

Max-Planck-Institut für Neurobiologie, Martinsried

Abteilung Neuromorphologie

(Direktor: apl. Prof. Dr. Dr.h.c. (MU Szeged) G. W. Kreutzberg)

**Integrine und Neuroglia –
Eine Familie von Zelladhäsionsmolekülen
und die Mikroglia-Aktivierung im zentralen Nervensystem**

Christian Ulrich Alexander Kloss

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation: 1. apl. Prof. Dr. Dr.h.c. (MU Szeged) G. W. Kreutzberg

2. Univ.-Prof. Dr. A. Konnerth (schriftliche Beurteilung)

2. Univ.-Prof. Dr. B. Conrad (mündliche Prüfung)

3. Univ.-Prof. Dr. J. Dudel (em.),

Ludwig-Maximilians-Universität München

Die Dissertation wurde am 23.03.2000 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 06.12.2000 angenommen.

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	8
1.1	Neurone, Glia und extrazelluläre Matrix im gesunden Gehirn	8
1.2	Die Integrine – eine Familie von Zelladhäsions-Molekülen	9
1.2.1	Struktur und Funktion	9
1.2.2	Integrine bei Erkrankungen des zentralen Nervensystems (ZNS)	11
1.3	Reaktion des zentralen Nervensystems auf Verletzung	16
1.3.1	Durchtrennung des Nervus facialis	16
1.3.1.1	Neuronale Reaktion nach Fazialis-Durchtrennung	18
1.3.1.2	Astrozytäre Reaktion nach Fazialis-Durchtrennung	19
1.3.1.3	Mikroglia-Reaktion nach Fazialis-Durchtrennung	21
1.3.2	Lipopolysaccharide	24
1.3.3	Signalmoleküle der Mikroglia-Aktivierung	26
1.4	Steuerung der Mikroglia-Proliferation	27
1.5	Mikroglia in der Zellkultur	29
1.6	Fragestellung der Arbeit	30
2	Methoden und Materialien	31
2.1	Integrine im gesunden und verletzten Nervensystem	31
2.1.1	Tiermodelle	32
2.1.1.1	Durchtrennung des Nervus facialis	32
2.1.1.2	Systemische Injektion von Lipopolysacchariden	35
2.1.2	Gewebsentnahme für lichtmikroskopische Immunhistochemie	36
2.1.3	Titration der Integrin-Antikörper mit DAB-Immunhistochemie	37
2.1.3.1	Titration in der Milz	37
2.1.3.2	Titration im Gehirn	40
2.1.4	Zeitverlauf der Integrin-Immunoreaktivität mit DAB/Co/Ni-Immunhistochemie	40

2.1.4.1	Lichtextinktion der digitalen Kamera	41
2.1.4.2	Immunhistochemie mit der DAB/Co/Ni-Methode	42
2.1.4.3	Messung der Färbeintensität, MEAN-SD Algorithmus	43
2.1.4.4	Statistische Auswertung des Zeitverlaufs der gesamten Integrin- Immunoreaktivität	44
2.1.5	Zelluläre Lokalisation und Zeitverlauf der Integrin-Immunoreaktivität mit Immunfluoreszenz-Doppelmarkierungen und konfokaler Laser-Scanning- Mikroskopie	45
2.1.5.1	Immunhistochemie mit Fluoreszenz-Doppelmarkierungen	46
2.1.5.2	Digitalisierung der Fluoreszenz im konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop und Autofluoreszenzextraktion	48
2.1.5.3	Messung des relativen Färbefaktoren der Immunfluoreszenz- Doppelfärbungen mit dem RISC-Algorithmus	52
2.1.5.4	Statistische Auswertung des Zeitverlaufs der zellulären Integrin- Immunoreaktivität	54
2.1.6	Zelluläre Lokalisation der Integrin-Immunoreaktivität mit Immunelektronenmikroskopie	54
2.1.6.1	Gewebsentnahme und -behandlung für Immunelektronenmikroskopie	54
2.1.6.2	Immunhistochemie für die Elektronenmikroskopie	55
2.2	Ramifizierte Mikroglia in Zellkultur	56
2.2.1	Anlage der Zellkulturen	56
2.2.1.1	Astrozyten aus der Ratte	57
2.2.1.2	Mikroglia aus der Maus	59
2.2.1.3	Ramifizierten Mikroglia in Kokultur	61
2.2.2	Integrin-Expression in ruhenden Kulturen von ramifizierter Mikroglia und nach Stimulation mit LPS	61
2.2.2.1	Immunzytochemie	62
2.2.2.2	Quantifizierung der Färbeintensität	62

2.2.2.3	Statistische Auswertung	63
2.2.3	Proliferationsstudien in Zellkultur	63
2.2.3.1	Stimulation der Kokulturen mit Zytokinen und neutralisierenden Antikörpern	63
2.2.3.2	Autoradiographie und Immunzytochemie	64
2.2.3.3	Bestimmung des Proliferationsindexes	65
2.2.3.4	Statistische Auswertung	65
2.2.3.5	Proliferation <i>in vivo</i> nach Fazialis-Durchtrennung	66
2.3	Materialien	67
2.3.1	Tiere	67
2.3.2	Zellkulturmaterialien und -zusätze	67
2.3.2.1	Zytokine für die Zellkultur	67
2.3.2.2	Neutralisierende Antikörper für die Zellkultur	67
2.3.3	Chemikalien	67
2.3.4	Antikörper, Tierseren und Immunoreagentien	68
2.3.5	Lösungen, Puffer, Kulturmedien	69
3	Ergebnisse	70
3.1	Integrine im Gehirn der Maus	70
3.1.1	Die Milz zum Nachweis der Integrin-Immunoreaktivität	70
3.1.2	Integrine im normalen Zentral-Nervensystem	73
3.1.3	Regulation von Integrinen im axotomierten Nucleus facialis	73
3.1.3.1	Zelluläre Lokalisation von Integrin-Untereinheiten	77
3.1.3.2	Quantitative Integrin-Immunoreaktivität auf Mikroglia und Endothelien	84
3.1.4	Integrine auf der Mikroglia im normalen Hirnstamm und nach LPS-Gabe	84
3.1.4.1	Mikroglia-Morphologie im dorsalen Hirnstamm	84
3.1.4.2	Mikroglia-Morphologie im LPS-stimulierten Hirnstamm	85
3.1.4.3	Integrin-Expression im normalen LPS-stimulierten Hirnstamm	89

3.2 Ramifizierte Mikroglia in Zellkultur	89
3.2.1 Morphologie der ramifizierten Mikroglia	89
3.2.2 Wirkung von LPS auf ramifizierte Mikroglia in Kultur	91
3.2.2.1 Morphologie von LPS-stimulierter Mikroglia <i>in vitro</i>	92
3.2.2.2 Integrin-Expression in LPS-stimulierten, Mikroglia-Zellkulturen	92
3.2.3 Effekt von Zytokinen und Wachstumsfaktoren auf die ramifizierte Mikroglia	96
3.2.3.1 Proliferation von ramifizierten Mikroglia in Kultur nach Stimulierung	97
3.2.3.2 Inhibition der Proliferation durch neutralisierende Antikörper	99
3.2.3.3 Morphologie der Zytokin-stimulierten Mikroglia	100
4 Diskussion	101
4.1 Integrine im normalen Nucleus facialis und nach Axotomie	101
4.1.1 Milz und Fazialis-Kern zum Nachweis der Integrin-Expression	101
4.1.2 Neuronale Integrine	103
4.1.2.1 Monophasischer Anstieg von $\beta 1$ -Integrinen auf Motoneuronen	103
4.1.2.2 Neuronale $\beta 1$ -Integrin-Rezeptoren für Laminin bei der Regeneration	103
4.1.3 Integrine auf aktivierter Mikroglia	105
4.1.3.1 Integrine bei der stadienspezifischen Mikroglia-Aktivierung	105
4.1.3.2 Biphasischer Anstieg von $\alpha M\beta 2$	106
4.1.3.3 Anstieg von $\alpha 5\beta 1$ und $\alpha 6\beta 1$ bei der Zielfindung und Adhäsion	107
4.1.3.4 Integrine auf Mikroglia bei der Phagozytose	108
4.1.4 Integrine auf Astrozyten	109
4.1.5 Integrine auf Leukozyten	110
4.1.6 Integrine auf Gefäßendothelien	111
4.1.7 Integrine im axotomierten Nucleus facialis	111
4.2 Proliferation ramifizierter Mikroglia in Zellkultur	112
4.2.1 Ramifizierte Mikroglia in Kokultur auf einen konfluenten Rasen von Astrozyten	113

4.2.2	Zytokineffekt auf Proliferation von ramifizierter Mikroglia und Makrophagen	113
4.2.3	Endogene Mitogene in der Kokultur	115
4.2.4	Zusammenfassung Zytokine und ramifizierte Mikroglia-Kokulturen	116
4.3	Mikroglia-Aktivierung durch Lipopolysaccharide	117
4.3.1	Mechanismus der Mikroglia-Aktivierung durch LPS	118
4.3.2	Staging der Mikroglia-Aktivierung anhand des Integrin-Musters	120
4.3.3	Signalmoleküle der LPS-induzierten Mikroglia-Aktivierung	120
4.3.4	Integrin-Regulation und Mikroglia-Morphologie nach LPS-Stimulation	121
4.3.5	LPS-Stimulation von ramifizierter Mikroglia in Kokultur	122
4.3.6	LPS und phagozytische Mikroglia	124
5	Zusammenfassung	126
6	Zitierte Literatur	128
7	Abkürzungen und Fremdwörter	146
8	Datenanhang	148
9	Abbildungen und Tabellen	153
	Tabellarischer Lebenslauf	155
	Eigene Veröffentlichungen	156
	Danksagung	157

1 Einleitung

1.1 *Neurone, Glia und extrazelluläre Matrix im gesunden Gehirn*

In ihrer Anzahl übersteigen Gliazellen die Neurone im zentralen Nervensystem von Säugern um ein Vielfaches. Während die Nervenzellen Träger der spezifischen Funktion des Gehirns sind, erfüllt die Neuroglia unter physiologischen Bedingungen eine Vielzahl von Hilfsfunktionen. Sie isolieren die Axone elektrisch durch Markscheiden (Oligodendroglia), halten das innere Milieu konstant, tauschen Nährstoffe mit dem Blut aus, sind an der Blut-Hirn-Schranke beteiligt (Astrozyten; Janzer und Raff, 1987; Tsacopoulos und Magistretti, 1996) und gehören zum intrinsischen Immunsystem des ZNS (Mikroglia; Kreutzberg, 1995a, 1996; Raivich et al., 1999). In der Neuropathologie haben die Gliazellen eine zentrale Bedeutung. Die meisten hirneigenen Tumore gehen von der Neuroglia aus. Sie ist an infektiösen und autoimmunen Entzündungen, direktem und indirektem Trauma sowie ischämischen, toxischen und degenerativen Erkrankungen beteiligt (Streit et al., 1988; Eddleston und Mucke, 1993; Norenberg, 1994; Perry et al., 1995; Kreutzberg, 1996).

Die namensgebende Funktion der Glia ist aber das "Leimen" des Hirngewebes (griechisch "ἡ γλία" der Leim, vgl. das stammverwandte, deutsche Wort "Kleber"). Neben den für nervales Gewebe typischen Gliazellen bildet die extrazelluläre Matrix (EZM) den anderen Teil der stützenden Bausubstanz des ZNS (Carbonetto, 1984). Im zentralen Nervensystem sind die zwischenzelligen Spalträume nahezu überall nur 20 nm weit, und damit gibt es dort im Vergleich zu extrazerebralen Geweben nur sehr wenig extrazelluläre Matrix. Trotzdem kommt ihr besonders in der Embryogenese des Nervensystems eine große Bedeutung zu, unter anderem als Leitstrukturen für die wandernden Zellen (Erickson und Bourdon, 1989; Reichardt und Tomaselli, 1991; Martini, 1994; Crossin, 1996; Fässler et al., 1996; Pearlman und Sheppard, 1996). Im adulten Nervensystem ist noch wenig über ihre normale und pathophysiologische Funktion bekannt.

Die Zellen des Nervensystems machen mit der EZM und untereinander über Zelladhäsionsmoleküle Kontakt. Diese Verbindung muß stark genug sein, um das Gewebe

zu "leimen", und gleichzeitig plastisch genug, um im pathologischen Fall leicht moduliert werden zu können. Die strukturelle Veränderung des Zellverbandes ist ein wichtiger Teil der Reaktion des Nervensystems auf Verletzung und Voraussetzung für die Wahrung der Integrität und eine erfolgreiche Wiederherstellung der Funktion des Gehirns. Von regenerativen Vorgängen ist bekannt, daß häufig molekulare Mechanismen wiederauftreten, die bereits während der Entwicklung eine Rolle gespielt haben (Westerfield, 1987; Miller et al., 1989; Tetzlaff et al., 1991; Lefcort et al., 1992; Martini, 1994; Sakaguchi und Radke, 1996; Cotman et al., 1998). Es liegt also nahe, daß an der Entwicklung beteiligte Zelladhäsionsmoleküle auch eine Rolle bei de- und regenerativen Vorgängen nach Verletzung des zentralen Nervensystems spielen können.

1.2 Die Integrine – eine Familie von Zelladhäsions-Molekülen

1.2.1 Struktur und Funktion

Die Integrine stellen neben Cadherinen, Immunglobulinen und Selektinen eine vierte, große Gruppe von Zelladhäsionsmolekülen dar. Sie bilden eine Familie von membranständigen Glykoproteinen und interagieren mit Liganden auf anderen Zellen und mit der extrazellulären Matrix. Jedes vollständige Integrin besteht aus einem nicht-kovalent gebundenen Heterodimer von einer α - und einer β -Untereinheit mit jeweils einer großen extrazellulären, einer membranspannenden und in den meisten Fällen einer zytoplasmatischen Domäne (Abbildung 1, Seite 10; Übersichten bei Ruoslahti, 1991; Hynes, 1992; Albeda und Buck, 1994; Eble, 1997; Kim und Yamada, 1997; Aplin et al., 1998). Bei Vertebraten gibt es wenigstens 16 verschiedene α - und 8 verschiedene β -Integrin-Untereinheiten, die mehr als 20 Integrin-Heterodimere bilden können. Die $\alpha\beta$ -Paarung legt die Spezifität für die Liganden fest, oft sind das große EZM-Moleküle wie Kollagen, Laminin, Fibronectin, Tenascin und Thrombospondin (Abbildung 2, Seite 12; Eble, 1997). Manche Integrine erkennen aber auch kurze Peptidsequenzen in großen Proteinen, z.B. das RGD-Motiv (Arginin-Glyzin-Aspartat) im Fibronectin und Vitronectin (Ruoslahti, 1996b), oder sie binden Adhäsionsmoleküle auf

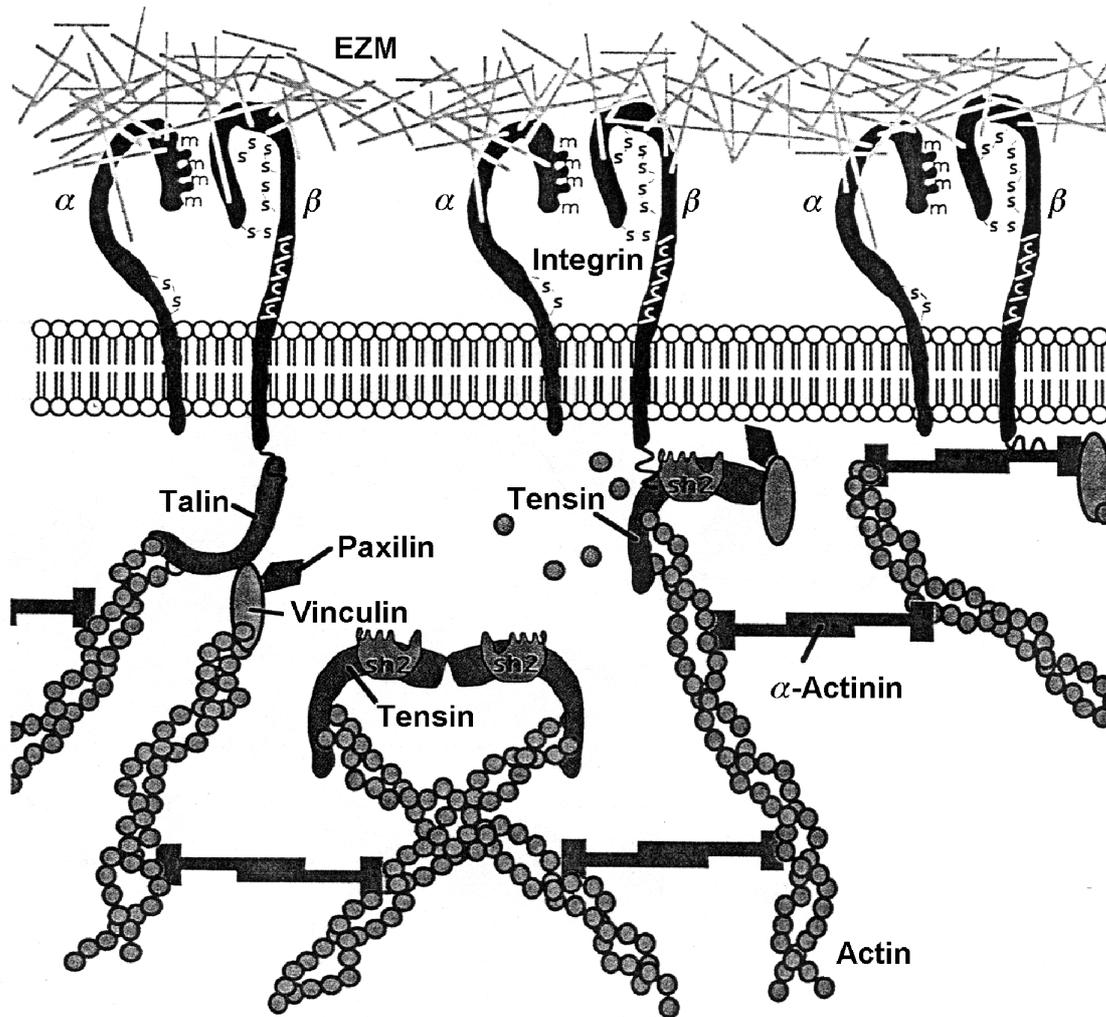


Abbildung 1. Struktur und Interaktionen eines idealtypisches Integrin. Das modellhaft dargestellte Integrindimer besteht aus einer α - und einer β -Untereinheit; mutmaßlich metallbindende Domänen sind mit "m" bezeichnet, Cystein-Wiederholungen mit "c" und tertiärstrukturbildende Querverbindungen mit "s". Der größere, extrazelluläre Teil des Glykoproteins interagiert mit vielen Komponenten der extrazellulären Matrix (EZM) wie Kollagen, Laminin, Fibronectin, Tenascin. Der kleinere, intrazelluläre Anteil bindet über intermediäre Proteine wie Talin, α -Actinin, Tensin und Vinculin in variablen Kombinationen letztlich an das Actin des Zytoskeletts. Die dargestellten Interaktionen sind hauptsächlich in extrazerebralen Gewebe bekannt, im Gehirn ist bislang wenig über diese Assoziation erforscht.
modifiziert nach Jones, 1996.

anderen Zellen wie z.B. den β 2-Integrin-Liganden interzelluläres Adhäsionsmolekül (ICAM; Eble, 1997). Auf der zytoplasmatischen Seite sind Integrine häufig an Moleküle des Zytoskeletts wie z.B. Talin, α -Actinin, Tensin, Vinculin, Paxillin und Filamin gekoppelt und aggregieren oft in sogenannten "fokale Adhäsionspunkte", die die Anheftung der Zelle an die EZM gewährleisten (Abbildung 1, Seite 10; Aplin et al., 1998). Neben der strukturellen Funktion sind die Integrine durch mögliche Konformationsänderungen auch an der transzellulären Signalübermittlung beteiligt (Damsky und Werb, 1992; Schwartz et al., 1995; Akiyama, 1996; Ruoslahti, 1996a; Martin und Sanes, 1997; Newton et al., 1997; Aplin et al., 1998). Der zytoplasmatische Integrinteil kann Kinasen wie die Tyrosinkinase "focal adhesion kinase" (FAK), die "mitogen-activated protein kinase cascade" (MAPK) oder die Rho Familie der Guanosin-5'-Triphosphatasen aktivieren und damit Signale über ein komplexes System von zwischengeschalteten Botenmolekülen an die Zelle weitergeben ("outside-in signaling"). In der anderen Richtung können auch Signale aus der Zelle "von innen heraus" die Rezeptoraffinität regulieren ("inside-out signaling"; Hynes, 1992; O'Toole et al., 1994; Humphries, 1996).

