing epitope, as opposed to secondary epitopes, dominate the autoimmune repertoire during relapses of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurosci Res*, 2007. **85**(8): p. 1685-93.
 181. Nakajima, H., et al., Expression of TH1/TH2-related chemokine receptors on peripheral T cells and correlation with clinical disease activity in patients with multiple sclerosis. *Eur Neurol*, 2004. **52**(3): p. 162-8.
 182. Shaw, M.K., et al., Local delivery of interleukin 4 by retrovirus-transduced T lymphocytes ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med*, 1997. **185**(9): p. 1711-4.
 183. Gold, R., Combination therapies in multiple sclerosis. *J Neurol*, 2008. **255 Suppl 1**: p. 51-60.
 184. Weinstock-Guttman, B., M. Ramanathan, and R. Zivadinov, Interferon-beta treatment for relapsing multiple sclerosis. *Expert Opin Biol Ther*, 2008. **8**(9): p. 1435-47.

185. Kleinschnitz, C., S.G. Meuth, and P.H. Wiendl, The trials and errors in MS therapy. *Int MS J*, 2008. **15**(3): p. 79-90.
186. Wang, W.Z., et al., Myelin antigen reactive T cells in cerebrovascular diseases. *Clin Exp Immunol*, 1992. **88**(1): p. 157-62.
187. Kil, K., et al., T cell responses to myelin basic protein in patients with spinal cord injury and multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*, 1999. **98**(2): p. 201-7.
188. Muhallab, S., et al., Differential expression of neurotrophic factors and inflammatory cytokines by myelin basic protein-specific and other recruited T cells infiltrating the central nervous system during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Scand J Immunol*, 2002. **55**(3): p. 264-73.
189. Popovich, P.G., B.T. Stokes, and C.C. Whitacre, Concept of autoimmunity following spinal cord injury: possible roles for T lymphocytes in the traumatized central nervous system. *J Neurosci Res*, 1996. **45**(4): p. 349-63.
190. Jones, T.B., et al., Pathological CNS autoimmune disease triggered by traumatic spinal cord injury: implications for autoimmune vaccine therapy. *J Neurosci*, 2002. **22**(7): p. 2690-700.
191. Jones, T.B., et al., Passive or active immunization with myelin basic protein impairs neurological function and exacerbates neuropathology after spinal cord injury in rats. *J Neurosci*, 2004. **24**(15): p. 3752-61.
192. Gimsa, U., et al., Axonal damage induced by invading T cells in organotypic central nervous system tissue in vitro: involvement of microglial cells. *Brain Pathol*, 2000. **10**(3): p. 365-77.
193. Schwartz, M. and I.R. Cohen, Autoimmunity can benefit self-maintenance. *Immunol Today*, 2000. **21**(6): p. 265-8.
194. Schwartz, M. and Y. Ziv, Immunity to self and self-maintenance: a unified theory of brain pathologies. *Trends Immunol*, 2008. **29**(5): p. 211-9.
195. Hauben, E., et al., Passive or active immunization with myelin basic protein promotes recovery from spinal cord contusion. *J Neurosci*, 2000. **20**(17): p. 6421-30.
196. Moalem, G., et al., Autoimmune T cells retard the loss of function in injured rat optic nerves. *J Neuroimmunol*, 2000. **106**(1-2): p. 189-97.
197. Kipnis, J., et al., T cell immunity to copolymer 1 confers neuroprotection on the damaged optic nerve: possible therapy for optic neuropathies. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(13): p. 7446-51.
198. Fisher, J., et al., Vaccination for neuroprotection in the mouse optic nerve: implications for optic neuropathies. *J Neurosci*, 2001. **21**(1): p. 136-42.
199. Hauben, E., et al., Autoimmune T cells as potential neuroprotective therapy for spinal cord injury. *Lancet*, 2000. **355**(9200): p. 286-7.
200. Engwerda, C.R., B.S. Fox, and B.S. Handwerker, Cytokine production by T lymphocytes from young and aged mice. *J Immunol*, 1996. **156**(10): p. 3621-30.
201. Ernst, D.N., W.O. Weigle, and M.V. Hobbs, Aging and lymphokine production by T cell subsets. *Stem Cells*, 1993. **11**(6): p. 487-98.
202. Kariv, I., F.G. Ferguson, and F.L. Confer, Age- and strain-related differences in murine spleen cell responses to different activation signals. *Cell Immunol*, 1992. **140**(1): p. 67-80.
203. Sandmand, M., et al., Is ageing associated with a shift in the balance between Type 1 and Type 2 cytokines in humans? *Clin Exp Immunol*, 2002. **127**(1): p. 107-14.

204. Kipnis, J., et al., Neuronal survival after CNS insult is determined by a genetically encoded autoimmune response. *J Neurosci*, 2001. **21**(13): p. 4564-71.
205. Kwidzinski, E., et al., Self-tolerance in the immune privileged CNS: lessons from the entorhinal cortex lesion model. *J Neural Transm Suppl*, 2003(65): p. 29-49.
206. Gimsa, U., et al., Th2 cells support intrinsic anti-inflammatory properties of the brain. *J Neuroimmunol*, 2001. **119**(1): p. 73-80.
207. Wolf, S.A., et al., Differential expression of costimulatory molecules B7-1 and B7-2 on microglial cells induced by Th1 and Th2 cells in organotypic brain tissue. *Glia*, 2001. **36**(3): p. 414-20.
208. Wolf, S.A., et al., Neuroprotection by T-cells depends on their subtype and activation state. *J Neuroimmunol*, 2002. **133**(1-2): p. 72-80.
209. Meisel, C., et al., Central nervous system injury-induced immune deficiency syndrome. *Nat Rev Neurosci*, 2005. **6**(10): p. 775-86.
210. Prass, K., et al., Stroke-induced immunodeficiency promotes spontaneous bacterial infections and is mediated by sympathetic activation reversal by poststroke T helper cell type 1-like immunostimulation. *J Exp Med*, 2003. **198**(5): p. 725-36.
211. Haeusler, K.G., et al., Cellular immunodepression preceding infectious complications after acute ischemic stroke in humans. *Cerebrovasc Dis*, 2008. **25**(1-2): p. 50-8.
212. Dirnagl, U., et al., Stroke-induced immunodepression: experimental evidence and clinical relevance. *Stroke*, 2007. **38**(2 Suppl): p. 770-3.
213. Lu, D., et al., Atorvastatin reduces neurological deficit and increases synaptogenesis, angiogenesis, and neuronal survival in rats subjected to traumatic brain injury. *J Neurotrauma*, 2004. **21**(1): p. 21-32.
214. Pannu, R., et al., Attenuation of acute inflammatory response by atorvastatin after spinal cord injury in rats. *J Neurosci Res*, 2005. **79**(3): p. 340-50.
215. Sicotte, M., et al., Immunization with myelin or recombinant Nogo-66/MAG in alum promotes axon regeneration and sprouting after corticospinal tract lesions in the spinal cord. *Mol Cell Neurosci*, 2003. **23**(2): p. 251-63.
216. Schori, H., et al., Vaccination for protection of retinal ganglion cells against death from glutamate cytotoxicity and ocular hypertension: implications for glaucoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(6): p. 3398-403.
217. Goldberg, J.L. and B.A. Barres, The relationship between neuronal survival and regeneration. *Annu Rev Neurosci*, 2000. **23**: p. 579-612.
218. Kerschensteiner, M., et al., Activated human T cells, B cells, and monocytes produce brain-derived neurotrophic factor in vitro and in inflammatory brain lesions: a neuroprotective role of inflammation? *J Exp Med*, 1999. **189**(5): p. 865-70.
219. Ehrhard, P.B., et al., Expression of functional trk protooncogene in human monocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. **90**(12): p. 5423-7.
220. Ehrhard, P.B., et al., Expression of nerve growth factor and nerve growth factor receptor tyrosine kinase Trk in activated CD4-positive T-cell clones. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. **90**(23): p. 10984-8.
221. Santambrogio, L., et al., Nerve growth factor production by lymphocytes. *J Immunol*, 1994. **153**(10): p. 4488-95.
222. Moalem, G., et al., Production of neurotrophins by activated T cells: implications for neuroprotective autoimmunity. *J Autoimmun*, 2000. **15**(3): p. 331-45.