Seit der ersten Beschreibungen der Integrine vor etwa eineinhalb Jahrzehnten (Tamkun et al., 1986) wurde früh ihre Bedeutung in der Entwicklung und für die Zelldifferenzierung erkannt (Bronner-Fraser, 1987; Terpe et al., 1994; Prieto et al., 1994; Etzioni, 1994; Sheppard et al., 1994; Fässler und Meyer, 1995; Fässler et al., 1995, 1996; Einheber et al., 1996; Kil und Bronner-Fraser, 1996; Velling et al., 1996; Cousin et al., 1997; Murase und Hayashi, 1998a, b). Bald wurde auch eine immer weiter wachsende Anzahl von Krankheiten identifiziert, bei denen Integrine eine Rolle spielen (Mazzone und Ricevuti, 1995; Akiyama et al., 1995; Hillis und Macleod, 1997).

1.2.2 Integrine bei Erkrankungen des zentralen Nervensystems (ZNS)

Neuere Befunde deuten auf eine breitgefächerte Rolle der Integrine in der Neuropathologie hin (Übersicht siehe Tabelle I, Seite 15). Eine Vielzahl von Untersuchungen hat eine große Menge an sich teils widersprechenden Einzelbefunden erhoben.

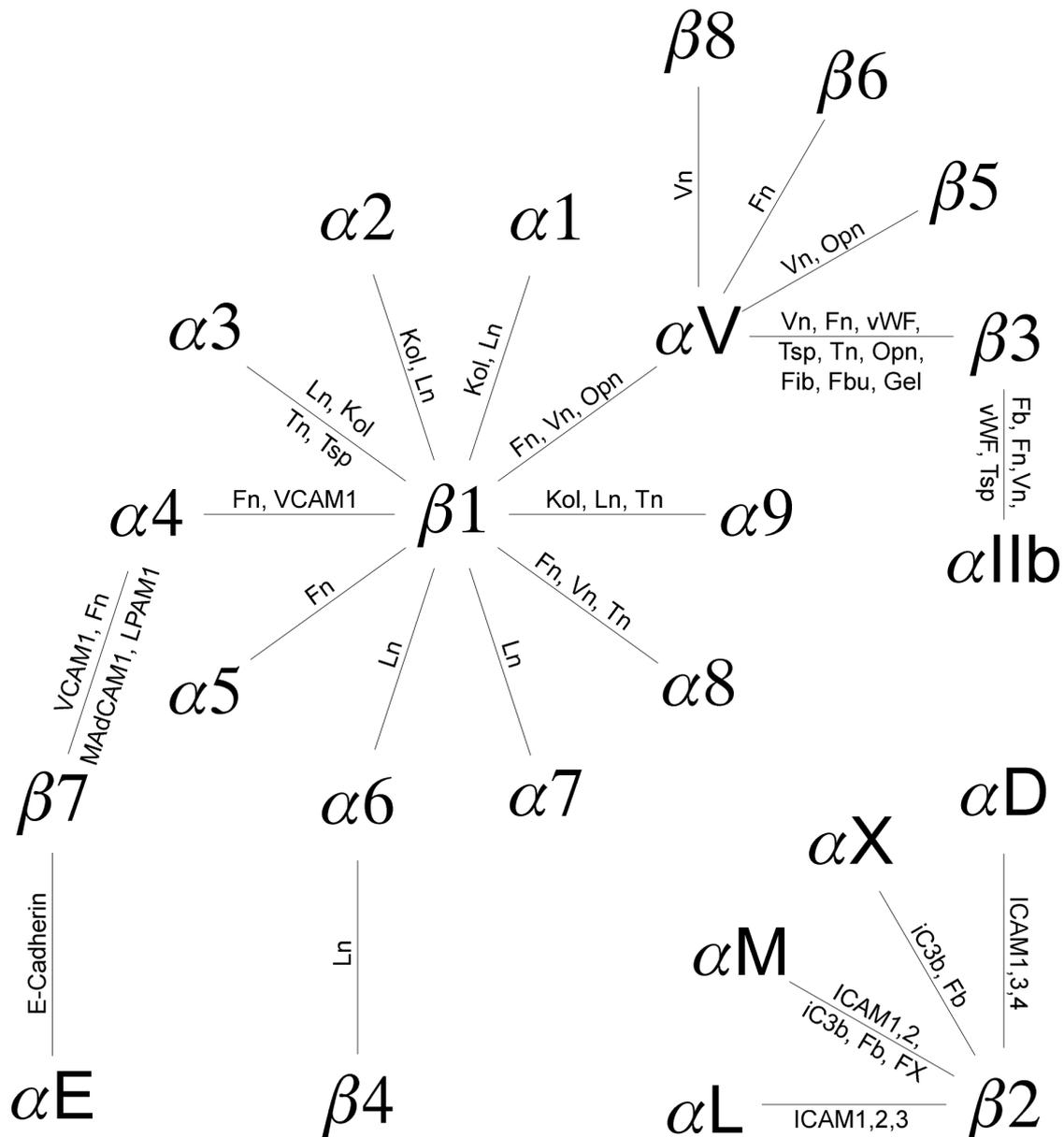


Abbildung 2. Heterodimerisierung der Integrin-Untereinheiten. Integrinuntereinheiten, mögliche Kombinationen von Untereinheiten und Liganden der bekannten $\alpha\beta$ -Heterodimere.
Abkürzungen für die Liganden: Fb Fibrinogen, Fbu Fibulin, Fib Fibrillin, Fn Fibronectin, FX Faktor X, Gel Gelatine, iC3b inaktiver Komplementfaktor 3b, ICAM Interzelluläres Adhäsionsmolekül, Kol Kollagen, Ln Laminin, LPAM "leukocyte Peyer's patch HEV adhesion molecule", MAdCAM "mucosal addressin cell adhesion molecule", Opn Osteopontin, Tn Tenascin, Tsp Thrombospondin, VCAM vaskuläres Zelladhäsionsmolekül, Vn Vitronectin, vWF von Willebrand-Factor.

Bei der **zerebralen Ischämie und Reperfusion** kommt es zu einer Regulation von Integrinen auf Mikrogliazellen, Astrozyten, Gefäßendothelien sowie infiltrierenden und frei zirkulierenden Lymphozyten (Kim et al., 1995; Kato et al., 1996; Okada et al., 1996; Yoshimoto et al., 1996; Wagner et al., 1997; Ellison et al., 1998; Abumiya et al., 1999). Pharmakologische oder genetische Ausschaltung der $\beta 2$ -Integrine verringert die Infarktgröße, wobei ein günstiger Effekt auf die Leukozytenextravasation und die Apoptose angenommen wird (Clark et al., 1991; Chen et al., 1994; Chopp et al., 1994; Zhang et al., 1995; Chopp et al., 1996; Yenari et al., 1998; Soriano et al., 1999). Auch in der Prävention des Schlaganfalls ermöglicht die Inhibition des Plättchen-Integrins $\alpha IIb\beta 3$ (Glykoprotein IIb-IIIa) eine vielfach stärkere Plättchen-Aggregationshemmung als die Hemmung der Zyklooxygenase durch Azetylsalizylsäure oder von Adenosinrezeptoren durch Clopidogrel (Coller et al., 1995; Mousa et al., 1997; Kaku et al., 1998; Choudhri et al., 1998). Schließlich ist die hohe Expression des $\alpha 2\beta 1$ -Integrins (Plättchenkollagen-Rezeptor Glykoprotein I_{IIa}) ein unabhängiger Risikofaktor für einen Schlaganfall bei jüngeren Patienten (Carlsson et al., 1999).

Bei Autoimmunerkrankungen des ZNS wie der **Multiplen Sklerose (MS)** bzw. der experimentellen Autoimmunenzephalitis (EAE) findet sich eine Integrin-Regulation auf Mikroglia, Astrozyten, Oligodendrozyten, Gefäßendothelien, einwandernden und zirkulierenden Lymphozyten (Sobel et al., 1995; Bo et al., 1996; Previtali et al., 1997, 1998; Sobel et al., 1998). Hier hatte eine Blockierung der für die Leukozyteninfiltration wichtigen Integrine $\alpha M\beta 2$, $\alpha L\beta 2$ und $\alpha 4\beta 1$ in vielen Versuchen einen günstigen Effekt auf den experimentellen Krankheitsverlauf (Yednock et al., 1992; Huitinga et al., 1993; Kent et al., 1995; Gordon et al., 1995; Soilu-Hanninen et al., 1997; Graesser et al., 1998; Archelos et al., 1999).

Unter den **Neoplasmen** exprimieren vor allem Gliome eine Vielzahl von Integrinen und das Expressionsmuster verändert ihr Invasionsverhalten (Rossino et al., 1991; Bozzo et al., 1994; Carmeliet et al., 1994; Giese und Westphal, 1996; Gladson et al., 1996; Goldbrunner et al., 1998; Tonn et al., 1998; Giese et al., 1998; Goldbrunner et al., 1999). Hier wird eine

Beeinflussung der Neoangiogenese über Integrine als neues Therapieprinzip diskutiert (Mousa, 1999).

Wie bei systemischen Infektionen so spielen auch bei bakteriellen, viralen (z.B. HIV), plasmodialen (z.B. Malaria) oder parasitären (z.B. Toxoplasmose) **Neuroinfektionen** leukozytäre Integrine eine wichtige Rolle für das Anheften, Rollen und die Transmigration von Blutleukozyten (Parent und Eichacker, 1900; Larson und Springer, 1990; Hemler, 1990; Rosen und Gordon, 1990; Hommel, 1993; Mazzone und Ricevuti, 1995; Gahmberg et al., 1997; Newton et al., 1997; Weeks, 1998). Der Leukozyten-Adhäsionsdefizienz Typ I, einem Krankheitsbild mit Neigung zu bakteriellen Infektionen, liegt sogar ein genetisches Fehlen der $\beta 2$ -Integrin-Untereinheit zugrunde (Etzioni, 1994). Bei experimentell ausgelösten, limbischen **Krampfanfällen** konnte ein Anstieg von $\beta 1$ -mRNA in Neuronen und Astrozyten gezeigt werden (Pinkstaff et al., 1998). Auch bei der **Alzheimerschen Demenz** findet sich eine Hochregulation von Integrinen in Plaques und auf Mikroglia (Akiyama und McGeer, 1990; Akiyama et al., 1991; McGeer et al., 1993; Eikelenboom et al., 1994; van Gool et al., 1994).

Trotz der Vielzahl der Einzelbefunde bei ganz unterschiedlichen zerebralen Erkrankungen fehlt für ein besseres Verständnis der Integrin-Funktion auf zellulärer Ebene eine umfassende Studie an einer größeren Zahl von Integrin-Untereinheiten in einem pathologisch gut definierten Modell. Die vorliegende Arbeit, versucht hierzu einen Beitrag zu leisten und untersucht die Integrin-Expression im Nucleus facialis der Maus nach peripherer Durchtrennung des Nervus facialis, einem sehr gut erforschten Modell für zentralnervöse Degeneration und Regeneration. In weiteren Versuchen wird dann die Reaktion der Integrin-Expression nach Stimulation mit Lipopolysaccharide (LPS) in lebenden Mäusen und in kultivierten Mikrogliazellen untersucht.

Tabelle I. Regulation von Integrinen bei Erkrankungen des ZNS

Integrin	Lokalisation	Spezies	Quelle
Ischämie und Reperfusion			
α M β 2 ↑	Mikroglia um Infarkt	Ratte	Kato et al., 1996
α 6 β 4 ↓	perivaskuläre Astrozyten	Pavian	Wagner et al., 1997
α V β 3 ↑	Astrozyten am Infarkttrand	Ratte	Ellison et al., 1998
α V β 3 ↑	Gefäßendothelien	Pavian	Okada et al., 1996; Abumiya et al., 1999
α L β 2 ↑	infiltrierende Lymphozyten	Ratte	Kato et al., 1996; Yoshimoto et al., 1996
α L β 2 ↑	peripheren Lymphozyten	Mensch	Kim et al., 1995
Multiple Sklerose (MS) und experimentelle Autoimmunenzephalitis (EAE)			
α V ↑, β 3 ↑	aktivierte Mikroglia	Mensch	Sobel et al., 1995
α V ↑, β 4 ↑	Astrozyten in aktiven Läsionen	Ratte	Previtali et al., 1997
α 2 ↑	Oligodendrozyten in aktiven Läsionen	Ratte	Previtali et al., 1997
α V ↑, β 3 ↑, α 1 ↑, α 6 ↓, β 1 ↓	Gefäßendothelien in aktiven Läsionen	Mensch	Sobel et al., 1995, 1998
α 1 ↑	Gefäßendothelien in inaktiven Läsionen	Mensch	Sobel et al., 1998
α L β 2 ↑	infiltrierende Leukozyten und Monozyten, aktivierte Mikroglia	Mensch	Bo et al., 1996
α 3 ↑, α 4 ↑, α 5 ↑, α L ↑	T-Lymphozyten im Liquor cerebrospinalis	Mensch	Svenningsson et al., 1993
α 4, β 4	enzephalitogene T-Lymphozyten	Maus	Baron et al., 1993; Engelhardt et al., 1998
α 4 ↓, α 5 ↓, β 2 ↓	periphere T-Lymphozyten	Mensch	Svenningsson et al., 1993; Vora et al., 1996
α L β 2 ↑	periphere Leukozyten	Mensch	Lou et al., 1997; Ziaber et al., 1998
Neoplasmen			
α 2 ↑, α 3 ↑, α 5 ↑, α 6 ↑, β 1 ↑, α V ↑, β 3 ↑	Glioblastoma multiforme	Mensch	Gingras et al., 1995
α 2 β 1 ↑, α 4 β 1 ↑, α 6 β 1 ↓, α V β 3, β 4 ↓	Gefäßendothelien im GBM	Mensch	Paulus et al., 1993; Gingras et al., 1995; Gladson, 1996
α 3 ↑	Glioblastom, Medulloblastom	Mensch	Kishima et al., 1999
α 3 ↑, β 1 ↑, α 5, α V ↑, β 3 ↑, β 4 ↓, β 5 ↑	neoplastische Astrozyten	Mensch	Paulus et al., 1993; Gladson et al., 1995; Previtali et al., 1996
α 6 ↑, β 4 ↑	reaktive und neoplastische Astrozyten	Ratte	Previtali et al., 1999
β 4 ↓	Gefäßendothelien im Astrozytom	Mensch	Previtali et al., 1996
α L, α M, α X, α 3, α 4, α 5, α 4, β 1, β 2, β 7	Primäres ZNS-Lymphom	Mensch	Paulus und Jellinger, 1993
α L ↑, β 2 ↑	zerebrale Lymphome	Mensch / Maus	Bashir et al., 1992
α 2 ↑, α 4 ↑, α 6 ↑	Meningeome	Mensch	Figarella-Branger et al., 1997
Neuroinfektionen			
α 4 β 1	AIDS Enzephalitis: Monozyten-Rekrutierung	Rhesusaffe	Sasseville et al., 1994
α 4, α L β 2 ↑	T-Lymphozyten bei lymphozytischen Chromeningitisvirus	Maus	Christensen et al., 1995; Andersson et al., 1995
Krampfanfälle			
β 1 ↑	Neurone und Astrozyten bei limbischen Anfällen	Ratte	Pinkstaff et al., 1998
Alzheimersche Demenz			
α M β 2 ↑, α L β 2 ↑, α V ↑	Mikroglia	Mensch	Akiyama et al., 1991; McGeer et al., 1993; Akiyama et al., 1993; Eikelenboom et al., 1994
α 4 ↑	neuritische Plaques	Mensch	van Gool et al., 1994
α 3, α 6, β 1	amyloide Plaques	Mensch	Eikelenboom et al., 1994

1.3 Reaktion des zentralen Nervensystems auf Verletzung

Eine akute Verletzung des Nervensystems löst ein komplexes Netzwerk von morphologischen, metabolischen und funktionellen Veränderungen aus, die letztlich darauf abzielen, eine weitere Schädigung zu verhindern und im günstigen Falle die Funktion wiederherzustellen. Die verletzten Nervenzellen aktivieren ein Notprogramm, ändern ihre Genexpression und stimulieren umgebene Mikrogliazellen und Astrozyten (Grafstein und McQuarrie, 1978; Barron, 1983; Streit et al., 1989a; Kreutzberg, 1995b; Raivich et al., 1995, 1996; Kreutzberg und Raivich, 1999). Die Mikroglia reagiert auf unterschiedliche Schädigungsmechanismen gleichförmig mit einer abgestuften, stereotypen Antwort (Raivich et al., 1999). Ihre Aktivierung wird von der Produktion von proinflammatorischen Zytokinen, Endothelveränderungen und der Rekrutierung von Immunzellen ins verletzte Gewebe begleitet (Raivich et al., 1998b). Die Einheitlichkeit der Glia-Reaktion auf verschiedene Noxen deuten darauf hin, daß das Aktivationsprogramm stark konserviert und sein exakter Ablauf wichtig für die Gewebserhaltung und Regeneration im zentralen Nervensystems ist. Ein besseres Verständnis dieses hoch konservierten Programms kann eine rationale Basis für eine gezielte, therapeutische Intervention bei Erkrankungen des Nervensystems legen.

1.3.1 Durchtrennung des Nervus facialis

Das breite Spektrum des Neuroglia-Aktivationsrepertoires kann nach der Fazialis-Durchtrennung in der Maus beobachtet werden. Im diesem gut charakterisierten Modell geht die De- und Regeneration der Motoneuronen im Anschluß an die periphere Durchtrennung des Nervus facialis mit einer zeitlich wohl definierten, stereotypen Antwort der Neuroglia im motorischen Nerven Kern mit starken Veränderungen der Zelladhäsion einher.