223. Sallach, S., Der Einfluß von aktivierten Th1- und Th2-Lymphozyten auf Reorganisationsprozesse im geschädigten ZNS, in FB Biologie, Chemie, Pharmazie. 2006, FU Berlin, http://www.diss.fu-berlin.de/diss/receive/FUDISS_thesis_000000002337: Berlin.
224. Hendrix, S., et al., T helper cells stimulate axon regeneration via interleukin-4 by modulating neurotrophin signaling. *Nat Med*, 2008. **in review**.
225. Okabe, M., et al., 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Lett*, 1997. **407**(3): p. 313-9.
226. Noben-Trauth, N., et al., An interleukin 4 (IL-4)-independent pathway for CD4+ T cell IL-4 production is revealed in IL-4 receptor-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**(20): p. 10838-43.
227. Kaplan, M.H., et al., Stat6 is required for mediating responses to IL-4 and for development of Th2 cells. *Immunity*, 1996. **4**(3): p. 313-9.
228. Klein, R., et al., Targeted disruption of the trkB neurotrophin receptor gene results in nervous system lesions and neonatal death. *Cell*, 1993. **75**(1): p. 113-22.
229. Berg, D.J., et al., Enterocolitis and colon cancer in interleukin-10-deficient mice are associated with aberrant cytokine production and CD4(+) TH1-like responses. *J Clin Invest*, 1996. **98**(4): p. 1010-20.
230. Oi, V.T., et al., Immunoglobulin gene expression in transformed lymphoid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1983. **80**(3): p. 825-9.
231. Hock, H., et al., Mechanisms of rejection induced by tumor cell-targeted gene transfer of interleukin 2, interleukin 4, interleukin 7, tumor necrosis factor, or interferon gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. **90**(7): p. 2774-8.
232. Li, W.Q., T. Diamantstein, and T. Blankenstein, Lack of tumorigenicity of interleukin 4 autocrine growing cells seems related to the anti-tumor function of interleukin 4. *Mol Immunol*, 1990. **27**(12): p. 1331-7.
233. Lohning, M., et al., Establishment of memory for IL-10 expression in developing T helper 2 cells requires repetitive IL-4 costimulation and does not impair proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(21): p. 12307-12.
234. Manz, R., et al., Analysis and sorting of live cells according to secreted molecules, relocated to a cell-surface affinity matrix. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. **92**(6): p. 1921-5.
235. Hasbold, J., et al., Quantitative analysis of lymphocyte differentiation and proliferation in vitro using carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester. *Immunol Cell Biol*, 1999. **77**(6): p. 516-22.
236. Heimrich, B. and M. Frotscher, Slice cultures as a model to study entorhinal-hippocampal interaction. *Hippocampus*, 1993. **3 Spec No**: p. 11-7.
237. Gahwiler, B.H., et al., Organotypic slice cultures: a technique has come of age. *Trends Neurosci*, 1997. **20**(10): p. 471-7.
238. Stoppini, L., et al., Sprouting and functional recovery in co-cultures between old and young hippocampal organotypic slices. *Neuroscience*, 1997. **80**(4): p. 1127-36.
239. Norberg, J., et al., Organotypic hippocampal slice cultures for studies of brain damage, neuroprotection and neurorepair. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord*, 2005. **4**(4): p. 435-52.
240. Hailer, N.P., J.D. Jarhult, and R. Nitsch, Resting microglial cells in vitro: analysis of morphology and adhesion molecule expression in organotypic hippocampal slice cultures. *Glia*, 1996. **18**(4): p. 319-31.
241. Frotscher, M., B. Heimrich, and T. Deller, Sprouting in the hippocampus is layer-specific. *Trends Neurosci*, 1997. **20**(5): p. 218-23.

242. Steup, A., et al., Semaphorin D acts as a repulsive factor for entorhinal and hippocampal neurons. *Eur J Neurosci*, 1999. **11**(2): p. 729-34.
243. Steup, A., et al., Sema3C and netrin-1 differentially affect axon growth in the hippocampal formation. *Mol Cell Neurosci*, 2000. **15**(2): p. 141-55.
244. Li, D., et al., Entorhinal axons project to dentate gyrus in organotypic slice co-culture. *Neuroscience*, 1993. **52**(4): p. 799-813.
245. Prang, P., D. Del Turco, and J.P. Kapfhammer, Regeneration of entorhinal fibers in mouse slice cultures is age dependent and can be stimulated by NT-4, GDNF, and modulators of G-proteins and protein kinase C. *Exp Neurol*, 2001. **169**(1): p. 135-47.
246. Li, D., et al., Axons regenerate with correct specificity in horizontal slice culture of the postnatal rat entorhino-hippocampal system. *Eur J Neurosci*, 1994. **6**(6): p. 1026-37.
247. Woodhams, P.L., D.J. Atkinson, and G. Raisman, Rapid decline in the ability of entorhinal axons to innervate the dentate gyrus with increasing time in organotypic co-culture. *Eur J Neurosci*, 1993. **5**(12): p. 1596-609.
248. Glumm, R., A. Kloting, and B. Heimrich, Development of the Hippocampal formation visualized with the b-Actin-GFP Transgenic Slices. *Neuroembryology*, 2002. **1**: p. 17-22.
249. Hechler, D., R. Nitsch, and S. Hendrix, Green-fluorescent-protein-expressing mice as models for the study of axonal growth and regeneration in vitro. *Brain Res Rev*, 2006. **52**(1): p. 160-9.
250. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 2001. **25**(4): p. 402-8.
251. Popovich, P.G. and T.B. Jones, Manipulating neuroinflammatory reactions in the injured spinal cord: back to basics. *Trends Pharmacol Sci*, 2003. **24**(1): p. 13-7.
252. Barouch, R. and M. Schwartz, Autoreactive T cells induce neurotrophin production by immune and neural cells in injured rat optic nerve: implications for protective autoimmunity. *FASEB J*, 2002. **16**(10): p. 1304-6.
253. Fee, D., et al., Activated/effector CD4⁺ T cells exacerbate acute damage in the central nervous system following traumatic injury. *J Neuroimmunol*, 2003. **136**(1-2): p. 54-66.
254. Schwartz, M., Harnessing the immune system for neuroprotection: therapeutic vaccines for acute and chronic neurodegenerative disorders. *Cell Mol Neurobiol*, 2001. **21**(6): p. 617-27.
255. Yang, L.J. and R.L. Schnaar, Axon regeneration inhibitors. *Neurol Res*, 2008. **30**(10): p. 1047-52.
256. Hata, K., et al., Signaling mechanisms of axon growth inhibition. *Drug News Perspect*, 2006. **19**(9): p. 541-7.
257. Schmitt, K.R., et al., S100B modulates IL-6 release and cytotoxicity from hypothermic brain cells and inhibits hypothermia-induced axonal outgrowth. *Neurosci Res*, 2007. **59**(1): p. 68-73.
258. Schmitt, K.R., et al., Hypothermia-induced neurite outgrowth is mediated by TNF-alpha. *Brain Pathology*, 2009. **under revision**.
259. Fitzgerald, K., et al., *The Cytokine Facts Book*. 2 ed. 2001, New York: Academic Press.
260. Araujo, D.M. and C.W. Cotman, Trophic effects of interleukin-4, -7 and -8 on hippocampal neuronal cultures: potential involvement of glial-derived factors. *Brain Res*, 1993. **600**(1): p. 49-55.

261. Rothwell, N.J. and S.J. Hopkins, Cytokines and the nervous system II: Actions and mechanisms of action. *Trends Neurosci*, 1995. **18**(3): p. 130-6.
262. Rothwell, N.J. and P.J. Strijbos, Cytokines in neurodegeneration and repair. *Int J Dev Neurosci*, 1995. **13**(3-4): p. 179-85.
263. Araujo, D.M., Contrasting effects of specific lymphokines on the survival of hippocampal neurons in culture. In *Treatment of Dementia* (ed. Meyer E.). 1992, New York: Plenum Press.
264. Kuhn, R., K. Rajewsky, and W. Muller, Generation and analysis of interleukin-4 deficient mice. *Science*, 1991. **254**(5032): p. 707-10.
265. Dohi, T., et al., Mice deficient in Th1- and Th2-type cytokines develop distinct forms of hapten-induced colitis. *Gastroenterology*, 2000. **119**(3): p. 724-33.
266. Volpert, O.V., et al., Inhibition of angiogenesis by interleukin 4. *J Exp Med*, 1998. **188**(6): p. 1039-46.
267. Hulshof, S., et al., Cellular localization and expression patterns of interleukin-10, interleukin-4, and their receptors in multiple sclerosis lesions. *Glia*, 2002. **38**(1): p. 24-35.
268. Liu, H., et al., In vivo expression of the interleukin 4 receptor alpha by astrocytes in epilepsy cerebral cortex. *Cytokine*, 2000. **12**(11): p. 1656-61.
269. Brodie, C., et al., Functional IL-4 receptors on mouse astrocytes: IL-4 inhibits astrocyte activation and induces NGF secretion. *J Neuroimmunol*, 1998. **81**(1-2): p. 20-30.
270. Schmitt, K.R., et al., Methylprednisolone attenuates hypothermia- and rewarming-induced cytotoxicity and IL-6 release in isolated primary astrocytes, neurons and BV-2 microglia cells. *Neurosci Lett*, 2006. **404**(3): p. 309-14.
271. Hechler, D., R. Nitsch, and S. Hendrix, Differential regulation of axon outgrowth and reinnervation by neurotrophin-3 and -4 in the hippocampal formation. *Experimental Brain Research*, 2009. **submitted**.
272. Brodie, C., Differential effects of Th1 and Th2 derived cytokines on NGF synthesis by mouse astrocytes. *FEBS Lett*, 1996. **394**(2): p. 117-20.
273. Awatsuji, H., et al., Interleukin-4 and -5 as modulators of nerve growth factor synthesis/secretion in astrocytes. *J Neurosci Res*, 1993. **34**(5): p. 539-45.
274. Awatsuji, H., et al., Interferons suppress nerve growth factor synthesis as a result of interference with cell growth in astrocytes cultured from neonatal mouse brain. *J Neurochem*, 1995. **64**(4): p. 1476-82.
275. Oren, A., et al., Production of neuroprotective NGF in astrocyte-T helper cell cocultures is upregulated following antigen recognition. *J Neuroimmunol*, 2004. **149**(1-2): p. 59-65.
276. Edling, A.E., et al., Human and murine lymphocyte neurotrophin expression is confined to B cells. *J Neurosci Res*, 2004. **77**(5): p. 709-17.
277. Goldberg, J.L., et al., Retinal ganglion cells do not extend axons by default: promotion by neurotrophic signaling and electrical activity. *Neuron*, 2002. **33**(5): p. 689-702.
278. Koizumi, S., et al., K-252a: a specific inhibitor of the action of nerve growth factor on PC 12 cells. *J Neurosci*, 1988. **8**(2): p. 715-21.
279. Ohmichi, M., et al., Inhibition of the cellular actions of nerve growth factor by staurosporine and K252A results from the attenuation of the activity of the trk tyrosine kinase. *Biochemistry*, 1992. **31**(16): p. 4034-9.
280. Soiampornkul, R., et al., Interleukin-1beta interferes with signal transduction induced by neurotrophin-3 in cortical neurons. *Brain Res*, 2008. **1188**: p. 189-97.