Zwei Tage nach der Durchtrennung beginnt die Mikroglia zu proliferieren, adhärirt an die neuronalen Zellkörper und verdrängt die präsynaptischen, terminalen Neuritenendigungen vom Zellkörper des Neurons in einem Prozeß, der "synaptic stripping" genannt wird (Blinzinger und Kreutzberg, 1968). Nur in der Maus kommt es nach zwei bis drei Wochen zu

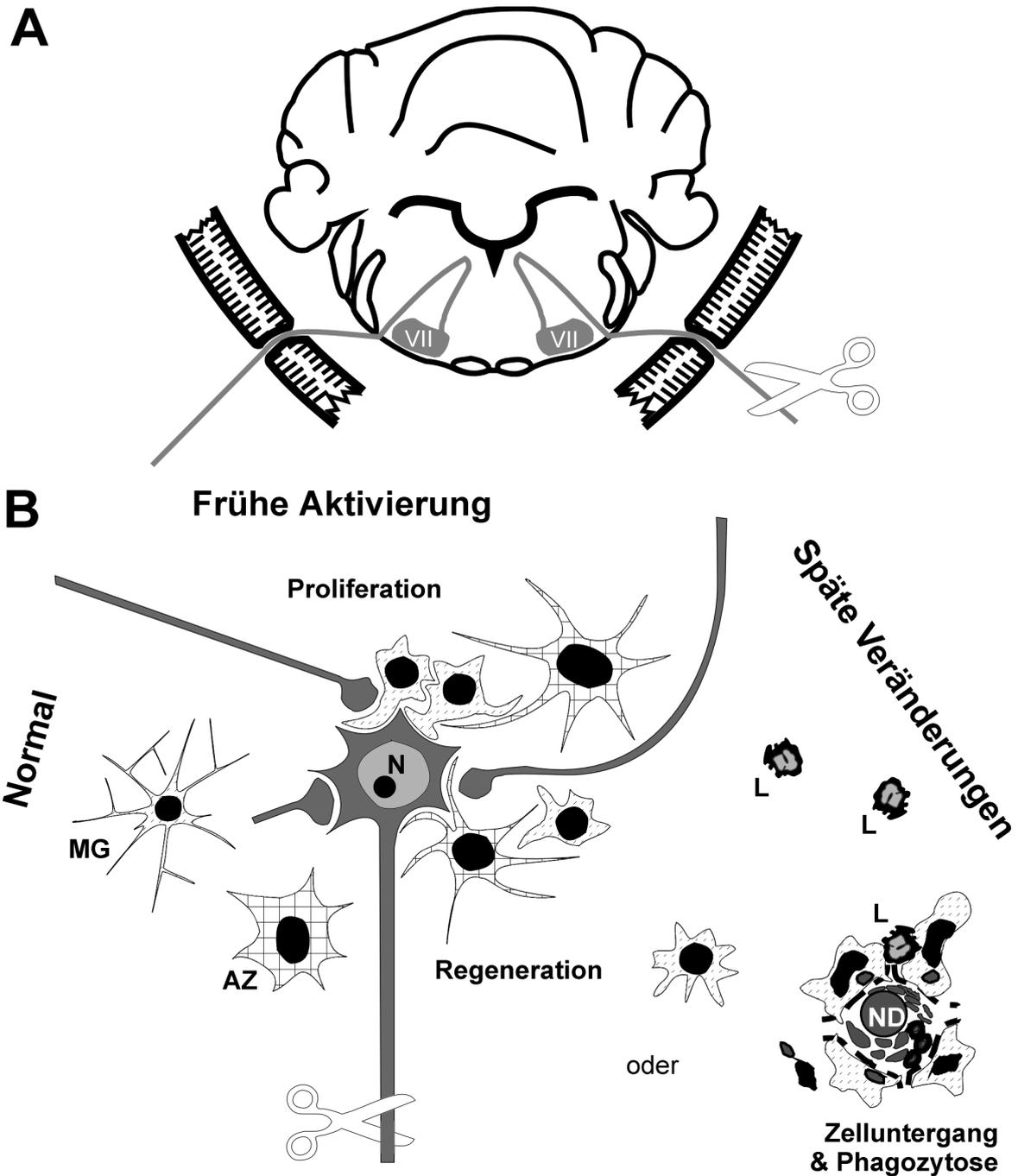


Abbildung 3. Reaktion im Kerngebiet nach Durchtrennung des Fazialis-Nerven.

A. Schematische Darstellung der Fazialis-Durchtrennung. Der Nervus facialis wird unmittelbar nach seinem Austritt aus dem Foramen stylomastoideus extrakranial durchgeschnitten.

B. Schema der zellulären Reaktion im Fazialis-Kern. **Links.** Im normalen Hirnstamm finden sich protoplasmatische Astrozyten (AZ) und Mikrogliazellen (MG) mit kleinem Zellkern, langen, schlanken Fortsätzen und starker distaler Verästelung. **Oben.** Neuronale Verletzung führt früh zur Glia-Aktivierung. Die aktivierte Mikroglia proliferiert, nimmt eine perineuronale Position ein, verplumpt ihre Fortsätze, verliert die distale Ramifizierung und isoliert die Synapsen vom Neuron (N; "synaptic stripping"). Die Astrozyten nehmen die stellarisiert-fibrilläre Form an. **Rechts.** Bei neuronaler Regeneration verdrängen später Astrozyten-Lamellen die Mikrogliazellen vom neuronalen Zellkörper, während sich bei Neuronenuntergang Mikroglia-Knötchen bilden, gefolgt von Phagozytose und Einwanderung von Lymphozyten (L). Über die Beteiligung von Zelladäsionsmolekülen an dieser Reaktion ist derzeit noch wenig bekannt.

einem späten Neuronenuntergang und der Bildung von Mikroglia-Knötchen um die sterbenden Neurone, gefolgt von der Phagozytose des neuronalen Debris (Möller et al., 1996) und einer Einwanderung von Lymphozyten aus dem Blut (Raivich et al., 1998b). Später werden die aktivierten Mikrogliazellen von Astrozyten verdrängt, die die Neurone mit mehreren Lamellen umschlingen und elektrisch isolieren (Chen, 1978; Graeber und Kreutzberg, 1988). Es gehen aber nicht alle Neurone zugrunde, sondern ca. 80% überleben und regenerieren wieder. Abbildung 3 (Seite 17) zeigt eine schematische Zusammenfassung der Veränderungen im Nucleus facialis nach peripherer Axotomie. Obwohl die zelluläre Reaktion im Nerven Kern nach Fazialis-Durchtrennung gut beschrieben ist und starke Veränderungen der Zelladhäsion auftreten, ist bislang wenig über die Beteiligung von Integrin-Zelladhäsionsmolekülen an der posttraumatischen De- und Regeneration bekannt.

1.3.1.1 Neuronale Reaktion nach Fazialis-Durchtrennung

Nach der Durchtrennung des Nervus facialis geht der distale Teil des Axons durch Wallersche Degeneration zugrunde. Auch proximal kommt es im Zellkörper rasch zu einer Reaktion mit bis zu zweifacher Schwellung des Zellkerns, Verdrängung des Nukleolus an den Rand und Auflösung der Nissl-Substanz (Nissl, 1894; Jessell, 1991). Ultrastrukturell vermehren sich die Zellorganellen und besonders die zur Proteinsynthese befähigten Ribosomen (Barron, 1983). Im Rahmen der Chromatolyse verändern sich auch Zellmorphologie, Proteinsynthese und Nährstoffaufnahme (Grafstein und McQuarrie, 1978; Singer und Mehler, 1986; Tetzlaff et al., 1988a; Graeber et al., 1989; Kreutzberg et al., 1990; Bisby und Tetzlaff, 1992; Kreutzberg, 1995b; Guntinas-Lichius et al., 1996). Der chromatolytische Zellkörper verliert seine Kontur und die synaptischen Endigungen anderer Neurone werden im sog. "synaptic stripping" separiert (Blinzinger und Kreutzberg, 1968).

Auf molekularer Ebene werden die für die spezifische Funktion der Nervenzellen wichtigen Moleküle verringert, z.B. die für die Neurotransmission benötigten synthetisierenden und abbauenden Enzyme und postsynaptische Proteine (Kreutzberg et al., 1984; Tetzlaff et al., 1988a; Nakayama et al., 1995). Statt dessen steigt der Synthese der strukturerhaltenden

Eiweiße. Es kommt zur Vermehrung von in der Embryonalperiode schon einmal aufgetretenen Wachstumsproteinen wie z.B. GAP-43 (Skene, 1989; Benowitz und Perrone-Bizzozero, 1989; Miller et al., 1989; Tetzlaff et al., 1989, 1991; Saika et al., 1993; Palacios et al., 1994). "Immediate early genes" und nukleäre Transkriptionsfaktoren wie c-jun, junB und junD werden hochreguliert und sind wahrscheinlich an der veränderten Genregulation beteiligt (Jenkins und Hunt, 1991; Herdegen et al., 1991; Haas et al., 1993).

Zusätzlich zu den strukturellen Veränderungen vermehren die axotomierten Neurone auch eine große Anzahl von Signalmolekülen wie die Neuropeptide CGRP und Galinin (Streit et al., 1989a; Haas et al., 1990; Dumoulin et al., 1992; Übersicht bei Raivich et al., 1995) sowie die Stickstoffmonoxid synthetisierende NADPH-Diaphorase (Kreutzberg, 1963; Yu, 1994). Über diese Botenstoffe können die Neurone mit ihrer Mikroumgebung interagieren. Schließlich ändern die Neurone auch die Zelladhäsionsmoleküle an ihrer Oberfläche, z.B. werden CD44 und der Integrin β 3-Ligand Thrombospondin vermehrt exprimiert (Möller et al., 1996; Jones et al., 1997). Über die so veränderten Adhäsionseigenschaften des Neurons kann die Anheftung umgebener Zellen beeinflusst werden.

Während Spezies-spezifisch einige Neurone nach der Axotomie zugrunde gehen, gelingt den meisten Nervenzellen die Regeneration. Sie treiben axonale Wachstumskegel aus und können ihre Zielmuskeln reinnervieren (Sinatra und Ford, 1979; Soreide, 1981a, b; Vaughan, 1990; Ito und Kudo, 1994; Guntinas-Lichius et al., 1996; Ferri et al., 1998). Gegenwärtig ist noch wenig über die Faktoren bekannt, die steuern, ob ein Neuron untergeht oder regeneriert (Yu, 1989; Fawcett et al., 1998; Baumgartner und Shine, 1998; Angelov et al., 1998). Insbesondere ist unklar, inwieweit Adhäsionsmoleküle an der Regeneration beteiligt sind.

1.3.1.2 Astrozytäre Reaktion nach Fazialis-Durchtrennung

Die posttraumatische Reaktion im Nucleus facialis nach der Axotomie bleibt aber nicht auf die Neurone beschränkt, sondern ergreift auch die benachbarten Mikrogliazellen und Astrozyten. Die Signalmoleküle, die zur Glia-Aktivierung führen, sind Gegenstand großen

wissenschaftlichen Interesses (Raivich et al., 1996). Die morphologische Reaktion und molekulare Aktivierungsmarker der perineuronalen Mikrogliazellen und Astrozyten sind besser bekannt und durchlaufen stereotypisch bestimmte Stadien (Raivich et al., 1999).

Die Astrozyten sind die häufigste Zellart im ZNS (Eddleston und Mucke, 1993). Im gesunden Gehirn kommen die Astrozyten in zwei Hauptformen vor, stellarisiert-fibrillär und protoplasmatisch. Die fibrillären Astrozyten finden sich fast ausschließlich in der weißen Substanz und können leicht an ihrer starken Immunoreaktivität gegen das saure Gliafaserprotein (GFAP) erkannt werden (Bignami et al., 1972). Die protoplasmatischen Astrozyten dagegen finden sich fast exklusiv in der grauen Substanz, sind in der Regel GFAP-negativ und haben viele kurze Fortsätze mit großen, flappigen Membranverzweigungen. Die komplette Membrankontur der protoplasmatischen Astrozyten ist immunhistochemisch schwer sichtbar zu machen, Marker wie S100b und endotheliale Stickstoffmonoxidsynthase (eNOS) können lediglich die proximalen Verzweigungen darstellen (Cammer und Tansey, 1988; Gabbott und Bacon, 1996; Kloss et al., 1999; Didier et al., 2000). Die zerebelläre Bergmann-Glia nimmt phänotypisch eine Mittelstellung zwischen protoplasmatischer und fibrillärer Morphologie ein (Grosche et al., 1999). Sie hat einen GFAP-positiven zentralen Fortsatz umgeben von GFAP-negativer Membran.

Tabelle II. Marker der Astrozytenaktivierung in der Maus nach Verletzung

	protoplasmatische Astrozyten	fibrilläre Astrozyten
Ruhezustand	<i>proximal:</i> eNOS-IR ^{1,2} , S100b ² <i>distal:</i> –	<i>proximal:</i> eNOS-IR ^{1,2} , S100b ³ , GFAP ⁴ <i>distal:</i> GFAP ⁴
Aktivierung	→ stellar-fibrillär	GFAP ↑ ⁴ , eNOS-IR ↑ ²

¹ Gabbott und Bacon, 1996, ² Kloss et al., 1999, ³ Didier et al., 2000, ⁴ Graeber und Kreutzberg, 1986; Tetzlaff et al., 1988b

Nach peripherer Durchtrennung des Nervus facialis kommt es rasch zu einer Reaktion der perineuronalen, protoplasmatischen Astrozyten im Nucleus facialis mit starken Veränderungen der Morphologie und des Immunphänotypes (Tabelle II, Seite 20). Innerhalb von 24 Stunden nach der Verletzung verändern die protoplasmatischen Astrozyten ihr

Zytoskelett und steigern die GFAP-Synthese (Graeber und Kreutzberg, 1986; Tetzlaff et al., 1988a, b). Innerhalb von 2 bis 3 Tagen werden sie zu voll stellarisierten, fibrillären Astrozyten und steigern die Zytoskelett-assoziierte eNOS-artige Immunoreaktivität (Graeber und Kreutzberg, 1986; Kloss et al., 1999). Obwohl die Astrozyten stark reagieren, vermehren sie sich dabei nicht (Graeber et al., 1988c). Etwa 14 Tage nach der Fazialis-Durchtrennung verdrängen die Astrozyten die Mikrogliazellen teilweise von der Oberfläche der axotomierten Neurone und hüllen sie in einen Stapel von dünnen zytoplasmatischen Fortsätzen ein, was zu funktioneller Ruhe für die Neurone führen kann (Graeber und Kreutzberg, 1988; Guntinas-Lichius et al., 1997). Nach erfolgreicher Regeneration ziehen die Astrozyten die Fortsätze teilweise wieder zurück, um den Axonendigungen den Kontakt zum Neuron wieder zu ermöglichen (Raivich et al., 1999).

1.3.1.3 Mikroglia-Reaktion nach Fazialis-Durchtrennung

Die Mikroglia, ca. 10-20% der gesamten Neuroglia, wurde Anfang des letzten Jahrhunderts von Pio del Rio-Hortega als dritter Zelltyp der Neuroglia beschrieben (del Rio-Hortega, 1919, 1932). Sie ist funktionell mit dem peripheren Makrophagen-Monozyten-System verwandt. Obwohl es einige Diskussion über die Abstammung der Mikroglia gab und noch gibt, wird heute allgemein angenommen, daß sie von peripheren Monozyten abstammt, die während der Embryonalentwicklung durch die offene Blut-Hirn-Schranke in das Parenchym eingewandert und dort sesshaft geworden sind (Ling, 1981; Jordan und Thomas, 1988; Hickey et al., 1992; Ling und Wong, 1993; Eglitis und Mezey, 1997; Kurz und Christ, 1998).

Im ruhenden Zustand im normalen Gehirn (Stadium 0 der Mikroglia-Aktivierung; Raivich et al., 1999) hat die Mikroglia einen relativ kleinen Zellkörper und streckt viele schlanke, lange Fortsätze aus, die sich distal vielfältig verästeln (ramifizieren). In der weißen Substanz orientieren sich die Mikrogliazellen am Verlauf der Nervenfasern, während sie in der grauen Substanz eine stellare Morphologie haben und ca. ein Volumen von 30-40 μm Durchmesser abdecken (Compston et al., 1997). Wie sesshafte Makrophagen in anderen Geweben scheinen sie an der Immunüberwachung des ZNS beteiligt zu sein; so exprimiert die

Mikroglia konstitutiv den Komplement-Rezeptor 3 (CR3; Integrin $\alpha M\beta 2$) und Rezeptoren für den Fc-Teil von γ -Immunglobulinen (Graeber et al., 1988a; Fishman und Savitt, 1989; Akiyama und McGeer, 1990; Reid et al., 1993; Peress et al., 1993; Werner et al., 1998). Die ruhende Mikroglia kann aber rapide aktiviert werden (Nissl, 1894; Merzbacher, 1909; del Rio-Hortega, 1932). Die Aktivierung drückt sich morphologisch in einem Anschwellen des Zellkörpers, einer Verdickung der proximalen Fortsätze und einem Verlust der distalen Ramifizierung aus. Kommt es zu einem Defekt der Blut-Hirn-Schranke deutet das Kräuseln der Membran auf ein exploratives Verhalten hin, das vermutlich mit einer Änderung der Zelladhäsionseigenschaften verbunden ist. Die Aktivierung durchläuft verschiedene Stadien, die mit dem Auftreten bestimmter pathologischer Prozesse und der Regulation von Oberflächen- und Zytoskelettproteinen einhergehen (Tabelle III, Seite 22; Definition und Übersicht bei Raivich et al., 1999).

Tabelle III. Marker der Mikroglia-Aktivierung nach Verletzung

	Stadium	Marker
Stadium 0	Normales Gehirn	Fc γ R, IgG, $\alpha M\beta 2$
Stadium 1	Alarm	IgG \uparrow , $\alpha M\beta 2$ \uparrow , ICAM1 \uparrow , Tsp \uparrow
Stadium 2	Zielfindung & Adhäsion	MCSFR \uparrow , MHC1 \uparrow , B7.2 \uparrow , Vim \uparrow
Stadium 3a	Phagozytose	MHC1 \uparrow , B7.2 \uparrow , IgG \uparrow , $\alpha M\beta 2$ \uparrow , ICAM1 \uparrow , Tsp \uparrow
Stadium 3b	Umgebungsaktivierung	MHC1 \uparrow , B7.2 \uparrow , ICAM1 \uparrow
0 bis 3	Immunantwort	MHC2 \uparrow , iNOS \uparrow

modifiziert nach Raivich et al., 1999

Im Alarm-Stadium (Stadium 1) kommt es innerhalb von 24 Stunden nach Aktivierung der Mikroglia zu einem rapiden Anstieg der Immunoreaktivität für Immunmolekülen wie Komplement-Rezeptor 3 (CR3), Immunglobulin G (IgG) und Zelladhäsionsmolekülen wie Thrombospondin, ICAM1 und seinem Rezeptor, dem Integrin $\alpha M\beta 2$ (Graeber et al., 1988a; Möller et al., 1996; Raivich et al., 1998a; Werner et al., 1998). Über die veränderten Adhäsionsmoleküle könnte der Kontakt der Mikroglia zu Immunzellen aus dem Blut

hergestellt werden, deren Einwanderung im Alarm-Stadium so antizipiert werden kann (Raivich et al., 1998a, b).

Im Zielfindungs-Stadium (Stadium 2) wandern die Mikrogliazellen zu den verletzten Neuronen und adhären. Die Umstrukturierung des Zytoskeletts geht mit einer Vermehrung des Vimentins und einem weiteren Verlust der Ramifizierung einher (Graeber et al., 1988b) und scheint zu einer Mobilitätssteigerung der Mikroglia zu führen (Angelov et al., 1995). Die Mikrogliazellen adhären an die axotomierten Neurone und verdrängen die präsynaptischen Axonendigungen ("synaptic stripping"). Sie regulieren die Wachstumsfaktor-Rezeptoren für den Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktor (M-CSF) und den Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktor (GM-CSF) hoch und proliferieren maximal (Raivich et al., 1991, 1994, 1998a). Die molekularen Signale, die die Proliferation der Mikroglia steuern, sind immer noch zum großen Teil unklar (siehe 1.3.2). Die mitotische Aktivität setzt schon früher, zwischen Tag 1 und 2 ein, wird aber 2 bis 3 Tage nach der Durchtrennung des Nerven maximal und führt zu einer 4 bis 6-fachen Zunahme der Mikroglia-Zellzahl. Jetzt werden auf den Mikroglia auch Proteine dargestellt, die bei der Antigenpräsentation eine Rolle spielen, wie MHC1 und B7.2 (Streit et al., 1989c; Raivich et al., 1993; Bohatschek et al., 1998).

Ohne eine weitere Neuronenschädigung (d.h. in Abwesenheit von phagozytierbarem Material) kehren die Mikrogliazellen nun langsam wieder in ihren ursprünglichen, ramifizierten Ruhezustand zurück. Tritt jedoch neuronaler Zelltod ein, werden die Mikrogliazellen zu Freßzellen, die den neuronalen Debris phagozytieren (Stadium 3a). Oft bilden sich Knötchen von mehr als 12 Mikrogliazellen, um die Reste der großen Motoneurone abzuräumen (Streit und Kreutzberg, 1988; Möller et al., 1996). Die Phagozytose bewirkt einen massiven Anstieg der Aktivierungsmarker der Stadien 1 und 2. ICAM1 und Thrombospondin zeigen sogar jetzt nach vorangehendem Abfall eine zweite Induktion auf den phagozytischen Knötchen (Möller et al., 1996; Werner et al., 1998). Für die Regulation der Immunmoleküle Fc γ -Rezeptor, B7.2, MHC1 und MHC2 in der Phagozytose ergibt sich ein komplexes Bild mit beträchtlichen Unterschieden zwischen den

Mikrogliazellen in der weißen und grauen Substanz und zwischen verschiedenen Spezies (Übersicht bei Raivich et al., 1999). In den Mikrogliazellen der grauen Substanz in der Maus kommt es zu einem Anstieg von Fc γ -Rezeptor, B7 und MHC1, im Allgemeinen jedoch nicht von MHC2 (Streit et al., 1989b; Bohatschek et al., 1998). Über diese Immunmoleküle können die Mikroglia mit Lymphozyten interagieren, die im Zusammenhang mit dem neuronalen Zelltod in das ZNS einwandern und mit den Knötchen der phagozytischen Mikroglia Kontakt machen (Raivich et al., 1998b).