281. Tong, L., et al., Interleukin-1 beta impairs brain derived neurotrophic factor-induced signal transduction. *Neurobiol Aging*, 2008. **29**(9): p. 1380-93.
282. Birmingham, U.o.A.a. Spinalcord Injury Information Network, <http://www.spinalcord.uab.edu/>. [cited.
283. Hawryluk, G.W., et al., Protection and repair of the injured spinal cord: a review of completed, ongoing, and planned clinical trials for acute spinal cord injury. *Neurosurg Focus*, 2008. **25**(5): p. E14.
284. Miller, S.M., Methylprednisolone in acute spinal cord injury: a tarnished standard. *J Neurosurg Anesthesiol*, 2008. **20**(2): p. 140-2.
285. Kube, S.A. and N.J. Olby, Managing acute spinal cord injuries. *Compend Contin Educ Vet*, 2008. **30**(9): p. 496-504; quiz 504, 506.
286. Tsutsumi, S., et al., Effects of the Second National Acute Spinal Cord Injury Study of high-dose methylprednisolone therapy on acute cervical spinal cord injury-results in spinal injuries center. *Spine*, 2006. **31**(26): p. 2992-6; discussion 2997.
287. Gris, D., E.F. Hamilton, and L.C. Weaver, The systemic inflammatory response after spinal cord injury damages lungs and kidneys. *Exp Neurol*, 2008. **211**(1): p. 259-70.
288. Xu, W., et al., Increased production of reactive oxygen species contributes to motor neuron death in a compression mouse model of spinal cord injury. *Spinal Cord*, 2005. **43**(4): p. 204-13.
289. Bao, F., et al., Early anti-inflammatory treatment reduces lipid peroxidation and protein nitration after spinal cord injury in rats. *J Neurochem*, 2004. **88**(6): p. 1335-44.
290. Carlson, S.L., et al., Acute inflammatory response in spinal cord following impact injury. *Exp Neurol*, 1998. **151**(1): p. 77-88.
291. Kwon, B.K., et al., Hypothermia for spinal cord injury. *Spine J*, 2008. **8**(6): p. 859-74.
292. Fehlings, M.G. and D.C. Baptiste, Current status of clinical trials for acute spinal cord injury. *Injury*, 2005. **36 Suppl 2**: p. B113-22.
293. Meisel, C., et al., Preventive antibacterial treatment improves the general medical and neurological outcome in a mouse model of stroke. *Stroke*, 2004. **35**(1): p. 2-6.
294. Moreno-Flores, M.T. and J. Avila, The quest to repair the damaged spinal cord. *Recent Pat CNS Drug Discov*, 2006. **1**(1): p. 55-63.
295. Schwab, J.M., et al., Akute Rückenmarkverletzung: Experimentelle Strategien als Basis zukünftiger Behandlungen. *Deutsches Ärzteblatt*, 2004. **Jg. 101**(Heft 20): p. 1422-1438.
296. Tropea, D., M. Caleo, and L. Maffei, Synergistic effects of brain-derived neurotrophic factor and chondroitinase ABC on retinal fiber sprouting after denervation of the superior colliculus in adult rats. *J Neurosci*, 2003. **23**(18): p. 7034-44.
297. Lee, D.H., S.M. Strittmatter, and D.W. Sah, Targeting the Nogo receptor to treat central nervous system injuries. *Nat Rev Drug Discov*, 2003. **2**(11): p. 872-8.
298. Gonzenbach, R.R. and M.E. Schwab, Disinhibition of neurite growth to repair the injured adult CNS: focusing on Nogo. *Cell Mol Life Sci*, 2008. **65**(1): p. 161-76.
299. Schwab, M.E., Nogo and axon regeneration. *Curr Opin Neurobiol*, 2004. **14**(1): p. 118-24.