Zusätzlich zu der Aktivierung der Mikrogliazellen in den phagozytischen Knötchen kommt es auch zu einer Reaktion der umgebenden, nicht-phagozytischen Mikroglia (Stadium 3b). Diese umgebende Mikroglia reguliert MHC1 und B7.2 hoch. Im Falle von MHC1 erstreckt sich diese Aktivierung 60-100 μ m um ein zentrales Mikrogliaknötchen. Für die Umgebungsaktivierung ist die die Phagozytose begleitende Induktion von proinflammatorischen Zytokinen wie Interleukin-1 (IL1) oder Tumornekrosefaktor- α (TNF α) von Bedeutung (Raivich et al., 1999).

Alle Aktivierungsstadien finden sich auch bei floriden Entzündungsprozessen. Als Besonderheit fällt hier jedoch der besonders starke Anstieg von MHC2 und induzierbarem NOS (iNOS) auf. Diese Induktion scheint auf Lymphozyteneinfluß zurückzugehen und zur Antigenpräsentation und der Bildung von zytotoxischem Peroxynitrit, einem Produkt aus Stickstoffmonoxid (NO), zu führen (Raivich et al., 1999).

1.3.2 Lipopolysaccharide

Viele Moleküle, die bei der Mikroglia-Aktivierung induziert werden, sind Bestandteil der Infektionsabwehr des Organismus, so kann z.B. der Kontakt von Lymphozyten zu der Mikroglia über das Mikroglia-Integrin α M β 2 hergestellt und dann von der aktivierten Mikroglia über hochregulierte Proteine wie B7.2, MHC1 und MHC2 Antigen präsentiert werden. Zusätzlich kann die Mikroglia zytotoxische Substanzen bilden wie Sauerstoffradikale und NO, das weiter zu Peroxynitrit verstoffwechselt werden kann (Banati und Kreutzberg, 1993; Banati et al., 1993; Banati und Graeber, 1994; Kreutzberg, 1996). Insgesamt erscheint die

Aktivierung die Mikroglia besonders gut zu einer verbesserten Bekämpfung von einwandernden Infektionserregern zu befähigen (Raivich et al., 1999).

In diesem Sinne läßt sich die Mikroglia-Aktivierung besonders gut durch infektiöse Reize auslösen (Andersson et al., 1992; Rinaman et al., 1993; Davis et al., 1994; Deckert-Schlüter et al., 1994; Zielasek und Hartung, 1996; Schlüter et al., 1998; Deckert-Schlüter et al., 1999). Es reichen sogar isolierte Zellwand-Bestandteile wie die Lipopolysaccharide (LPS) aus Gram-negativen Bakterien für eine deutliche Mikroglia-Aktivierung aus. Beim Menschen spielen diese löslichen Lipopolysaccharide (LPS) für das Fieber und den septischen Schock eine wichtige Rolle (Mayer, 1998). In Nagern führt die Gabe von LPS *in vivo* zu einer Induktion von Zytokinen und Mikroglia-Oberflächenmolekülen wie MHC1 und MHC2, induzierbarer Stickstoffmonoxidsynthase und dem α M-Integrin (Xu und Ling, 1994; Buttini et al., 1996; Ng und Ling, 1997; Jou et al., 1998; Garcion et al., 1998; Buttini et al., 1996). Es werden also ähnliche Aktivierungsmarker induziert, wie sie auch auf der Mikroglia im axotomierten Nucleus facialis beobachtet werden können (1.3.1.3), und das unterstreicht die Stereotypie der Mikroglia-Aktivierung. Bislang ist nur wenig über die Regulation von Zelladhäsionsmolekülen wie Integrinen bei der Reaktion des Gehirns auf LPS-Gabe bekannt. In vorliegender Arbeit soll deshalb die Regulation von Integrinen im zentralen Nervensystem nach peripherer LPS-Injektion in der Maus untersucht werden.

Ein zusätzlicher Vorteil der Mikroglia-Aktivierung mit LPS ist, daß sich dieses Modell leicht auf die Zellkultur übertragen läßt, und dort die Reaktion in einem Zellsystem mit reduzierter Komplexität untersucht werden kann. Ein Vergleich der Expressionsmuster von Zelladhäsionsmolekülen nach Fazialis-Durchtrennung, nach LPS-Exposition *in vivo* und *in vitro* ermöglicht die Einordnung des Aktivierungszustandes der Mikroglia bei den drei Aktivierungsmodellen. Besonders interessant ist dabei das Staging der Mikroglia in Zellkultur anhand der Integrin-Expression, weil sich durch die Immunotypisierung des Aktivationszustandes der Zellen das Kulturexperiment zu der Situation *in vivo* in Bezug setzen läßt.

1.3.3 Signalmoleküle der Mikroglia-Aktivierung

In den letzten Jahren konnten erste Signalmoleküle für die stadienspezifische Aktivierung der Mikroglia *in vivo* identifiziert werden (Raivich, 1997, 1999). Wichtige Hinweise für die Bedeutung einzelner Botenstoffe gaben Untersuchungen an genetisch defizienten Tieren (natürliche Mutanten und "Knockout" Mäuse). So findet sich im axotomierten Fazialis-Kern bei homozygoten Tieren, die durch eine natürliche "frame shift" Mutation defizient für MCSF sind (osteopetrotische Mäuse = *op/op* Mäuse), eine 70 bis 80% Reduktion der Mikroglia-Proliferation und einer Abnahme der frühen Mikroglia-Aktivierungsmarker wie MCSFR und Integrin $\alpha M\beta 2$ (Raivich et al., 1994, 1996). Tiere, denen das Neurotrophin-3 (NT3) Gen fehlt, zeigen eine defiziente Mikroglia-Aktivierung (Kahn et al., 1999). Das genetische Fehlen von Rezeptoren für den Tumornekrosefaktor- α interferiert nach der Axotomie mit der Bildung der phagozytischen Mikrogliaknötchen (Stadium 3a) und der Induktion der phagozytose-assoziierten Antigene wie MHC1, B7.2 und TSP (Bohatschek et al., 1998). Interessanterweise beeinträchtigt eine Ausschaltung des Interleukins 6 (IL6) die Proliferation von muriner Mikroglia, obwohl die Mikrogliazellen selbst keine Rezeptoren für dieses Zytokin tragen (Klein et al., 1997). Ähnlich verhält es sich mit $TGF\beta 1$. Trotzdem kommt es bei genetischer Abwesenheit dieses Zytokins zu einem verringerten, Verletzung-induzierten Anstieg der Adhäsionsmoleküle $\alpha M\beta 2$ und ICAM1 auf der Mikroglia (Jones et al., 1998). Es ist anzunehmen, daß diese Zytokine nicht direkt auf die Mikroglia wirken, sondern ihre Effekte über andere Zellen vermittelt werden – bei IL6 möglicherweise über Neurone und Astrozyten, die *in vivo* den IL6-Rezeptor tragen, und im Falle von $TGF\beta 1$ könnten die Neurone die Wirkung medieren. Diese Beispiele veranschaulichen besonders deutlich die komplizierte Interaktion der verschiedenen Zelltypen im Gehirn. Diese Vernetzung ist ein prinzipielles Hindernis bei der Aufklärung der spezifischen Bedeutung einzelner Signalmoleküle. Ein Mittel, die Komplexität des Zellsystems zu reduzieren, ist die Untersuchung von Neuroglia in der Zellkultur.

1.4 Steuerung der Mikroglia-Proliferation

Eines der hervorstechendsten Merkmale der Mikroglia-Aktivierung ist die posttraumatische Proliferation. Die Vermehrung der Mikrogliazellen ist nicht nur ein wichtiger Bestandteil der Neuroglia-Reaktion auf das indirekte Trauma der Fazialis-Durchtrennung (siehe 1.3.1.3), sondern kommt in einer breiten Palette von Gehirnerkrankungen vor, einschließlich direkter Gehirnschädigung, zerebrale Ischämie, Infektionen, autoimmunen und neurodegenerativen Erkrankungen (Perry und Gordon, 1988; Dickson et al., 1993; Ohna et al., 1993; McGeer et al., 1993; Giordana et al., 1994; Lassmann et al., 1994; Kreutzberg, 1996; Tornquist et al., 1997; Norton, 1999). Wie die Mikroglia im gesunden Nervensystem behalten die meisten proliferierenden Mikrogliazellen in der initialen Phase der posttraumatischen Glia-Reaktion ihre ramifizierte Morphologie bei (Lawson et al., 1992; Ohna et al., 1993; Raivich et al., 1994; Mander und Morris, 1996).

Eine wichtige Frage ist hierbei, welche Botenstoffe die Mikroglia-Proliferation steuern. In einigen wenigen Studien ist es mit "knock-out" Mäusen oder direkter Injektion gelungen, die Bedeutung von MCSF, GMCSF und IL3 als Mikroglia-Mitogene *in vivo* zu sichern (Giulian und Ingeman, 1988; Raivich et al., 1994). Der weitaus größte Teil der Untersuchungen zur Mikroglia-Proliferation stammt aber aus Zellkulturstudien. Neben den klassischen Mitogenen, MCSF, GMCSF und IL3, deren Mitogenität auch *in vivo* gezeigt werden konnte, zeigen in Kultur auch viele andere Substanzen, wie Interleukine und Wachstumsfaktoren, einen Effekt auf die Mikroglia-Proliferation (Tabelle IV, Seite 28).

Tabelle IV. Substanzen mit Einfluß auf die Mikroglia-Proliferation

Substanz	Effekt	Quelle
<i>in vivo</i>		
MCSF	Stimulation	Raivich et al., 1994
GMCSF	Stimulation	Giulian und Ingeman, 1988
IL3	Stimulation	Giulian und Ingeman, 1988
<i>in vitro</i>		
MCSF	Stimulation	Giulian und Ingeman, 1988; Hao et al., 1990; Sawada et al., 1990; Lee et al., 1993b, 1994
GMCSF	Stimulation	Giulian und Ingeman, 1988; Sawada et al., 1990; Suzumura et al., 1990; Lee et al., 1994
IL1	Stimulation	Lee et al., 1994
IL2	Stimulation (LPS-abhängig)	Sawada et al., 1995
IL3	Stimulation	Giulian und Ingeman, 1988; Suzumura et al., 1990
IL4	Stimulation	Suzumura et al., 1993a
IL5	Stimulation	Ringheim, 1995
TNF α	Stimulation	Ganter et al., 1992; Théry und Mallat, 1993; Lee et al., 1994
BDNF	Stimulation	Elkabes et al., 1996
NT3	Stimulation	Elkabes et al., 1996
TGF β	Inhibition	Suzumura et al., 1993b; Xiao et al., 1996
TPA	Stimulation	Sawada et al., 1990
bFGF	Stimulation	Dipucchio et al., 1996
LPS	Inhibition (adulte Mikroglia) Stimulation (fötale Mikroglia)	Lee et al., 1994
β 2-Rezeptor Agonisten	Inhibition	Fujita et al., 1998
Adenosin-Rezeptor Agonisten	Stimulation	Gebicke-Haerter et al., 1996
Propentofylline	Inhibition	Si et al., 1998

Eine Gemeinsamkeit dieser Studien besteht aber darin, daß durch die Kulturbedingungen die Mikrogliazellen bereits in den Kontrollkulturen deramifizierten, aktivierten Makrophagen ähneln. Hierin liegt das Problem dieser Studien, denn Makrophagen unterscheiden sich in einer Reihe von Aspekten von der ramifizierten Mikroglia im normalen Gehirn, den Trägern der frühen posttraumatischen Proliferation (Raivich et al., 1994). So finden sich u.a. Unterschiede in der enzymatischen Aktivität (Suzumura et al., 1991), den elektrophysiologischen Eigenschaften (Kettenmann et al., 1990; Schmidt Mayer et al., 1994; Eder et al., 2000) und dem zytoskelettären Aufbau (Perry und Gordon, 1988; Chamak und Mallat, 1991; Ilschner und Brandt, 1996). Diese Differenzen haben die Frage aufgeworfen, inwieweit die Resultate der Proliferationsbeeinflussung an Gehirnmakrophagenkulturen auf die ramifizierte Mikroglia des ZNS rückschließen lassen.

1.5 Mikroglia in der Zellkultur

In letzter Zeit sind Methoden zur Induktion der Ramifikation von Mikroglia in Zellkultur beschrieben worden, unter anderem wurden Substanzen wie Retinoinsäure, Dimethylsulfoxid (DMSO), Fibronectin, Makrophagen-Mitogene wie MCSF und GMCSF und Überstand von LPS-konditionierten Astrozytenkulturen eingesetzt (siehe Tabelle V, Seite 29; Giulian und Baker, 1986; Suzumura et al., 1991; Chamak und Mallat, 1991; Liu et al., 1994; Giulian et al., 1995; Eder et al., 2000).

Tabelle V. Methoden zur Kultur von ramifizierten Mikrogliazellen

Methode	Quelle
DMSO, Retinoinsäure	Giulian und Baker, 1986
Fibronectin	Chamak und Mallat, 1991
Kulturüberstand von Astrozyten	Suzumura et al., 1991; Eder et al., 2000
MCSF, LPS, gemischte Gliakulturen	Liu et al., 1994
GMCSF	Giulian et al., 1995
Astrozyten-Einzelzellschicht	Sievers et al., 1994a
auf fixierten Astrozyten, in Astrozytenkultur-Überstand	Tanaka und Maeda, 1996
Kulturüberstand von Endothelien	Wilms et al., 1997
Vitamin E	Heppner et al., 1998

Die einzige Methode, die vermeidet, den unstimulierten Kontrollkulturen *a priori* unphysiologische Substanzen wie (DMSO) oder bekannte Makrophagen-Mitogene (MCSF, GMCSF) zuzusetzen und verlässlich eine hohe Anzahl von ramifizierten Mikrogliazellen liefert, besteht in der Kultur von stark ramifizierten Mikrogliazellen auf einer konfluenten Einzelzellschicht von Astrozyten. Sie wurde zuerst von Sievers beschrieben (Sievers et al., 1994a, b; Schmidtmayer et al., 1994; Wilms et al., 1997) und konnte mittlerweile in anderen Laboratorien reproduziert werden (Tanaka und Maeda, 1996).

In der vorliegenden Arbeit soll zuerst die Expression von Integrin-Zelladhäsionsmolekülen in normalen und stimulierten Kulturen mit dem intakten und verletzten Nervensystem in Bezug gesetzt werden. Dann soll die Wirkung verschiedener Zytokine auf die Mikroglia-Proliferation

in vitro untersucht werden.

1.6 Fragestellung der Arbeit

Eine Verletzung des zentralen Nervensystems geht mit einer Reaktion der Neurone, der Astrozyten und der Mikroglia einher, die Veränderungen der Morphologie und eine Reorganisation des Zellverbandes beinhaltet. Wichtige Voraussetzung für diese Plastizität ist eine Modulierbarkeit der Adhäsionseigenschaften der Zellen. Über die Rolle der Zelladhäsionsmoleküle bei den Reaktionen von Neuronen und Glia während De- und Regeneration des Nervensystems ist bislang wenig bekannt. In der vorliegenden Arbeit wird die Beteiligung von Integrin-Zelladhäsionsmoleküle an der Reaktion auf Verletzung des zentralen Nervensystems immunhistochemisch quantifiziert. Besonderes Interesse gilt hierbei der Rolle der Mikroglia-Aktivierung und der Steuerung ihrer Proliferation.

Im ersten Teil der Arbeit wird die Integrin-Expression im gesunden Gehirn und ihre Veränderung nach Verletzung untersucht. Hierzu wurde das experimentell gut beschriebene Modell der peripheren Durchtrennung des Nervus facialis und die periphere Injektion von Lipopolysacchariden (LPS), einem Bestandteil Gram-negativer Bakterien, in der Maus gewählt. Die stereotype Reaktion der Mikroglia soll in den beiden Modellen verglichen und aus der Lokalisation sowie der zeitlichen und Zelltyp-spezifischen Messung der Integrin-Expression Rückschlüsse auf eine mögliche Funktion der Integrine gezogen werden.

Schließlich soll die Komplexität des lebenden Organismus reduziert werden und in der Zellkultur der Effekt von Stimulation auf die Integrin-Expression und die Proliferation von Mikrogliazellen untersucht werden. Sievers et al. haben 1994 eine Methode beschrieben, ramifizierte Mikroglia zu kultivieren, die morphologisch der Mikroglia im ruhenden Gehirn gleicht (Sievers et al., 1994a). Der Aktivierungszustand dieser ramifizierten Mikrogliazellen soll zuerst anhand eines Vergleiches des Integrin-Expressionsmusters in normalen Kulturen bzw. nach LPS-Gabe mit der Mikroglia im gesunden und verletzten ZNS bestimmt werden. Letztlich soll in den so definierten Mikroglia-kulturen, die Beeinflussbarkeit der Proliferations durch verschiedene Zytokine untersucht werden.

2 Methoden und Materialien

Erstes Ziel der vorliegenden Arbeit war die Aufklärung des Vorkommens von Integrinen im zentralen Nervensystem der Maus und ihre Rolle bei der Mikroglia-Reaktion in der De- und Regeneration. In einem ersten Schritt wurde die Integrin-Expression im gesunden und verletzten Nervensystem der Maus untersucht (2.1). Als Verletzungsmodelle wurde die Fazialis-Durchtrennung gewählt, hier sind die neuropathologischen Veränderungen im Nucleus facialis nach Durchtrennung des Nervus facialis besonders gut bekannt. Als ergänzendes Modell wurde die Integrin-Expression nach peripherer Gabe von Lipopolysacchariden (LPS), einem Zellwandbestandteil Gram-negativer Bakterien untersucht. Zur Vereinfachung der komplexen Verhältnisse im neuralen Gewebeverband wurden ramifizierte Mikrogliazellen in Kultur untersucht (2.2.1) und dabei das Aktivierungsstadium anhand der Integrin-Expression in unstimulierten Kulturen und nach LPS-Stimulation bestimmt (2.2.2). Schließlich wurde die Wirkung verschiedener Zytokine auf die Proliferation der ramifizierten Mikrogliazellen in Kultur untersucht (2.2.3).

2.1 Integrine im gesunden und verletzten Nervensystem

Die Integrin-Expression im gesunden und verletzten Nervensystem wurde im Gehirn von C57/BL6 Mäusen untersucht. Zur Bestimmung der Integrine wurden ausschließlich monoklonale Antikörper aus Hybridomzellen von Ratten oder Hamstern gegen Integrin-Untereinheiten von Mäusen benutzt (Tabelle VIII, Seite 68). Polyklonale Antiseren, beispielsweise aus dem Kaninchen, zeigen neben der spezifischen Bindung an das Antigen regelmäßig eine starke Affinität zu Neuronen im Mäusehirn. Diese Färbung tritt auch bei Seren von nicht immunisierten Kaninchen auf und erschwert die Identifizierung und Messung des gesuchten Proteinen erheblich bis hin zur Unmöglichkeit eines sicheren Nachweises mit dieser Methode. Dieses Problem tritt bei monoklonalen Antikörpern aus Ratte und Hamster nicht auf, deshalb sind in dieser Arbeit ausschließlich monoklonale Antikörper für die Integrin-Erkennung in der Maus verwendet worden.

Zuerst mußte sichergestellt werden, daß die kommerziell erhältlichen Antikörper unter den

gewählten Versuchs-Bedingungen (Tierstamm, Fixationsmethode, Nachweissystem) auch spezifisch die Antigene erkennen. Dazu wurde als Positivkontrolle für die Integrin-Antikörper die Milz gewählt. Sie besteht zum großen Teil aus Bindegewebe und Blutzelle, auf denen alle bekannten Integrin-Untereinheiten vorkommen. Nach der Titration der Integrin-Antikörper in der Milz (2.1.3.1) wurde die Integrin-Expression im Kleinhirn und Hirnstamm, und ihrer Veränderung nach Durchtrennung des Nervus facialis (2.1.3.2) oder systemischer Injektion von Lipopolysacchariden (2.1.1.2) untersucht und quantifiziert. Dann wurden die immunoreaktiven Zellen mit Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen (2.1.5) oder Immunelektronenmikroskopie (2.1.6) weiter charakterisiert und der Verlauf des relativen Färbefaktors (RISC) der Integrin-Antikörper im Nucleus facialis nach Durchtrennung des Nerven immunhistochemisch auf den einzelnen Zellarten mit konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie quantifiziert (2.1.5).

2.1.1 Tiermodelle

2.1.1.1 Durchtrennung des Nervus facialis

Eine Fragestellung dieser Studie war die Charakterisierung der Integrin-Expression auf hirneigenen Zellen im ruhenden ZNS und nach Verletzung. Die meisten Tiermodelle für Hirnverletzungen (z.B. direktes Trauma, Ischämie, Infektionen oder allergische Enzephalomyelitis) zerstören örtlich die Blut-Hirn-Schranke und sind dadurch mit dem Problem der frühen Einwanderung von Blutmakrophagen ins Hirngewebe belastet (Dickson et al., 1993; McGeer et al., 1993; Lassmann et al., 1994). Diese Blutzellen zeigen in ihrem Antigenprofil eine weitgehende Übereinstimmung und können sehr schwer von der residenten, aktivierten Mikroglia unterschieden werden (Perry und Gordon, 1988; Graeber et al., 1990; Perry et al., 1991; Williams et al., 1992; Kreutzberg, 1996). In dieser Arbeit wurde dieses Problem durch das Tiermodell der Fazialis-Durchtrennung vermieden. Da hierbei die Verletzungsstelle außerhalb des zentralen Nervensystems liegt, tritt keine Einwanderung von Makrophagen oder Granulozyten ins ZNS auf, noch wird die Blut-Hirn-Schranke für

Tabelle VI. Vorteile der Fazialis-Durchtrennung für das Studium Glia-Aktivierung

- keine frühe Einwanderung von Blutmakrophagen → eindeutige Identität der Mikroglia
- relativ großer, scharf umrissener Nucleus facialis (0,7 mm³) → genügend Untersuchungsmaterial für quantitative Studien
- ausschließlich Motoneurone, keine Interneurone; alle Neurone werden axotomiert
- endogene Kontrolle im kontralateralen Nucleus facialis
- morphologische Sequenz der Aktivierung ist sehr gut bekannt
- partielle Regeneration mit Reinnervation der Gesichtsmuskulatur
- Nervenzelltod mit Phagozytose
- hohe Inzidenz von Facialisparesen → klinischer Bezug

Serumproteine durchlässig (Kreutzberg, 1996; Werner et al., 1998). Somit ist die Untersuchung der spezifischen Aktivierung hirneigener Zellen in diesem Modell gut möglich. Es hat aber noch andere experimentelle Vorteile. Der Nucleus facialis der Maus ist eindeutig vom umgebenden Hirnstamm abgrenzbar, mit 0,7 mm³ der größte, motorische Hirnnervenkern und liefert genug Gewebe für quantitative, immunhistochemische Studien. Er enthält ausschließlich motorische Neurone, die zudem alle gleichzeitig durch einen einzigen Schnitt verletzt werden können. Gleichzeitig ist in jedem Gehirnschnitt mit dem unverletzten, kontralateralen Nucleus facialis eine endogene Negativkontrolle vorhanden. Ferner ist das Modell für die zeitlich wohl definierte und charakterisierte Sequenz der zellulären Veränderungen bekannt, die zu einer erfolgreichen Regeneration mit Reinnervation der Gesichtsmuskulatur und der Muskulatur der langen Whisker-Barthaare führt (Abbildung 4; Seite 34; Kreutzberg, 1996; Raivich et al., 1996, 1999). Auf der anderen Seite tritt aber bei der Maus auch später Tod von Nervenzellen auf und führt zu einer spezifischer Einwanderung von Lymphozyten und Aggregation an Knötchen von phagozytischer Mikroglia (Möller et al., 1996; Raivich et al., 1998b; Werner et al., 1998). Letztlich hat das Tiermodell Fazialis-Durchtrennung wegen der Inzidenz von Fazialis-Paresen bei neurologischen

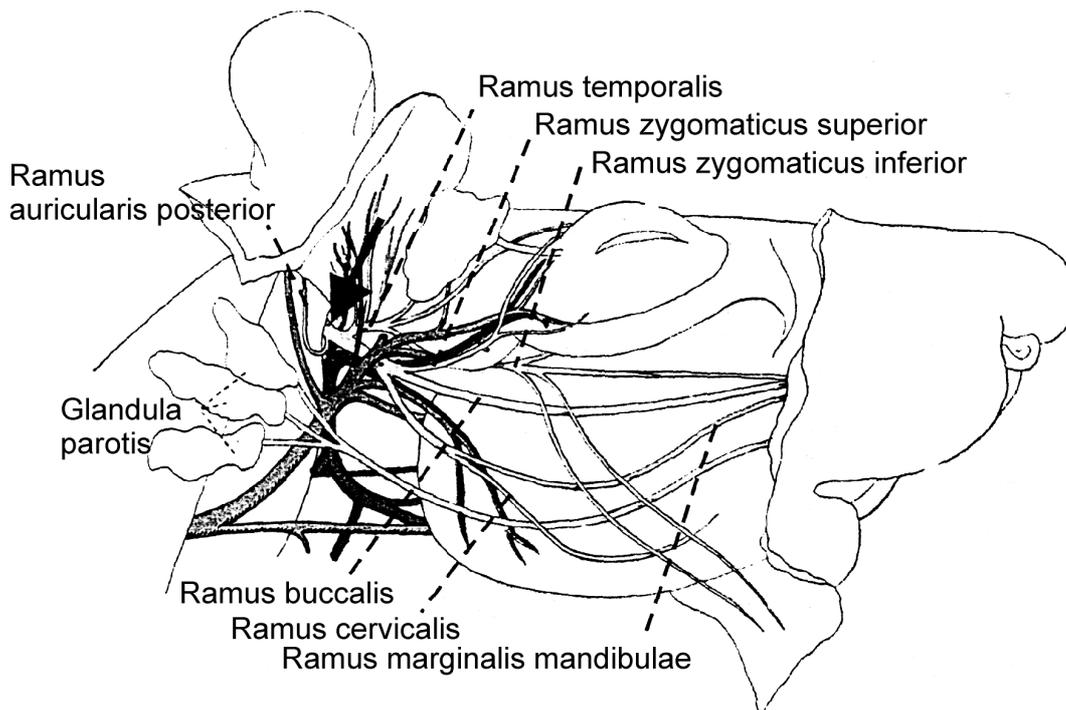


Abbildung 4. Anatomie des Nervus facialis. Der Pfeil bezeichnet die Schnittstelle unmittelbar nach Austritt des Nervus facialis aus der Schädelbasis. Für die vollständige Durchtrennung des Nerven ist besonders auf den Ramus auricularis posterior zu achten, der als erster Ast vom Nervenstamm abgeht.

modifiziert nach Greene, 1963.

Patienten auch eine hohen klinische Relevanz.

Die Durchtrennung des Fazialis-Nerven¹ erfolgte an erwachsenen, 3 Monate alten Mäusen (Charles River). Die Tiere wurden im Äthertopf tief narkotisiert. Während der Operation atmeten die Mäuse selbständig Raumluft oder bei Bedarf durch eine Maske mit einer in Äther getränkte Watte. Zuerst wurde die mit Alkohol desinfizierte Haut kaudal des rechten Ohres ausrasiert und eingeschnitten. Das unterliegende Bindegewebe wurde stumpf gespreizt, der rechte Nervus facialis dargestellt und kurz nach seinem Austritt aus dem Foramen stylomastoideus durchtrennt. Dabei wurde besondere Obacht gegeben, auch den Ramus auricularis posterior zu durchschneiden, der wegen seines frühen Abganges vom Nervenstamm dem ungeübten Operateur leicht entgehen kann (Abb. 4, Seite 34). Schließlich

¹ Vor allen Tierversuchen erging eine Genehmigung der Tierschutzbehörde der Regierung von Oberbayern (AZ 211-2531-10/93 und AZ 211-2531-37/97).

wurde die Haut geklammert und das Erwachen der Mäuse aus der Narkose abgewartet.

2.1.1.2 Systemische Injektion von Lipopolysacchariden

Als die Fazialis-Durchtrennung ergänzendes Tiermodell der Glia-Aktivierung wurde die Integrin-Regulation nach der systemischen Injektion von Lipopolysacchariden (LPS) untersucht. LPS ist ein Bestandteil der Zellwand Gram-negativer Bakterien. Freies LPS führt im Körper zu einer systemischen Entzündung mit Fieber und begleitender vegetativer Reaktion (Saper, 1998; Luheshi, 1998). Wegen der subkutanen Injektion erfolgt auch bei diesem Modell kein direkter Eingriff ins ZNS mit mechanischer Zerstörung der Blut-Hirn-Schranke (BHS). In einigen anatomischen Regionen ist die BHS aber unvollständig ausgebildet, so erfüllt zum Beispiel die Area postrema mit fehlender BHS die Funktion eines Chemosensors und die Gliazellen der Area postrema sind schon im gesunden Gehirn durch den steten Serumkontakt leicht aktiviert (Heck, 1990; Broadwell und Sofroniew, 1993; Pedersen et al., 1997). Außerdem scheint eine gewisse Permeabilität durch die Blut-Hirn-Schranke für Moleküle wie Interferon- γ und LPS auch im normalen Gehirn zu existieren (Grau et al., 1997). Nach systemischer LPS-Injektion läßt sich somit in einem Gewebsschnitt eine Dosis-Wirkungsbeziehung des LPS auf Integrin-Expression ableiten und mit gesunden Tieren vergleichen. Als weiteren Vorteil ist das LPS-Modell auch nahe an den Humanpathologie, z.B. beim Zerfall Gram-negativen Bakterien im septischen Schock.

Tabelle VII. Vorteile des LPS-Injektionsmodells

- kein direkter Eingriff ins ZNS mit lokaler Zerstörung der Blut-Hirn-Schranke
- hochpotentes, dosierbares Stimulans des Monozyten-Makrophagen-Systems
- nahe an der Pathophysiologie des septischen Schocks
- leicht in die Zellkultur übertragbar

Für die LPS-Stimulation wurden 3 Monate alte Mäuse (Charles River) kurz im Äthertopf narkotisiert, dann einmalig LPS (Sigma) in 1 ml Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS)

subkutan unter die Nackenhaut injiziert und die Tiere nach zwei Tagen getötet. Um die Wirkung vom LPS zu titrieren, wurde in einem Vorversuch LPS-Dosen von 1 μg , 10 μg , 100 μg , 1 mg und 3 mg pro Tier verabreicht. Später wurde dann eine Dosis von 100 μg gewählt, weil die Mikroglia-Stimulierung bei dieser Dosis bereits maximal war (Abbildung 21, Seite 87).

2.1.2 Gewebsentnahme für lichtmikroskopische Immunhistochemie

Für die lichtmikroskopische Immunhistochemie wurden die Mäuse nach definierten Überlebensperioden in Diäthyl-Äther getötet, für das Fazialismodell 4 Tiere am Tag 1, 4 Tiere am Tag 2, 5 Tiere am Tag 4, 4 Tiere am Tag 7, 4 Tiere am Tag 14, 4 Tiere am Tag 21, 5 Tiere am Tag 42 nach der Operation und 4 nicht operierte Tiere als Kontrolle (Tag 0). Für die LPS-Versuche wurden 4 LPS und 4 nur mit dem Vehikel PBS injizierte Tiere 2 Tage nach der Stimulation geopfert. Unmittelbar nach Todeseintritt der Tiere, wurde der Herzbeutel eröffnet und der rechte Ventrikel kanüliert. Dann wurden 200 ml isotone Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS) und dann 200 ml 4% Paraformaldehyd (in PBS) mit einer peristaltischen Pumpe und einer Geschwindigkeit von 40 ml/min transkardial perfundiert, um Blutzellen und -bestandteile aus dem Gefäßsystem herauszuspülen. Das rechte Herzohr wurde für den Austritt der Perfusionslösungen eingeschnitten. Dann wurde der Hirnstamm und die Milz entnommen und 2 Stunden in 1% Paraformaldehyd (in PBS) auf einem Drehrad bei 4°C nachfixiert, das Gewebe über Nacht bei 4°C auf dem Drehrad in 30% Saccharose (in 1 mm PB) zum Gefrierschutz eingelegt und schließlich auf Trockeneis eingefroren und im Gefrierschrank bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Das Gewebe wurde dann mit einem Kryostaten (Reichert-Jung, Med. 2700, Frigocut) bei einer Kammertemperatur von -20°C und einer Objekttemperatur von -10°C in 20 μm dicke Schnitte geschnitten, auf warmen, mit 0,5% Gelatine beschichteten Objektträgern aufgefangen, sofort wieder auf Trockeneis gefroren und bei -80°C bis zum weiteren Gebrauch gelagert.

2.1.3 Titration der Integrin-Antikörper mit DAB-Immunhistochemie

2.1.3.1 Titration in der Milz

Auf Blutzellen ist die Expression einer Vielzahl von Integrin-Untereinheiten beschrieben. Deshalb diente die zum großen Teil aus Blutzellen bestehende Milz als Positivkontrolle für den Nachweis von Integrinen mit monoklonalen Antikörper. Um die optimalen Bedingungen für die Immunhistochemie zu ermitteln, wurden für jeden primären Antikörper 7 Verdünnungen, 1:25, 1:100, 1:400, 1:1.600, 1:6.400, 1:25.000 und 1:100.000 sowie eine Negativkontrolle, jeweils mit und ohne Azetonvorbehandlung des Gewebes eingesetzt, insgesamt also für jeden Antikörper 16 Milzschnitte. Tabelle VIII (Seite 68) gibt eine Übersicht über die Antikörper in dieser Studie. Abbildung 5a (Seite 39) zeigt die immunhistochemische Nachweismethode schematisch.

Die Schnitte wurden 10 Minuten an der Luft aufgetaut und getrocknet und dann 5 Minuten in 4% Paraformaldehyd (in PB) fixiert, dabei wurde das Gewebe kovalent an den gelatinierten Objektträger gebunden, anschließend wurde das Paraformaldehyd in PB ausgewaschen und die eine Hälfte der Schnitte in einer Azeton-Reihe entfettet (2 Minuten in 50% Azeton in Aqua dest., 2 Minuten 100% Azeton, 2 Minuten 50% Azeton in Aqua dest., 2 Minuten PB, 2 Minuten PB und dann in PB/BSA (PB mit 1g/l Rinderalbumin), die andere Hälfte wurde direkt in PB/BSA überführt. Alle Schnitte wurden zum Absättigen unspezifischer Bindungsstellen 30 Minuten in PB mit 5% Ziegenserum bei RT inkubiert. Anschließend wurde das Ziegenserum abgenommen und der primäre Antikörper in der jeweiligen Verdünnung (in PB/BSA) oder nur PB/BSA als Negativkontrolle zugesetzt und über Nacht bei 4°C inkubiert.

Der primäre Antikörper wurden mit einem biotinylierten, sekundären Antikörper von der Ziege nachgewiesen. Als sekundäre Antikörper (siehe Tabelle X, Seite 69) wurden Antiseren verwendet, die Immunglobuline derjenigen Wirtstiere erkennen, in denen die primären Antikörper hergestellt sind (hier also Immunglobuline aus Ratte oder Hamster). Die sekundären Antikörper wurden 30 Minuten mit normalem Mäuseserum präinkubiert um Kreuzreaktivität der sekundären Antikörper gegen Maus-Immunglobuline abzubinden und so

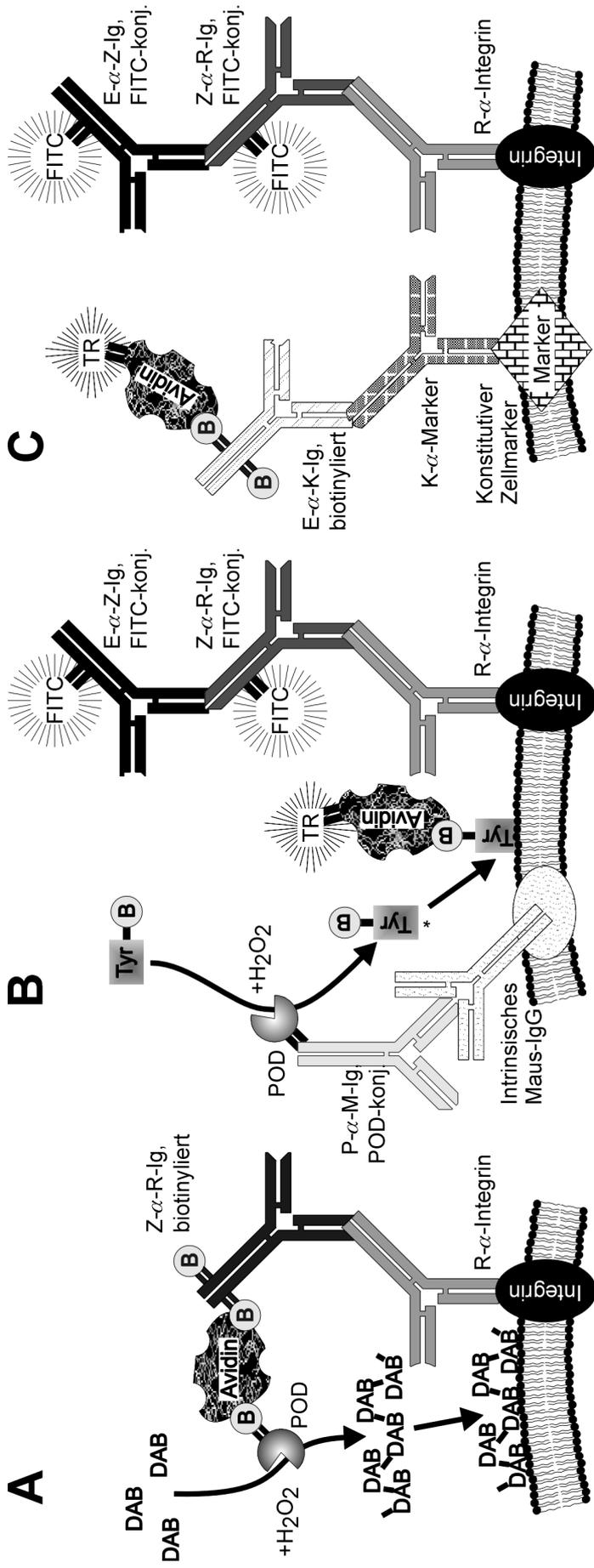


Abbildung 5. Immunhistochemische Nachweismethoden. Gezeigt ist der Nachweis einer Integrin-Untereinheit mit einem monoklonalen Antikörper aus der Ratte. Bei anderen Antigenen und Wirtstieren wird die Methode analog angewendet. **A. Diaminobenzidin (DAB)-Methode.** Das Maus-Integrin wird von dem primären Antikörper aus der Ratte (R- α -Integrin) erkannt, mit einem biotinylierten Ziegen-Antikörper gegen Ratten-Ig (Z- α -R-Ig) markiert und schließlich über den Niederschlag der ABC/DAB-Reaktion nachgewiesen. **B. Fluoreszenz-Doppelfärbung mit intrinsischem IgG.** Die Integrin-Untereinheit wird mit einer Kette von Antikörpern aus Ratte gegen Maus-Integrin (R- α -Integrin), Ziege gegen Ratten-Ig (Z- α -R-Ig) und Esel gegen Ziegen-Ig (E- α -Z-Ig) markiert und durch konjugiertes FITC sichtbar gemacht. Das im Mäusehirn konstitutiv an Mikroglia gebundene IgG wird mit einem Pferde-Antikörper gegen Maus-IgG (P- α -M-Ig) markiert, die daran konjugierte Peroxidase verankert dann biotinyliertes Tyramin kovalent im Gewebe, das über den TexasRed-Avidin-Komplex detektiert wird. **C. Fluoreszenz-Doppelfärbung mit anderen Zellmarkern.** Das Maus-Integrin wird wie bei B mit FITC markiert. Die Doppelmarkierung erfolgt mit einem Kaninchen-Antikörper gegen den Zellmarker (K- α -Marker), der mit einem biotinylierten Esel gegen Kaninchen-IgG (E- α -K-Ig) und dem TexasRed-Avidin-Komplex detektiert wird.