300. Schnell, L., et al., Neurotrophin-3 enhances sprouting of corticospinal tract during development and after adult spinal cord lesion. *Nature*, 1994. **367**(6459): p. 170-3.
301. Kishino, A., et al., BDNF prevents and reverses adult rat motor neuron degeneration and induces axonal outgrowth. *Exp Neurol*, 1997. **144**(2): p. 273-86.
302. Romero, M.I., et al., Functional regeneration of chronically injured sensory afferents into adult spinal cord after neurotrophin gene therapy. *J Neurosci*, 2001. **21**(21): p. 8408-16.
303. Burdick, J.A., et al., Stimulation of neurite outgrowth by neurotrophins delivered from degradable hydrogels. *Biomaterials*, 2006. **27**(3): p. 452-9.
304. Takumida, M. and M. Anniko, Brain-derived neurotrophic factor and nitric oxide synthase inhibitor protect the vestibular organ against gentamicin ototoxicity. *Acta Otolaryngol*, 2002. **122**(1): p. 10-5.
305. Marcol, W., et al., BDNF contributes to animal model neuropathic pain after peripheral nerve transection. *Neurosurg Rev*, 2007. **30**(3): p. 235-43; discussion 243.
306. Watson, J.J., S.J. Allen, and D. Dawbarn, Targeting nerve growth factor in pain: what is the therapeutic potential? *BioDrugs*, 2008. **22**(6): p. 349-59.
307. Bregman, B.S., et al., Intervention strategies to enhance anatomical plasticity and recovery of function after spinal cord injury. *Adv Neurol*, 1997. **72**: p. 257-75.
308. Liebscher, T., et al., Nogo-A antibody improves regeneration and locomotion of spinal cord-injured rats. *Ann Neurol*, 2005. **58**(5): p. 706-19.
309. Bregman, B.S., et al., Recovery from spinal cord injury mediated by antibodies to neurite growth inhibitors. *Nature*, 1995. **378**(6556): p. 498-501.
310. Basso, D.M., et al., Basso Mouse Scale for locomotion detects differences in recovery after spinal cord injury in five common mouse strains. *J Neurotrauma*, 2006. **23**(5): p. 635-59.
311. De Ryck, M., et al., Neocortical localization of tactile/proprioceptive limb placing reactions in the rat. *Brain Res*, 1992. **573**(1): p. 44-60.
312. Metz, G.A. and I.Q. Whishaw, Cortical and subcortical lesions impair skilled walking in the ladder rung walking test: a new task to evaluate fore- and hindlimb stepping, placing, and co-ordination. *J Neurosci Methods*, 2002. **115**(2): p. 169-79.
313. Ghirnikar, R.S., Y.L. Lee, and L.F. Eng, Inflammation in traumatic brain injury: role of cytokines and chemokines. *Neurochem Res*, 1998. **23**(3): p. 329-40.
314. Ghirnikar, R.S., et al., Chemokine expression in rat stab wound brain injury. *J Neurosci Res*, 1996. **46**(6): p. 727-33.
315. Lee, Y.L., et al., Cytokine chemokine expression in contused rat spinal cord. *Neurochem Int*, 2000. **36**(4-5): p. 417-25.
316. Glaser, J., et al., Neutralization of the chemokine CXCL10 reduces apoptosis and increases axon sprouting after spinal cord injury. *J Neurosci Res*, 2006. **84**(4): p. 724-34.
317. Gonzalez, R., et al., Therapeutic neutralization of CXCL10 decreases secondary degeneration and functional deficit after spinal cord injury in mice. *Regen Med*, 2007. **2**(5): p. 771-83.
318. Jones, T.B., R.P. Hart, and P.G. Popovich, Molecular control of physiological and pathological T-cell recruitment after mouse spinal cord injury. *J Neurosci*, 2005. **25**(28): p. 6576-83.

319. Inukai, Y., et al., Changes in expression of T-helper (Th) 1- and Th2-associated chemokine receptors on peripheral blood lymphocytes and plasma concentrations of their ligands, interferon-inducible protein-10 and thymus and activation-regulated chemokine, after antithyroid drug administration in hyperthyroid patients with Graves' disease. *Eur J Endocrinol*, 2007. **156**(6): p. 623-30.
320. Mikhak, Z., et al., Contribution of CCR4 and CCR8 to antigen-specific T(H)2 cell trafficking in allergic pulmonary inflammation. *J Allergy Clin Immunol*, 2009. **123**(1): p. 67-73 e3.
321. Cosmi, L., et al., Chemoattractant receptors expressed on type 2 T cells and their role in disease. *Int Arch Allergy Immunol*, 2001. **125**(4): p. 273-9.
322. Balestrieri, M.L., et al., Understanding the immunoangiostatic CXC chemokine network. *Cardiovasc Res*, 2008. **78**(2): p. 250-6.
323. Rice, T., et al., Characterization of the early neuroinflammation after spinal cord injury in mice. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2007. **66**(3): p. 184-95.
324. Yang, L., et al., Early expression and cellular localization of proinflammatory cytokines interleukin-1beta, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha in human traumatic spinal cord injury. *Spine*, 2004. **29**(9): p. 966-71.
325. Hauben, E., et al., Posttraumatic therapeutic vaccination with modified myelin self-antigen prevents complete paralysis while avoiding autoimmune disease. *J Clin Invest*, 2001. **108**(4): p. 591-9.
326. Wang, G., et al., Repeated epicutaneous exposures to ovalbumin progressively induce atopic dermatitis-like skin lesions in mice. *Clin Exp Allergy*, 2007. **37**(1): p. 151-61.
327. Cho, S.H., et al., Preferential binding of *Staphylococcus aureus* to skin sites of Th2-mediated inflammation in a murine model. *J Invest Dermatol*, 2001. **116**(5): p. 658-63.
328. Bohm, I. and R. Bauer, [Th1 cells, Th2 cells and atopic dermatitis]. *Hautarzt*, 1997. **48**(4): p. 223-7.
329. Akkoc, T., et al., Increased activation-induced cell death of high IFN-gamma-producing T(H)1 cells as a mechanism of T(H)2 predominance in atopic diseases. *J Allergy Clin Immunol*, 2008. **121**(3): p. 652-658 e1.
330. Spergel, J.M., et al., Roles of TH1 and TH2 cytokines in a murine model of allergic dermatitis. *J Clin Invest*, 1999. **103**(8): p. 1103-11.
331. van Beelen, A.J., et al., Interleukin-17 in inflammatory skin disorders. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 2007. **7**(5): p. 374-81.
332. Lowes, M.A., et al., Psoriasis vulgaris lesions contain discrete populations of Th1 and Th17 T cells. *J Invest Dermatol*, 2008. **128**(5): p. 1207-11.
333. Zaba, L.C., et al., Psoriasis is characterized by accumulation of immunostimulatory and Th1/Th17 cell-polarizing myeloid dendritic cells. *J Invest Dermatol*, 2009. **129**(1): p. 79-88.
334. Shibaki, A. and S.I. Katz, Induction of skewed Th1/Th2 T-cell differentiation via subcutaneous immunization with Freund's adjuvant. *Exp Dermatol*, 2002. **11**(2): p. 126-34.
335. Knight, A.K., et al., CD4 T cells activated in the mesenteric lymph node mediate gastrointestinal food allergy in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2007. **293**(6): p. G1234-43.
336. Kayhan, B., et al., Analysis of peripheral blood lymphocyte phenotypes and Th1/Th2 cytokines profile in the systemic immune responses of *Helicobacter pylori* infected individuals. *Microbiol Immunol*, 2008. **52**(11): p. 531-8.

337. Fan, X.G., et al., Enhanced T-helper 2 lymphocyte responses: immune mechanism of Helicobacter pylori infection. *Ir J Med Sci*, 1996. **165**(1): p. 37-9.
338. Bartnik, W., Clinical aspects of Helicobacter pylori infection. *Pol Arch Med Wewn*, 2008. **118**(7-8): p. 426-30.
339. Moalem, G., et al., Differential T cell response in central and peripheral nerve injury: connection with immune privilege. *FASEB J*, 1999. **13**(10): p. 1207-17.
340. Li, Q. and A.E. Chang, Adoptive T-cell immunotherapy of cancer. *Cytokines Cell Mol Ther*, 1999. **5**(2): p. 105-17.
341. Peres, E., et al., High-dose chemotherapy and adoptive immunotherapy in the treatment of recurrent pediatric brain tumors. *Neuropediatrics*, 2008. **39**(3): p. 151-6.
342. Hodi, F.S. and D.E. Fisher, Adoptive transfer of antigen-specific CD4+ T cells in the treatment of metastatic melanoma. *Nat Clin Pract Oncol*, 2008. **5**(12): p. 696-7.
343. Ramanathan, S., J. Gagnon, and S. Ilangumaran, Antigen-nonspecific activation of CD8+ T lymphocytes by cytokines: relevance to immunity, autoimmunity, and cancer. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 2008. **56**(5): p. 311-23.
344. Golz, G., et al., The cytokine/neurotrophin axis in peripheral axon outgrowth. *Eur J Neurosci*, 2006. **24**(10): p. 2721-30.
345. Batchelor, P.E., et al., Stimulation of axonal sprouting by trophic factors immobilized within the wound core. *Brain Res*, 2008. **1209**: p. 49-56.
346. Kwon, B.K., et al., Brain-derived neurotrophic factor gene transfer with adeno-associated viral and lentiviral vectors prevents rubrospinal neuronal atrophy and stimulates regeneration-associated gene expression after acute cervical spinal cord injury. *Spine*, 2007. **32**(11): p. 1164-73.
347. Blesch, A. and M.H. Tuszynski, Transient growth factor delivery sustains regenerated axons after spinal cord injury. *J Neurosci*, 2007. **27**(39): p. 10535-45.
348. Sekimoto, M., et al., Functional expression of the TrkC gene, encoding a high affinity receptor for NT-3, in antigen-specific T helper type 2 (Th2) cells. *Immunol Lett*, 2003. **88**(3): p. 221-6.

Publikationen

Paper

Hechler D., Nitsch R., Hendrix S.

Green-fluorescent-protein-expressing mice as models for the study of axonal growth and regeneration *in vitro*. Brain Res Rev. 2006 Aug 30;52(1):160-9. Epub 2006 Feb 23.

Hendrix S.*, **Hechler D.***, Gölz G.*, Voigt J.* et al.

T helper cells stimulate axon regeneration via interleukin-4 by modulating neurotrophin signalling. Nat Med. 2008 **in review**.

Hechler D., Nitsch R., Hendrix S.

Differential regulation of axon outgrowth and reinnervation by neurotrophin-3 and -4 in the hippocampal formation. Experimental Brain Research. 2009 **submitted**.