Abkürzungen: B Biotin, DAB Diaminobenzidin, E Esel, FITC Fluorescein, K Kaninchen, konj. konjugiert, Ig Immunglobulin, M Maus, P Pferd, POD Peroxidase, R Ratte, Tyr Tyramin, TR TexasRed, Z Ziege.

im Schnitt zu vermeiden. Der präinkubierte, sekundäre Antikörper wurde in PB/BSA mit 5% Ziegenserum 1:100 verdünnt. Die Schnitte wurden nun gründlich in PB/BSA, PB, PB und PB/BSA gewaschen und dann in den präinkubierten, endverdünnten, sekundären Antikörpern 1 Stunde bei RT inkubiert und wieder gründlich in PB/BSA, PB/BSA, PB und PB gewaschen. Der Komplex aus biotinylierten, sekundären Antikörper, primären Antikörper und gesuchtem Integrin (Abbildung 5a, Seite 39) wurde nun mit dem Avidin-Biotin-Peroxidasesystem sichtbar gemacht, bei dem an den biotinylierten Antikörper über eine

Biotin-Avidin-Biotin-Brücke eine biotinylierte Peroxidase gebunden wird. Die Peroxidase oxidiert dann gelöstes 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) unter Reduktion von H_2O_2 . Das oxidierte Diaminobenzidin polymerisiert und bildet einen hochgradig unlöslichen, rot-bräunlichen Niederschlag (Abbildung 6, Seite 39; Graham und Karnovsky, 1965; Sternberger, 1986).

Für die ABC-DAB-Reaktion wurden die Schnitte zuerst 1 Stunde lang in ABC (Vector, Lösung A 1:125 und Lösung B 1:125 in PB, 30 Minuten vor Gebrauch angesetzt) inkubiert, dann das ABC gründlich in PB, PB, PB und PBS ausgewaschen, schließlich wurde die Reaktion durch Zusatz vom DAB (0,5 mg/1 ml in PBS; filtriert) mit H_2O_2 (1:3000 verdünnt) gestartet und nach 5 Minuten in Aqua dest. abgestoppt und gewaschen. Die Schnitte wurden nun in einer Alkoholreihe (jeweils 1 Minute in Ethanol 70%, 70%, 90%, 95%, 100%, 100%; Isopropanol 100%; Xylol 100%, 100%) entfettet und mit DEPEX eingebettet.

Auch endogene Peroxidasen im Schnitt können DAB oxidieren, ihre Aktivität konnte in der

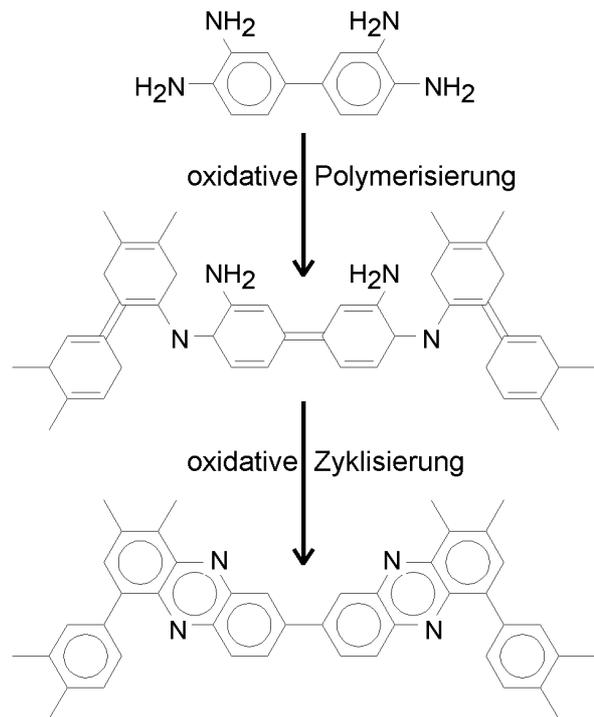


Abbildung 6. Niederschlagsreaktion des 3,3'-Diaminobenzidins (DAB). In Anwesenheit von H_2O_2 wird das DAB von Peroxidasen zuerst oxidativ polymerisiert und zyklisiert und bildet dann einen rot-bräunlichen, unlöslichen Niederschlag.

Negativkontrolle beurteilt werden. Der Schnitt mit dem besten Signal-Rausch-Verhältnis zeigte die optimale Konzentration des Antikörpers.

2.1.3.2 Titration im Gehirn

Um die optimale Verdünnung der Integrin-Antikörper für Immunhistochemie im Gehirn zu bestimmen, wurde die in der Milz gefundene, optimale Verdünnung als Basis benutzt und dann für jeden Antikörper 2 bis 3 angrenzende Verdünnungen getestet. Für die Antikörper, die in der Milz keine Immunreaktivität zeigten, wurden Verdünnungen von 1:100, 1:1.000 und 1:6.000 verwandt. Es wurden für jeden Antikörper Schnitte durch den Hirnstamm jeweils vom Tag 3, 7 und 14 nach Durchtrennung des Nervus facialis benutzt, auf denen auch das Kleinhirn angeschnitten war.

Die Schnitte wurden dem -80°C-Gefrierschrank entnommen, aufgetaut, in Aqua bidest. rehydriert und unter einem binokularen Mikroskop auf den gelatinierten Objektträgern in Aqua bidest. ausgebreitet um Falten- und Luftblasenbildung im Schnitt zu vermeiden. Dann wurden die Schnitte 5 Minuten an der Luft getrocknet und dann 5 Minuten in 4% Paraformaldehyd (in PB) fixiert. Anschließend folgte die gleiche Prozedur wie bei der Immunhistochemie in der Milz nach der Fixierung unter 2.1.3.1 beschrieben, wobei nur das Gewebe für diejenigen Antikörper mit Azeton behandelt, für die auch in der Milz die Azetonbehandlung für das optimale Resultat nötig war. Wieder wurde für die optimale Verdünnung jedes Antikörpers der Schnitt gesucht, der das beste Signal-Rausch-Verhältnis zeigte. Jetzt konnte an den benutzten Tagen 3, 7 und 14 nach Fazialis-Durchtrennung der Unterschied in der Färbung im operierten Nucleus facialis und dem als Kontrolle dienenden kontralateralen Nucleus facialis untersucht werden.

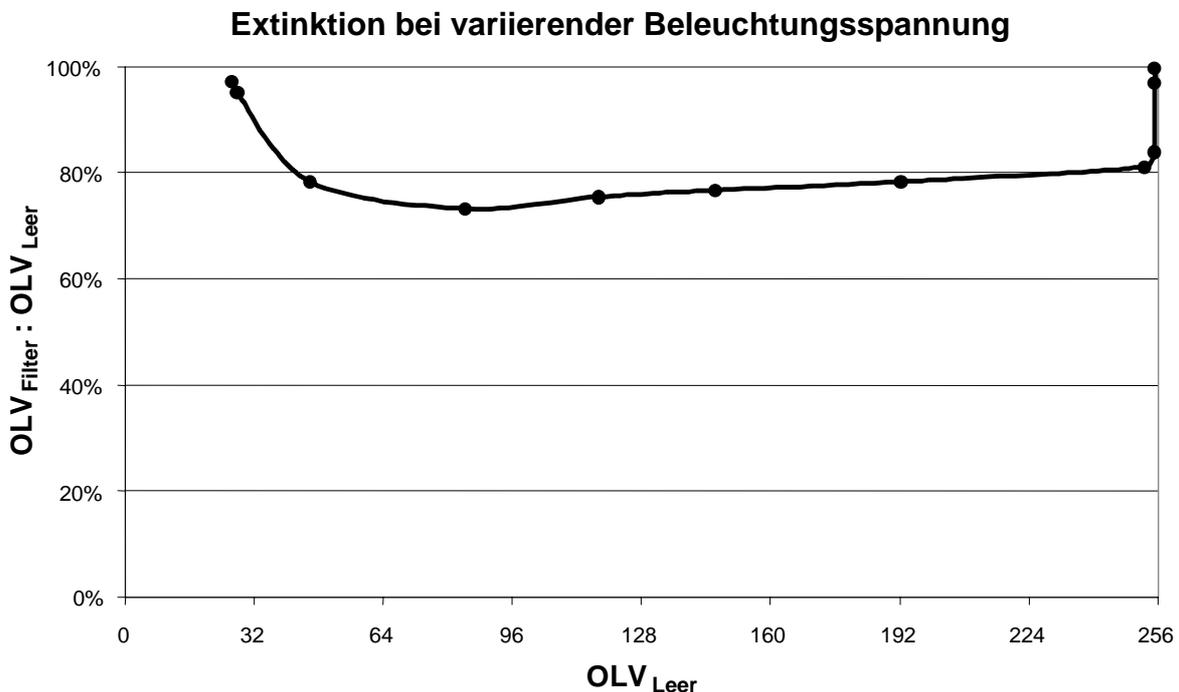
2.1.4 Zeitverlauf der Integrin-Immunreaktivität mit DAB/Co/Ni-Immunhistochemie

Einige Integrine zeigten ein unterschiedliches Färbemuster im operierten gegenüber dem als Kontrolle im selben Schnitt dienenden kontralateralen Nucleus facialis. Der Zeitverlauf der Immunreaktivität dieser Integrin-Untereinheiten im Nucleus facialis wurde nun in einer DAB-

Niederschlagsfärbung lichtmikroskopisch quantifiziert.

2.1.4.1 Lichtextinktion der digitalen Kamera

Um die Stärke einer Färbung mit einer digitalen Kamera quantifizieren zu können, ist es notwendig zu wissen, wie der mathematische Zusammenhang zwischen Abschwächung des durch den Gewebsschnitt tretenden Lichtstrahls und der resultierenden optischen Lichtwerte (OLV) der digitalen Kamera ist. Dazu wurde ein leerer Glasobjektträger mit einem Graufilter bezogen. Dann wurde die Kante des Filters in die Mitte des Bildausschnittes der Kamera eingestellt, die Mittelwerte der optischen Lichtwerte im Bereich des Parafilms (OLV_{Filter}) und des leeren Objektträgers (OLV_{Leer}) im selben Gesichtsfeld bestimmt und die Extinktion (ε) = $OLV_{\text{Filter}} : OLV_{\text{Leer}}$ des Graufilters berechnet. Die Beleuchtungsspannung wurde dann variiert und der Extinktionskoeffizient (ε) gegen OLV_{Leer} graphisch aufgetragen (Abbildung 7, Seite 41).



Der Extinktion (ε) variiert über einen weiten Bereich (48 bis 250) nur wenig und kann hier als näherungsweise als konstant betrachtet werden. Es gilt also für diesen Bereich:

$$\varepsilon = \text{OLV}_{\text{Filter}} : \text{OLV}_{\text{Leer}} = \text{konstant} \quad (1)$$

Wenn das Licht von mehreren, gleichen, in Reihe geschalteten Filtern abgeschwächt wird, kann der optische Lichtwert nach f Filtern wegen der Konstanz von ε im Meßbereich als Funktion von f ausgedrückt werden:

$$\text{OLV} (1) = \varepsilon \text{ OLV} (0), \quad (\text{mit } \text{OLV} (f=1) = \text{OLV}_{\text{Filter}}, \text{ OLV} (f=0) = \text{OLV}_{\text{Filter}}) \quad (2)$$

$$\text{OLV} (f) = \varepsilon \text{ OLV} (f-1), \quad (3)$$

Aus (2) und (3) ergibt sich durch vollständige Induktion:

$$\text{OLV} (f) = \varepsilon^f \text{ OLV} (0), \quad (4)$$

Im Experiment wird der OLV gemessen und f gesucht. Umformung von (4) ergibt:

$$f = k \times \ln \frac{\text{OLV} (0)}{\text{OLV} (f)} \quad (\text{mit } k = \frac{-1}{\ln \varepsilon}) \quad (5)$$

In vorliegender Arbeit ist die Konzentration des Farbstoffes (Färbestärke) aufgrund seiner physikalisch-chemischen Eigenschaften seiner Filterwirkung proportional. OLV(0) ist der optische Lichtwert der Referenz (Hintergrund) und OLV(f) der Lichtwert der zu messenden Färbung. Es gilt

$$\text{Färbestärke} \sim \ln \frac{\text{OLV}_{\text{Referenz}}}{\text{OLV}_{\text{zu messende Färbung}}} \quad (6a)$$

In dieser Arbeit treten nur relativ kleine Unterschiede der OLV auf. Für diese kleinen Zahlen, ist die Differenz der Werte annähernd dem Logarithmus ihres Quotienten proportional und damit kann näherungsweise berechnet werden:

$$\text{Färbestärke} \sim \text{OLV}_{\text{Referenz}} - \text{OLV}_{\text{zu messende Färbung}} \quad (6b)$$

Zusammenfassend, lassen sich mit den Formeln (6) die Stärken zweier Färbungen auf dem Verhältnisniveau vergleichen. Diese Vergleichbarkeit ist in vorliegender Arbeit die Grundlage für die Messung aller Niederschlagsfärbungen.

2.1.4.2 Immunhistochemie mit der DAB/Co/Ni-Methode

Für die Messung wurden die Schnitte wie unter 2.1.3.2 beschrieben immunhistochemisch gefärbt, mit dem einzigen Unterschied, daß der DAB-Reaktion außer H₂O₂ (1:3000 verdünnt)

noch 0,25 g/l CoCl_2 und 0,2 g/l NiSO_4 zugesetzt wurden. Die Kobalt- und Nickelionen chelatieren das polymerisierte DAB, intensivieren die Niederschlagsfarbe und geben ihr einen blau-schwarzen Ton, ohne die Hintergrundfärbung zu erhöhen (Hsu und Soban, 1982). Je nach gesuchten Antigen wurde das Gewebe gegebenenfalls mit Azeton vorbehandelt. Die Antikörper wurden gemäß der in der Milz bestimmten, optimalen Verdünnung eingesetzt (siehe 2.1.3.2; Tabelle VIII, Seite 68).

2.1.4.3 Messung der Färbeintensität, MEAN-SD Algorithmus

Um den Zeitverlauf der Gesamtimmunoreaktivität im Nucleus facialis zu untersuchen, wurden jeweils 4 Schnitte vom Tag 0, 4 Schnitte vom Tag 1, 4 Schnitte vom Tag 2, 5 Schnitte vom Tag 4, 4 Schnitte vom Tag 7, 4 Schnitte vom Tag 14, 4 Schnitte vom Tag 21, 5 Schnitte vom Tag 42 nach der Fazialis-Durchtrennung gefärbt. Die Schnitte wurden nun in einem Zeiss Axiophot Mikroskop bei einer konstanten Beleuchtungsspannung mit einem 2,5x Objektiv und einer Sony 89B CCD Kamera (Model CX-77CC) aufgenommen. Diese Kamera hat eine Auflösung von 640 x 400 Bildpunkten und liefert pro Bildpunkt (Pixel) einen optische Lichtwert (OLV) von 0-255. Das digitalisierte Bild wurde mit einem Rechner und einer Image Technology OFG Card (VP-1100-768) in das Bildverarbeitungsprogramm OPTIMAS 6.1 eingelesen. Nun wurde der Nucleus facialis als Auswertungsgebiet (ROI) markiert und Mittelwert und Standardabweichung der Pixel-OLV im ROI von OPTIMAS nach der Maximum-Likelihood-Methode geschätzt.

Als Maß für die Stärke der Färbung, wurde die Färbeintensität mit dem MEAN-SD-Algorithmus berechnet. Die Zusammenfassung des Mittelwertes und der Standardabweichung liefert besonders stabile und zuverlässige Ergebnisse für die Quantifizierung von Immunhistochemie (Möller et al., 1996). Als Ausgangsbasis des Algorithmus dient der Mittelwert und die Standardabweichung der OLV im ROI eines Schnittes, ein OLV von 0 bedeutet dabei minimale Lichtintensität, also maximale Färbung (schwarz) und 255 maximale Lichtintensität, also keine Färbung (weiß). Ein gleichmäßiger Anstieg der Stärke der Färbung macht sich in einem gleichmäßigen Abfall des optischen

Lichtwertes (OLV) und damit des mittleren OLV bemerkbar. Es ist aber auch möglich, daß nur wenige Pixel einen sehr deutlich Färbeanstieg zeigen, subjektiv entspricht auch dieses Reaktionsmuster einer stärkeren Färbung. Der Mittelwert sinkt wegen der geringen Zahl der beteiligten Pixel nur wenig ab, in diesem Fall bewirkt aber der Färbeanstieg einen starken Anstieg der Standardabweichung der OLV. Da sich also Mittelwert und die Standardabweichung bei ansteigender Färbung gegenläufig verhalten, dient Mittelwert minus Standardabweichung (MEAN-SD) als Maß für die Färbung (Möller et al., 1996). Zum Schluß wird diese Differenz noch von 255 subtrahiert und dann Färbeintensität (FI) genannt, damit steigt mit steigender Färbung auch die FI an. Es ergibt sich also folgende Formel für den MEAN-SD Algorithmus:

$$\text{Färbeintensität (FI)} = 255 - (\text{Mittelwert} - \text{Standardabweichung}),$$

wobei hier 255 der maximale OLV ist und sich Mittelwert und Standardabweichung auf den Auswertungsbereich (ROI) beziehen.

2.1.4.4 Statistische Auswertung des Zeitverlaufs der gesamten Integrin-Immunoreaktivität

Zur Errechnung der Färbestärke in diesem Experiment wurde nun zu definierten Zeitpunkten nach Fazialis-Durchtrennung die Färbeintensität (FI) des operierten und kontralateralen Fazialis-Kerns bei 4 bis 5 Schnitten von verschiedenen Tieren nach dem MEAN-SD Algorithmus berechnet, dann die Mittelwerte der Färbeintensitäten getrennt für die operierten und die kontralateralen Seiten gebildet, graphisch aufgetragen und schließlich mit einem gepaarten t-Test bei einem Signifikanzniveau von 5% auf statistische signifikanten Unterschied getestet (siehe Abbildung 15, Seite 76). Die Berechnung wurde durch das Programmieren einer Makrofamilie in OPTIMAS teilautomatisiert. Die Daten wurden von OPTIMAS nach EXCEL exportiert und dort statistisch ausgewertet.

2.1.5 Zelluläre Lokalisation und Zeitverlauf der Integrin-Immunoreaktivität mit Immunfluoreszenz-Doppelmarkierungen und konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie

Mit der DAB-Niederschlagsfärbung konnte die Integrin-Immunoreaktivität gut sichtbar gemacht werden. Die Einordnung der gefärbten Zellen als Neurone, Astrozyten, Oligodendroglia, Mikroglia, Endothelien oder Leukozyten war aber mit dieser Methode nur anhand der Morphologie der Zellen möglich. Im Falle eines Neurons ist diese Zuordnung meist leicht möglich, schwieriger verhält es sich aber bei der Glia und den Leukozyten. Diese Zellen ändern sich in ihren jeweiligen Funktionszuständen teilweise stark und können sich dann im Lichtmikroskop zum Verwechseln ähnlich sehen.

Eine Lösung dieses Problems bietet die Doppelfärbung mit einem zellulären Marker in der Fluoreszenzmikroskopie. Das gesuchte Integrin wird hierbei als ein Antigen und ein konstitutiv exprimierter, Zelltyp-spezifischer Marker als das andere Antigen benutzt. In dieser Studie diente das saure Gliafaserprotein (GFAP) als Astrozytenmarker, IBA1 oder intrinsisches Mäuse-IgG als Marker für Mikroglia, Laminin als Marker für Endothelien und Galanin als Marker für axotomierte Motoneurone und ihre Fortsätze (Moore, 1989; Klein et al., 1997). Die Integrin-Antikörper wurden mit an sekundäre und tertiäre Antikörper gekoppelten Fluoreszein-5-Isothiozyanat (FITC) markiert, dieser Farbstoff fluoresziert grün. Die Zellmarker wurden über das rot fluoreszierende TexasRed sichtbar gemacht.

Die Doppelmarkierung ermöglicht auch die zelluläre Quantifizierung der Integrin-Immunoreaktivität auf den Zelltypmasken. Hierzu wurde der relative Färbefaktor (RISC-Algorithmus) verwendet. Während die mit dem MEAN-SD Algorithmus ermittelte Färbeintensität die Gesamtfärbung widerspiegelt und sowohl bei steigender Färbung einer Zelle als auch bei bloßer Vermehrung der Zellen ohne individuelle Färbungszunahme ansteigt, ermöglicht der RISC-Algorithmus die Errechnung des relativen Färbefaktoren und damit die durchschnittliche Färbung einer einzelnen Zelle im Verhältnis zum Hintergrund, unabhängig von Veränderungen der Zellzahl.

2.1.5.1 Immunhistochemie mit Fluoreszenz-Doppelmarkierungen

Zur Untersuchung der zellulären Lokalisation wurden Schnitte vom Tag 2 und Tag 14 nach Fazialis-Durchtrennung verwendet. Für die Messung des Zeitverlaufs der relativen Färbefaktoren von Integrinen auf Mikroglia wurden jeweils 4 Schnitte von Tag 0, 4 Schnitte von Tag 1, 4 Schnitte von Tag 2, 5 Schnitte von Tag 4, 4 Schnitte von Tag 7, 4 Schnitte von Tag 14, 4 Schnitte von Tag 21, 5 Schnitte von Tag 42 nach Fazialis-Durchtrennung untersucht. Für die Messung der Immunreaktivität auf Endothelien wurden jeweils 3 bis 5 verschiedene Tiere am Tag 4 bzw. 14 nach Fazialis-Durchtrennung berücksichtigt.

Für die Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen wurden die 20 μm dicken Schnitte initial wie unter 2.1.3.2 beschrieben behandelt. Die Präinkubation erfolgte dabei mit 5% Eselserum (in PB). Die weitere Behandlung unterschied sich jetzt je nachdem, ob intrinsisches IgG oder einer der polyklonalen Kaninchenantikörper zur Zellmarkierung benutzt wurde.

2.1.5.1.1 Doppelmarkierung mit intrinsischem IgG

Im Gehirn einer jeder normalen Maus haben Mikrogliazellen über ihren Fc-Rezeptor Immunglobuline gebunden (Fishman und Savitt, 1989; Werner et al., 1998). Diese Immunglobuline wurden in dieser Arbeit als Mikroglia-Zellmarker benutzt. Abbildung 5b (Seite 39) zeigt das Schema der Nachweismethode. Hierzu wurden die Schnitte nach der Präinkubation in Eselserum, mit einem Peroxidase-konjugiertem Antiserum gegen Maus-IgG aus dem Pferd (1:400 in PB/BSA verdünnt) für 1 Stunde bei Raumtemperatur (RT) inkubiert und dann gründlich in PB/BSA, PB/BSA, PB und PB gewaschen. Die Peroxidase oxidierte als Substrat zugegebenes biotinyliertes Tyramin (1:3.000 in PB verdünnt) unter Reduktion von H_2O_2 (1:10,000 in PB). Bei dieser Reaktion bindet das Tyramin kovalent an den Gewebsschnitt (Bobrow et al., 1989, 1991, 1992), und das konjugierte Biotin kann später nachgewiesen werden (Abbildung 8, Seite 47; "catalyzed reporter deposition"; Adams, 1992). Die Reaktion wurde nach 10 Minuten bei RT in PB gestoppt. Der Schnitt wurde jetzt in PB, PB/BSA und PB/BSA und erneut mit 5% Eselserum (in PB) für 30 Minuten bei RT

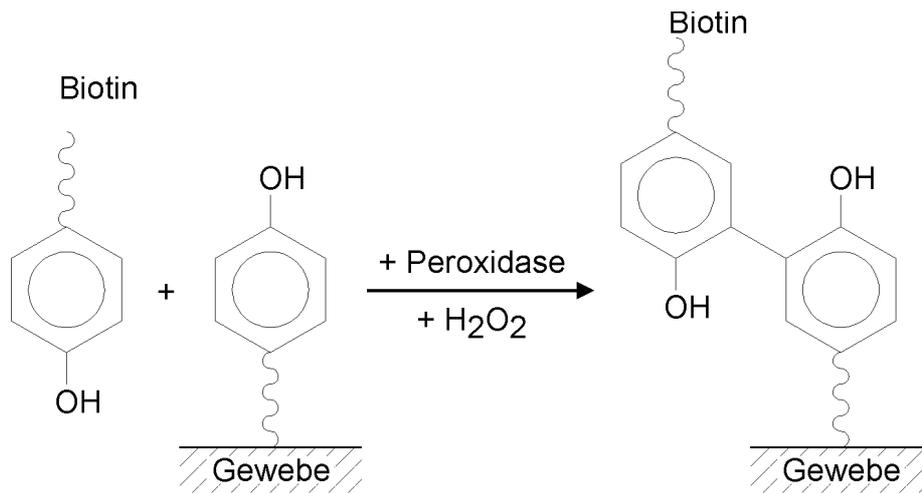


Abbildung 8. Tyramin-Biotin-Reaktion ("catalyzed reporter deposition"). In Anwesenheit von H_2O_2 und Peroxidasen wird das biotinylierte Tyramin oxidativ an das Gewebe gebunden. Später kann dann das Biotin nachgewiesen werden.

präinkubiert, um durch die Peroxidase-Reaktion freigelegte, unspezifischen Bindungsstellen abzusättigen. Das Eserum wurde abgenommen und der Schnitt mit einem monoklonalen Antikörper gegen das gesuchte Integrin in PB/BSA verdünnt (siehe 2.1.3.2; Tabelle VIII, Seite 68), über Nacht bei $4^{\circ}C$ inkubiert und dann in PB/BSA, PB, PB und PB/BSA gewaschen. Nun wurde der Schnitt mit einem sekundären FITC-konjugiertem Antiserum gegen Ratten-IgG bzw. gegen Hamster-IgG (für primäre Antikörper aus dem Hamster) aus der Ziege (1:100 in PB/BSA verdünnt) für 1 Stunde bei RT inkubiert und dann in PB, PB und PB/BSA gewaschen. Schließlich wurde der Schnitt simultan mit einem sekundären FITC-konjugierten Antiserum gegen Ziegen-IgG aus dem Esel (1:100 verdünnt, zur Verstärkung der FITC-Markierung) und dem TexasRed-Avidin-Komplex (zum Nachweis des gebundenen Biotins, 1:1.000 verdünnt, beide in PB/BSA) für eine Stunde bei RT inkubiert. Der Schnitt wurde dann gründlich in PB/BSA, PB, PB und PB gewaschen und mit VectaShield eingedeckelt. Um ein Ausbleichen der Fluoreszenz zu minimieren, wurden die Schnitte bei $4^{\circ}C$ in der Dunkelheit gelagert und innerhalb von sieben Tagen nach der Färbung digitalisiert (siehe 2.1.5.2).

2.1.5.1.2 Doppelmarkierung mit IBA1, GFAP, Laminin und Galanin

Als weitere Marker zur Zellidentifizierung wurden Antiseren gegen IBA1 für Mikroglia, GFAP

für Astrozyten, Laminin für Endothelien und Galanin für Motoneurone verwendet. Abbildung 5c (Seite 39) zeigt ein Schema der Nachweismethode.

Nach der Präinkubation in Eselserum wurde das Serum abgenommen und die Schnitte simultan mit den monoklonalen Antikörper gegen das gesuchte Integrin (in der entsprechenden Verdünnung; siehe 2.1.3.2 und Tabelle VIII, Seite 68) und Antiseren gegen IBA1, GFAP oder Laminin (alle 1:100 in PB/BSA verdünnt) über Nacht bei 4°C inkubiert und dann in PB/BSA, PB, PB und PB/BSA gewaschen. Die Schnitte wurden nun wieder simultan mit einem sekundären FITC-konjugierten Antiserum gegen Ratten-IgG bzw. gegen Hamster-IgG (für primäre Antikörper aus dem Hamster) aus der Ziege und einem biotin-konjugierten Antiserum gegen Kaninchen-IgG aus dem Esel (beide 1:100 in PB/BSA verdünnt) für 1 Stunde bei RT inkubiert und dann in PB/BSA, PB, PB und PB/BSA gewaschen. Danach wurden simultan ein tertiäres FITC-konjugiertes Antiserum gegen Ziegen-IgG aus dem Esel (zur Verstärkung des FITC-Signals; 1:100 verdünnt) und TexasRed-Avidin (zum Nachweis des Biotins, 1:1.000 verdünnt; beide in PB/BSA) zugegeben und für 1 Stunde bei RT inkubiert. Nach dem gründlichen Waschen in PB/BSA, PB, PB und PB wurden die Schnitte mit VectaShield eingedeckelt und - um ein Ausbleichen der Fluoreszenz zu minimieren - bei 4°C in der Dunkelheit gelagert und innerhalb von sieben Tagen nach der Färbung digitalisiert (siehe 2.1.5.2).

2.1.5.2 Digitalisierung der Fluoreszenz im konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop und Autofluoreszenzextraktion

Die Immunofluoreszenz-Doppelmarkierung wurde in einem LEICA TCS 4D konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop sichtbar gemacht und digitale Mikrographien von der FITC-Markierung für die Integrine, von der TexasRed-Fluoreszenz für den jeweils verwandten Zellmarker und von der Autofluoreszenz aufgezeichnet. Die resultierenden Mikrographien hatten dabei eine Größe von 1024 x 1024 Pixel pro Bild, wobei jedes Pixel optische Lichtwerte (OLV) von 0 (maximal dunkel; keine Färbung) bis 255 (maximal hell; maximale Färbung) annehmen kann. Schließlich wurden die FITC und TexasRed-Mikrographien um

die Autofluoreszenz korrigiert.

2.1.5.2.1 Aufnahme der Mikrographien

Das Prinzip der Fluoreszenzmikroskopie basiert darauf, daß fluoreszente Farbstoffe von Licht bestimmter Wellenlängen angeregt werden und dann Licht anderer Wellenlängen emittieren. Wegen der verschiedenen Wellenlängen kann das Emissionssignal vom möglicherweise reflektierten Anregungssignal unterschieden werden. Verschiedene Farbstoffe unterscheiden sich nun in Anregungs- und Emissionsspektrum und können deshalb simultan eingesetzt werden. In diesen Versuchen diente ein Argon-Krypton-Laser zur Erzeugung des Lichtes. Die Farbstoffe wurden bei einer minimalen Laserspannung von 0,25 V angeregt. FITC wurde bei einer Wellenlänge von 488 nm angeregt und mit einem BP-FITC-Filter gemessen, der Licht in den Wellenlängen 510 bis 530 berücksichtigt. TexasRed wurde bei einer Wellenlänge von 588 nm angeregt und die Emission oberhalb von 590 nm mit einem LP590-Filter gemessen. Die Detektionsspannung wurde für die jeweilige Färbung so gewählt, daß die Bilder gerade nicht übersteuert waren, aber eine möglichst große Bandbreite erhältlich war, in der Regel bewegte sie sich zwischen 750 und 850 von 1000 (willkürliche Einheiten des Leica Mikroskops). Für die Messung der Daten wurde jeweils dieselbe Detektionsspannung beibehalten.

Von besonderem Interesse ist hier auch das Prinzip der Autofluoreszenz. Im Gewebe gibt es Strukturen die von sich aus fluoreszieren. Im Mäusehirn autofluoreszieren insbesondere die Mikrogliazellen. Die Autofluoreszenz kann hier ein Signal auch ohne Farbstoff vortäuschen. Interessanterweise hat die Autofluoreszenz kein scharfes Emissionsmaximum sondern emittiert über ein sehr breites Spektrum. Um dem Problem der Autofluoreszenz beizukommen, wurden die Raivichsche Korrektur durchgeführt (Raivich et al., 1998a). Dazu wurde der Schnitt bei maximaler Laserstärke (4,0 V) und einer Wellenlänge von 647 nm angeregt und die Emission autofluoreszenter Strukturen im Infrarotbereich bei Wellenlängen über 665 nm mit dem LP655-Filter und maximaler Detektionsspannung (1000 von 1000) gemessen.

Für die Quantifizierung wurde ein 10x Objektiv benutzt, hier entspricht eine Mikrographie einer Fläche von 1 mm x 1 mm. Für höher auflösende Darstellungen wurden 40x und 100x Objektive eingesetzt. Das konfokale Laser-Scanning-Mikroskop ermöglicht neben der zweidimensionalen Auflösung konventioneller Mikroskope auch das dreidimensionale Fokussieren des Laserstrahls in einer scharf definierten Tiefenebene. In diesen Experimenten wurde für jedes Bild 11 aufeinanderfolgende Schnittebenen im selben Abstand aufgenommen und dann mit dem MaxIntens-Algorithmus in ein einziges Bild kondensiert. Dieser Algorithmus wählt an jeder der 1024x1024 korrespondierenden Bildpunkte jeweils das hellste Pixel (entspricht größter OLV) aus den 11 Schnittebenen aus und setzt sie zu einer neuen Bildmatrix zusammen. Diese Technik entspricht also einer hochauflösenden Camera lucida-Zeichnung. Pro Bild resultierten drei originale Bildmatrizen, eine FITC-Matrix (OM_{FITC}) für die Integrin-Färbung, eine TexasRed (TR)-Matrix (OM_{FITC}) für den Zellmarker und eine Autofluoreszenzmatrix (OM_{AF}). Diese Matrizen wurden als drei Graustufenbildern im Tagged Image File Format (TIFF) gespeichert.

2.1.5.2.2 Extraktion der Autofluoreszenz

Die Korrektur der Autofluoreszenz erfolgte nach Raivich (Raivich et al., 1998a). Das Prinzip der Korrektur beruht darauf, daß autofluoreszente Strukturen in einem breiten Spektrum anregbar sind und Licht emittieren. Eine stärkere Autofluoreszenz führt daher zu einem prozentual gleichen Anstieg der optischen Lichtwerte (OLV) in einem breiten Spektrum von Wellenlängen. Für die Autofluoreszenz wird der Schnitt in einem Wellenlängenbereich angeregt, bei der die anderen Farbstoffe nicht reagieren. In dieser Arbeit wurde 647 nm zur Anregung gewählt. Die Detektion erfolgt jenseits von 665 nm im Infrarotbereich, wo auch die Farbstoffe nicht mehr emittieren. Das so gewonnene Bild zeigt die autofluoreszenten Strukturen. Diese Strukturen emittieren auch in dem FITC- und TexasRed-Bereich. Nun werden besonders stark reagierende Strukturen im Autofluoreszenzbild aufgesucht und mit den korrespondierenden Stellen im FITC- und TexasRed-Bild in Bezug gesetzt. Aus diesem Vergleich werden dann lineare Extraktionskoeffizienten bestimmt. Vom FITC- und TexasRed-

Bild wird dann die Autofluoreszenz korrigiert, indem von jedem Pixel im FITC- und TexasRed-Bild der optische Lichtwert des korrespondierenden Pixels im Autofluoreszenzbild unter Gewichtung mit dem jeweiligen Koeffizienten abgezogen wird. Die einzelnen Rechenschritte sollen im folgenden kurz dargestellt werden.

Zuerst wurden die drei TIFF-Mikrographien für FITC, TR und die Autofluoreszenz (AF) in OPTIMAS importiert. Dann wurden der Mittelwert (MW_{AF}) und die Standardabweichung (SD_{AF}) aller Pixel einer AF-Mikrographie (OM_{AF}) bestimmt. Die Profile besonders stark autofluoreszente Strukturen wurden dann mit der Flächensuchfunktion von OPTIMAS und einem Schwellenwert von $MW_{AF} + 5 \times SD_{AF}$ markiert. Der Mittelwert der OLV dieser hochautofluoreszenten Strukturen ($MW_{HAS[AF]}$) wurde berechnet. Diese Profile wurden nacheinander in die korrespondierende FITC- und TexasRed-Matrix (OM_{FITC} bzw. OM_{TR}) übertragen, wobei ihre Position dort den hochautofluoreszenten Strukturen in der AF-Matrix entsprach. Die Mittelwerte der OLV der Pixel in den Profilen wurden nun getrennt für FITC ($MW_{HAS[FITC]}$) und TexasRed ($MW_{HAS[TR]}$) berechnet. Schließlich wurde noch der Mittelwert aller OLV für FITC (MW_{FITC}) und TexasRed (MW_{TR}) berechnet. Die linearen Extraktionskoeffizienten für FITC (LEK_{FITC}) und TexasRed (LEK_{TR}) wurden dann wie folgt errechnet.

$$LEK_{FITC} = (MW_{HAS[FITC]} - MW_{FITC}) : (MW_{HAS[AF]} - MW_{AF}) \quad (7a)$$

$$LEK_{TR} = (MW_{HAS[TR]} - MW_{TR}) : (MW_{HAS[AF]} - M_{AF}) \quad (7b)$$

Dann wurden die korrigierten Matrizen für FITC (KM_{FITC}) und TexasRed (KM_{TR}) berechnet, indem für jeden der 1024×1024 Bildpunkte pro Matrix folgende Formel angewandt wurde:

$$KM_{FITC}[x,y] = OM_{FITC}[x,y] - LEK_{FITC} \times OM_{AF}[x,y] \quad (8a)$$

$$KM_{TR}[x,y] = OM_{TR}[x,y] - LEK_{TR} \times OM_{AF}[x,y] \quad (8b)$$

wobei x und y die Position des Pixels in X- und Y-Richtung indizieren (jeweils 0-1023). Die korrigierten Matrizen KM_{FITC} und KM_{TR} wurden nun wieder als Graustufenbildern im Tagged Image File Format (TIFF) zwischengespeichert. Die Extraktion der Autofluoreszenz erfolgte teilautomatisch durch Programmierung einer Makrofamilie in OPTIMAS und EXCEL.

2.1.5.3 Messung des relativen Färbefaktoren der Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen mit dem RISC-Algorithmus

Von besonderem Interesse für die Fragestellung dieser Arbeit war, wie sich die Integrin-Immunoreaktivität im Nucleus facialis auf zellulärer Ebene nach Durchtrennung des Nerven veränderte. Hierzu wurde der RISC-Algorithmus als Maß des relativen Färbefaktoren entwickelt (Raivich et al., 1998a). Dieser Algorithmus definiert zuerst die gesuchten zellulären Profile in der Mikrographie mit der zellulären Maske (hier IgG, IBA1, GFAP oder Laminin im TexasRed-Bild). Dann wird diese Maske der Zellart von Interesse auf die Mikrographie der zu quantifizierenden Färbung übertragen (hier Integrin-Färbung im FITC-Bild) und das Verhältnis des Mittelwertes der Pixel innerhalb der Maske zum Mittelwert aller Pixel im Bild berechnet. Der Logarithmus dieses Verhältnisses liefert den relativen Färbefaktor. Abbildung 9 (Seite 53) zeigt ein Schema der Methode. Im folgenden werden die Rechenschritte im Einzelnen beschrieben.

Zur Ermittlung des relativen Färbefaktoren wurden die um die Autofluoreszenz korrigierten Matrizen OM_{FITC} und OM_{TR} als TIFF in OPTIMAS importiert und mit der "Local Smoothing and Averaging" Funktion und einer 100 x 100 Pixel großen Rechteck geglättet. Dann wurden für jedes Matrizenpaar die Position des Nucleus facialis markiert und die Lage von OPTIMAS nach EXCEL exportiert und festgehalten. Danach wurden im korrigierten, geglätteten TexasRed-Bild (KM_{TR}) der Mittelwert (kMW_{TR}) und die Standardabweichung (kSD_{TR}) der optischen Lichtwerte (OLV) der Pixel, die den Nucleus facialis repräsentieren, berechnet und die zellulären Profile von OPTIMAS mit der Flächenfunktion und einem Schwellenwert von Mittelwert (kMW_{TR}) + Standardabweichung (kSD_{TR}) bestimmt. Diese Maske wurde auf das korrigierte, geglättete FITC-Bild übertragen und hier der Mittelwert der OLV aller Pixel im Nucleus facialis ($MW_{Nucleus\ facialis}$) und der Mittelwert von den Pixeln innerhalb der Maske ($MW_{zelluläre\ Maske}$) berechnet. Schließlich wurde der relative Färbefaktor (RISC) wie folgt errechnet:

$$RISC = \log (MW_{zelluläre\ Maske} : MW_{Nucleus\ facialis}), \quad (9)$$

wobei log den dekadische Logarithmus bezeichnet.