Schmitt, K.R., Boato F., Diestel A., **Hechler D.**, Kruglov A., Berger F. and Hendrix S. Hypothermia-induced neurite outgrowth is mediated by TNF-alpha. Brain Pathology. 2009 **under revision**.

Stein L., **Hechler D.**, Jessen A.B., Neumann K., Jessen H. and Beneke R.

The Sports Behaviour among HIV-infected Individuals versus Non-HIV-infected Individuals in a Berlin Cohort. Int. J. of STDs and AIDS. 2009 **in press**.

Poster und Vorträge

Hechler D., Nitsch R., Müller-Röver S.

Influence of T cell subsets on axonal ingrowth in an organotypic hippocampal slice coculture model. Berlin Brain Days 2004.

Hendrix S., Sallach S., Brandt C., Lüdecke D., Kwidzinski E., **Hechler D.**, Nitsch R.

T helper cells modulate axonal outgrowth and neurotrophin receptor expression after mechanical lesion of the CNS. 100th Joint Meeting of the European Anatomical Societies, Würzburg, Germany 2005.

Hechler D., Nitsch R., Hendrix S.

Differential effects of neurotrophin-3 and -4 on axonal outgrowth and ingrowth in vitro.
5th Forum of European Neuroscience Meeting, 2006 Vienna, A238.7

Hendrix S., Sallach S., **Hechler D.**, Ludecke D., Kwidzinski E., Peters E. M.,
Brandt C., Nitsch R.

T helper cells induce axonal outgrowth in vitro and in vivo by neurotrophin receptor
upregulation. 5th Forum of European Neuroscience Meeting, 2006 Vienna, A238.8

Hechler D.

T helper cells stimulate axonal outgrowth via IL-4. Talk on Berlin Brain days 2006

Rosenberger, K., **Hechler, D.**, Skreka, K., Nitsch, R., Hendrix S.

Interleukin-1-beta and neurotrophin-3 application for the treatment of spinal cord
injury. Berlin Neuroscience Forum 2008.

Boato, F., **Hechler D.**, Rosenberger K., Nitsch, R., Hendrix S.

Synergistic effects of IL-4 and IL-10 on axonal outgrowth and reinnervation.

Berlin Neuroscience Forum 2008.

Lebenslauf

„ Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus gründen des Datenschutzes nicht enthalten“

Berlin, den 23.09.2009

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Robert Nitsch danke ich für die Möglichkeit dieses interessante Forschungsthema zu bearbeiten, für die Betreuung, die guten Bedingungen sowie das erstellen des Erstgutachtens.

Herrn Prof. Dr. Thomas Blankenstein möchte ich herzlich für die spontane Übernahme des Zweitgutachtens und sein offenes Ohr danken.

Ein Dank geht auch an Herrn Prof. Dr. Sven Hendrix für die Betreuung der Arbeitsgruppe während meiner Forschung und für das Korrekturlesen der Arbeit.

Herrn Dr. Thomas Kammertöns möchte ich sehr danken für die Hilfe bei der Zusammenstellung meiner Prüfungskommission und der Hilfe bei den Experimenten mit den IL-4-Rezeptor-defizienten Mäusen und den Plasmazytomzellen.

Bei Frau Prof. Dr. Petra Knaus, Herrn Prof. Dr. Michael Knauß, Frau Dr. Christine Rückert und Herrn Dr. Ludwig Krabben möchte ich mich dafür bedanken, dass sie sich für meine Prüfungskommission zur Verfügung stellen.

Frau Dr. Lisa Schnell möchte ich zutiefst dafür danken, dass ich das Modell der Rückenmarkläsion so gut erlernen konnte und für ihre Hilfe bei der Korrektur der Arbeit. Außerdem möchte ich ihr für ihre ungetrübte Freude an der Wissenschaft und Freundschaft danken.

Ich möchte Frau Dr. Christine Brandt sehr für die aufmerksame Korrektur meiner Arbeit danken sowie für die tolle Freundschaft und die viele Zeit, die sie sich genommen hat.

Herrn Dr. Heiko Jessen und Frau Dr. Katja Schneider (geb. Duveneck) danke ich für das unermüdliche ausmerzen meiner Fehler.

Meiner Arbeitsgruppe (Steffi, Nora, Kathi, Peter, Karen, Francesco, Julia) sei gedankt für die Unterstützung und gute Arbeitsatmosphäre, wobei man sich keine bessere Büropartnerin als Greta und keine bessere menschliche und technische Unterstützung als von Doreen wünschen kann.

Großen Dank hat auch das gesamte Institut für Zell- und Neurobiologie für seine immerwährende Hilfsbereitschaft und vor allem Marni Pollrich verdient.

Ich danke meiner Mutter und meinen Freunden für ihre Liebe und ihre Geduld.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Daniel Hechler geboren am 05.08.1976 in Berlin, an Eides statt, dass ich die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unzulässige Hilfe angefertigt habe.

Berlin, den 2009

.....

Daniel Hechler