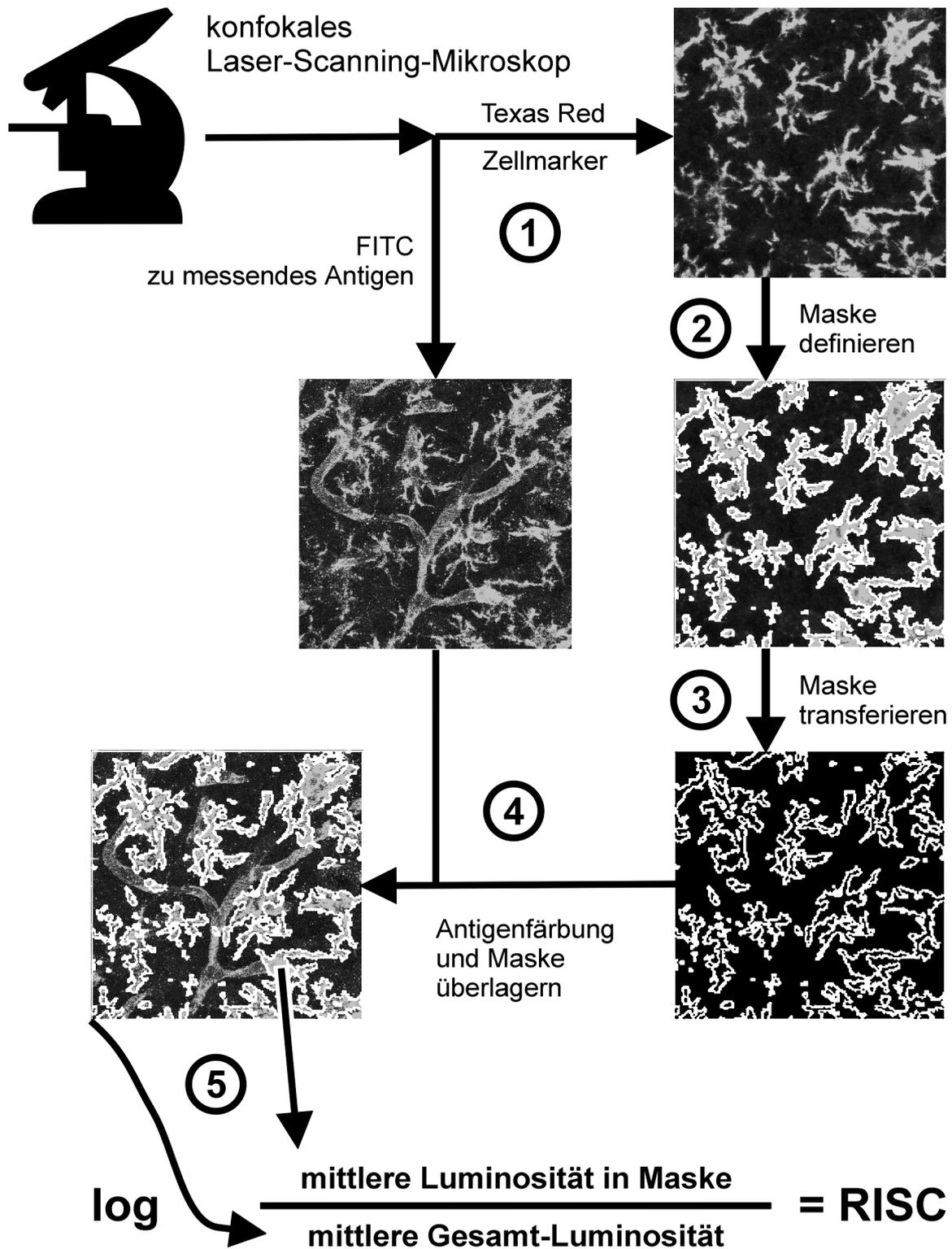


Abbildung 9. Messung des relativen Intensitäts- und Kontrastfaktors (RISC). 1. Die Bildmatrizen für das FITC-markierte zu messende Integrin und den TexasRed-markierten Zellmarker werden in konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop getrennt aus demselben Schnitt aufgenommen. 2. Anhand der Helligkeitsschwellenwerte wird im Markerbild die Zellmaske definiert. 3. Die Zellmaske wird exportiert und 4. dem Integrinbild überlagert. 5. Der Logarithmus aus dem Quotienten der mittleren Luminosität innerhalb der Maske und der mittleren Gesamt-Luminosität ergibt den RISC-Faktor.

Der relative Färbefaktor wurde jeweils auf der operierten Seite ($RISC_{\text{Operiert}}$) und der kontralateralen, gesunden Seite als endogene Kontrolle ($RISC_{\text{Kontrolle}}$) berechnet. Die Differenz dieser Werte

$$\text{DIFF-RISC} = RISC_{\text{Operiert}} - RISC_{\text{Kontrolle}} \quad (10)$$

ist ein Maß für die Veränderung Integrin-Immunoreaktivität nach dem Trauma.

Die Berechnung der relativen Färbefaktoren erfolgte teilautomatisch durch Programmierung einer Makrofamilie in OPTIMAS und die Ergebnisse wurden nach EXCEL exportiert.

2.1.5.4 Statistische Auswertung des Zeitverlaufs der zellulären Integrin-Immunoreaktivität

Zur statistischen Auswertung wurde zuerst an acht definierten Zeitpunkten nach Fazialis-Durchtrennung (Tage 0, 1, 2, 4, 7, 14, 21, 42) die relativen Färbefaktoren (RISC) der operierten und der kontralateralen Fazialis-Kerne bei 4 bis 5 Schnitten von verschiedenen Tieren nach dem RISC Algorithmus berechnet, dann die Mittelwerte der Färbeintensitäten getrennt für die operierten und die kontralateralen Seiten gebildet, graphisch aufgetragen und schließlich mit einem gepaarten t-Test bei einem Signifikanzniveau von 5% auf statistisch signifikante Unterschiede getestet (Abbildung 19, Seite 83). Die Daten wurden mit OPTIMAS erfaßt nach EXCEL exportiert und dort statistisch ausgewertet.

2.1.6 Zelluläre Lokalisation der Integrin-Immunoreaktivität mit Immunelektronenmikroskopie

Am Tag 14 nach der Axotomie fanden sich einige kleine runde Zellen im Nucleus facialis, die positiv für die Integrin-Untereinheiten α_L , β_2 , α_4 , β_1 und β_7 färbten. Um diese Zellen weiter zu charakterisieren, wurde eine immunhistochemische Färbung mit dem Antikörper gegen die Integrin-Untereinheit α_L am Tag 14 mit einem Zeiss EM 10 Elektronenmikroskop untersucht.

2.1.6.1 Gewebentnahme und -behandlung für Immunelektronenmikroskopie

Für die Elektronenmikroskopie wurden die Mäuse 14 Tage nach Durchtrennung des Nervus facialis wie unter 2.1.2 beschrieben in Äther getötet und dann transkardial perfundiert,

allerdings diesmal zuerst mit 100 ml PBS, danach mit 100 ml 4% Paraformaldehyd und 0,5% Glutaraldehyd (in PBS) und schließlich mit 100 ml 4% Paraformaldehyd (in PBS). Dann wurde der Hirnstamm entnommen, für 2 Stunden in 2% Paraformaldehyd (in PBS) bei 4°C nachfixiert, in Agarose eingebettet und mit einem Vibratom in 80 μ m dicke Schnitte geschnitten und sofort weiterbearbeitet.

2.1.6.2 Immunhistochemie für die Elektronenmikroskopie

Der immunhistochemische Nachweis der Integrin-Immunoreaktivität erfolgte ähnlich wie in der Lichtmikroskopie (siehe 2.1.3; Abbildung 5a, Seite 39) aber mit einigen, kleinen Unterschieden. Eine Vorbehandlung mit Azeton entfiel. Die Schnitte wurden dann für 4 Stunden bei Raumtemperatur in 5% Ziegen Serum (in PB) inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen im Schnitt abzusättigen, und anschließend mit einem primären, monoklonalen Antikörper gegen das α L-Integrin aus der Ratte (Verdünnung 1:3.000 in PB/BSA; siehe Tabelle VIII, Seite 68) über Nacht bei 4°C inkubiert. Im Gegensatz zu der Behandlung für die Lichtmikroskopie wurden die Schnitte nicht an einen Objektträger fixiert, sondern schwammen frei in den Lösungen und wurden auf einem Schütteltisch bei minimaler Umdrehungszahl gelagert. Der primäre Antikörper wurde dann in PB/BSA, PB, PB und PB/BSA ausgewaschen und das sekundäre, biotinylierte Ziegen Serum gegen Ratten-IgG für 8 Stunden bei 4°C zugesetzt und dann in PB/BSA, PB/BSA, PB und PB gewaschen. Als Nachweissystem wurde erneut ein Peroxidasensystem mit 3,3'-Diaminobenzidin (DAB), H₂O₂, CoCl₂ und NiSO₄ als Substrate verwendet. Die Schnitte wurden zuerst über Nacht im ABC bei 4°C inkubiert, danach in PB, PB, PB und PBS gewaschen, dann für 20 Minuten bei Raumtemperatur nur in DAB (0,5 mg/1 ml; filtriert) inkubiert, anschließend wurde die Peroxidasereaktion in DAB (0,5 mg/1 ml; filtriert) mit 0,25 g/l CoCl₂, 0,2 g/l NiSO₄ und H₂O₂ (1:3000 verdünnt) gestartet und schließlich nach 20 Minuten in Aqua dest. wieder gestoppt. Die Schnitte wurden dann sieben Tage lang in 2% Glutaraldehyd (in PBS) bei 4°C fixiert, dann in Dalton-Lösung I (1,1 g K₂Cr₂O₇, 0,9 g NaCl und 1 g OsO₄ in 100 ml Aqua dest., mit 1N KOH auf pH 7 eingestellt) osmiert, in einer Alkoholreihe dehydriert und in Araldit

eingebettet. Zur lichtmikroskopischen Orientierung wurden die halbdünnen 80 μm Schnitte dann mit Richardson-Lösung (100 ml Azur II, 100 ml Methylenblau, 80 g Sacharose und 5 Tropfen 4% Paraformaldehyd in 100 ml Aqua dest.) 4 Minuten gegengefärbt, dann ultradünne 100 nm Schnitte angefertigt und mit einem Leica UltraStain mit Uranylacetat und Bleizitrat nachkontrastiert. Schließlich wurde das Gewebe mit einem Zeiss EM 10 untersucht und Photographien angefertigt.

2.2 Ramifizierte Mikroglia in Zellkultur

Die *in vivo*-Experimente haben gezeigt, daß die Mikroglia im gesunden Gehirn eine Vielzahl von Integrin-Untereinheiten exprimiert und einige Integrine bereits innerhalb eines Tages nach der Verletzung hochreguliert werden. Die früheste Induktion von Integrinen erfolgt damit noch vor Beginn der Mikroglia-Proliferation zwischen Tag 1 und 2 nach Fazialis-Durchtrennung (Raivich et al., 1998a). Zum Zeitpunkt des Proliferationsbeginns zeigt die große Mehrzahl der Mikrogliazellen eine ramifizierte Morphologie (Lawson et al., 1992; Ohna et al., 1993; Raivich et al., 1994; Mander und Morris, 1996). Wie in 1.5 erläutert, wurde in dieser Arbeit zum Studium der ramifizierten Mikroglia eine Modifikation der von Sievers beschriebenen Kulturmethode benutzt (Sievers et al., 1994a). Nach Etablierung der Kulturmethode (2.2.1) wurde zuerst die Integrin-Expression der ramifizierten Mikroglia in ruhenden Kulturen und nach Stimulation mit LPS untersucht (2.2.2). Der Aktivierungszustand der Mikroglia *in vitro* wurde durch Vergleich mit dem Integrin-Expressionsmuster *in vivo* bestimmt. In den so definierten Kulturen von ramifizierter Mikroglia wurde dann das Proliferationsverhalten der Mikrogliazellen unter Zugabe verschiedener Zytokine analysiert (2.2.3) und anschließend die Veränderung der Integrin-Expression auf der ramifizierten Mikroglia nach LPS-Stimulation in Zellkultur untersucht.

2.2.1 Anlage der Zellkulturen

Zuerst wurden reine Kulturen von Astrozyten aus der Ratte und Mikroglia aus der Maus getrennt angelegt. Nachdem die Astrozyten zu einer konfluenten Einzelzellschicht

gewachsen waren, wurden die Mikrogliazellen auf den Astrozytenrasen ausgesät und ihnen dort Zeit zum Ramifizieren gegeben. Dann wurden verschiedene Zytokine oder LPS zugegeben und die Proliferation bzw. die Integrin-Expression der Mikroglia untersucht. Zur Kontrolle der Zellmorphologie wurden auch einige Monokulturen aus von Mikroglia abstammenden Makrophagen angelegt. Einen Überblick über die gesamte Kokulturmethode gibt Abbildung 10 (Seite 60).

Die Präparation und Handhabung der Zellen erfolgte unter sterilen Bedingungen, es wurden nur sterilisierte oder autoklavierte Instrumente benutzt und alle Medien wurden steril filtriert. Als Kulturmedium wurde grundsätzlich DMEM mit 15% FCS verwendet, dem 100 IU/ml Penizillin und 100 μ g/ml Streptomycin zugesetzt wurden, um Infektionen der Kulturen zu vermeiden.

2.2.1.1 Astrozyten aus der Ratte

Zur Kultur von Astrozyten wurde die Methode von McCarthy und de Vellis (McCarthy und de Vellis, 1980) mit leichten Veränderungen benutzt. Neugeborene Wistar-Ratten wurden geköpft und das Gehirn entnommen. Die Meningen wurden mit einem Wattetupfer entfernt. Die Hirnrinde wurde abpräpariert, in Kulturmedium (DMEM, 15% FCS, 100 IU/ml Penizillin, 100 μ g/ml Streptomycin) aufgenommen und durch mehrfaches Aufziehen mit einer Pasteurpipette homogenisiert. Diese Zellsuspension wurde in einer 75 cm³ unbeschichteten NUNC Kulturflasche in Kulturmedium (DMEM, 15% FCS, 100 IU/ml Penizillin und 100 μ g/ml Streptomycin) bei 37°C in einem Gasmisch aus Raumluft und 5% CO₂ für 14 Tage inkubiert. Alle 2-3 Tage erfolgte ein Medienwechsel.

Nach 14 Tagen hatten die Astrozyten einen konfluenten Zellrasen gebildet. Jetzt wurden die noch vereinzelt auf dem Zellrasen aufsitzenden Mikroglia, Oligodendrozyten und Neurone durch mehrfaches Waschen in DMEM und kräftiges Abklopfen entfernt. Die so gereinigten Astrozyten wurden mit Trypsin (0,25% in PBS) abgelöst und in einer Neubauer-Kammer gezählt. Schließlich wurden die Astrozyten auf eine Vier-Kammer-Platte mit einer Einzelkammergröße von 2,2 x 1,1 cm in einer Dichte von 85,000 Astrozyten/Kammer (für

LPS-Versuche) oder auf ein Glasplättchen in einer Petrischale mit 2 cm Durchmesser in einer Dichte von 20.000 Zellen/Petrischale (für Proliferationsversuche) ausgesät, dann wie zuvor in Kulturmedium bei 5% CO₂ gehalten und alle 2-3 Tage das Medium gewechselt.

Nach 4 (Vier-Kammer-Platte) bzw. 7 (Petrischale) Tagen waren die Astrozyten zu einer konfluenten Einzelschicht zusammengewachsen und standen für Kokulturen mit Mikrogliazellen bereit.

2.2.1.1.1 Immunzytochemische Reinheitsbestimmung der Kulturen

Um die Reinheit der Astrozytenkulturen zu bestimmen, wurden möglicherweise kontaminierende Oligodendrozyten und Mikroglia aus der Ratte immunzytochemisch sichtbar gemacht. Dazu wurden das Kulturmedium durch -20°C kaltes Methanol ersetzt und die Kulturen 30 Minuten lang bei 4°C fixiert. Anschließend wurden die Kulturen in 50% Methanol (in H₂O bidest.) und dann in Phosphat-Puffer (PB) gewaschen. Die Kulturen wurden nun für 30 Minuten bei Raumtemperatur in 5% Ziegenserum bzw. für OX42 5% Pferdeserum (beide in PB) inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Anschließend wurde das Serum abgenommen und den Kulturen der jeweilige, primäre Antikörper verdünnt in PB/BSA (PB mit 1g/l BSA) zugesetzt; zum Nachweis von Ratten-Mikroglia wurde der OX42-Antikörper aus der Maus in einer Verdünnung von 1:1000 benutzt und für die Oligodendrozyten ein Antikörper gegen Galaktocerebroside (GalC, 1:100) aus dem Kaninchen. Die Kulturen wurden über Nacht bei 4°C inkubiert, dann in PB/BSA, PB und PB gründlich gewaschen und schließlich in PB/BSA gesammelt. Zur Detektion des GalC-Antikörper wurden biotinylierte, sekundäre Antikörper aus Ziege gegen Kaninchen-IgG, für OX42 Antikörper aus dem Pferd gegen Maus-IgG zugegeben (jeweils 1:100 in PB/BSA verdünnt mit 5% Ziegenserum). Nach 1 Stunde Inkubation bei Raumtemperatur wurden dann die Antikörper gründlich in PB/BSA, PB/BSA, PB und PB ausgewaschen. Der Nachweis der biotinylierten Antikörper erfolgte mit dem Avidin-Biotin-Peroxidasesystem, bei dem gelöstes 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) als Substrat unter Reduktion von H₂O₂ oxidiert wird, polymerisiert und sich als unlöslicher rot-bräunlicher Niederschlag im Schnitt festsetzt (siehe

Abbildung 5a, Seite 39). Dazu wurden die Kulturen mit ABC (1:125 verdünnt) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Das ABC wurde dann in PB, PB und PB ausgewaschen und die Kulturen in PBS gesammelt. Jetzt wurde die Reaktion durch Zusatz von DAB (0,5 mg/1 ml; filtriert) mit H₂O₂ (1:3000 verdünnt) gestartet, nach 5 Minuten durch Aqua dest. abgestoppt und in Aqua dest. gewaschen. Die Rückseite der Glasplättchen wurde nun mit Depex auf einen Objektträger befestigt. Alle Kulturen wurden nun in einer Alkoholreihe (Ethanol 70%, 70%, 90%, 95%, 100%, 100%; Isopropanol 100%, 100%; Xylol 100%, 100%) entfettet und mit DEPEX eingebettet.

Es fanden sich regelmäßig weniger als 3% Mikroglia und weniger als 1,5% Oligodendrozyten in den Rattenastrozytenkulturen.

2.2.1.2 Mikroglia aus der Maus

Kulturen von Mikroglia aus der Maus wurden nach der leicht veränderten Methode von Giulian und Baker angelegt (Giulian und Baker, 1986). Neugeborene oder bis zu zwei Tage alte FVB-Mäuse wurden dekapitiert. Das gesamte Gehirn wurde entnommen, in Kulturmedium (DMEM, 15% FCS, 100 IU/ml Penizillin, 100 µg/ml Streptomycin) aufgenommen und durch mehrfaches Aufziehen mit einer Pasteurpipette homogenisiert. Die Zellsuspension wurde in einer 25 cm³ unbeschichteten NUNC Kulturflasche in Kulturmedium (DMEM, 15% FCS, 100 IU/ml Penizillin, 100 µg/ml Streptomycin) bei 37°C in einem Gasgemisch aus Raumluft und 5% CO₂ für zwei Wochen inkubiert. Medium wurde am Tag 7 und 12 gewechselt.

Nach 14 Tagen wurden die Kulturen 2 Stunden lang auf einem Schütteltisch bei 200 rpm geschüttelt. Dabei lösten sich die Mikrogliazellen und schwammen dann frei im Medium. Dieser Überstand wurde abgenommen und die Mikroglia in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Für Kokulturen wurden die Mikrogliazellen jetzt auf die konfluente Einzelschicht von Astrozyten (siehe 2.2.1.1) ausgesät und dann wie unter 2.2.1.3 weiterbehandelt. Um reine Mikrogliaulturen zu erhalten, wurden die Zellen direkt auf ein Glasplättchen in einer Petrischalen mit 2 cm Durchmesser in einer Dichte von 50.000 Zellen/Petrischale ausgesät

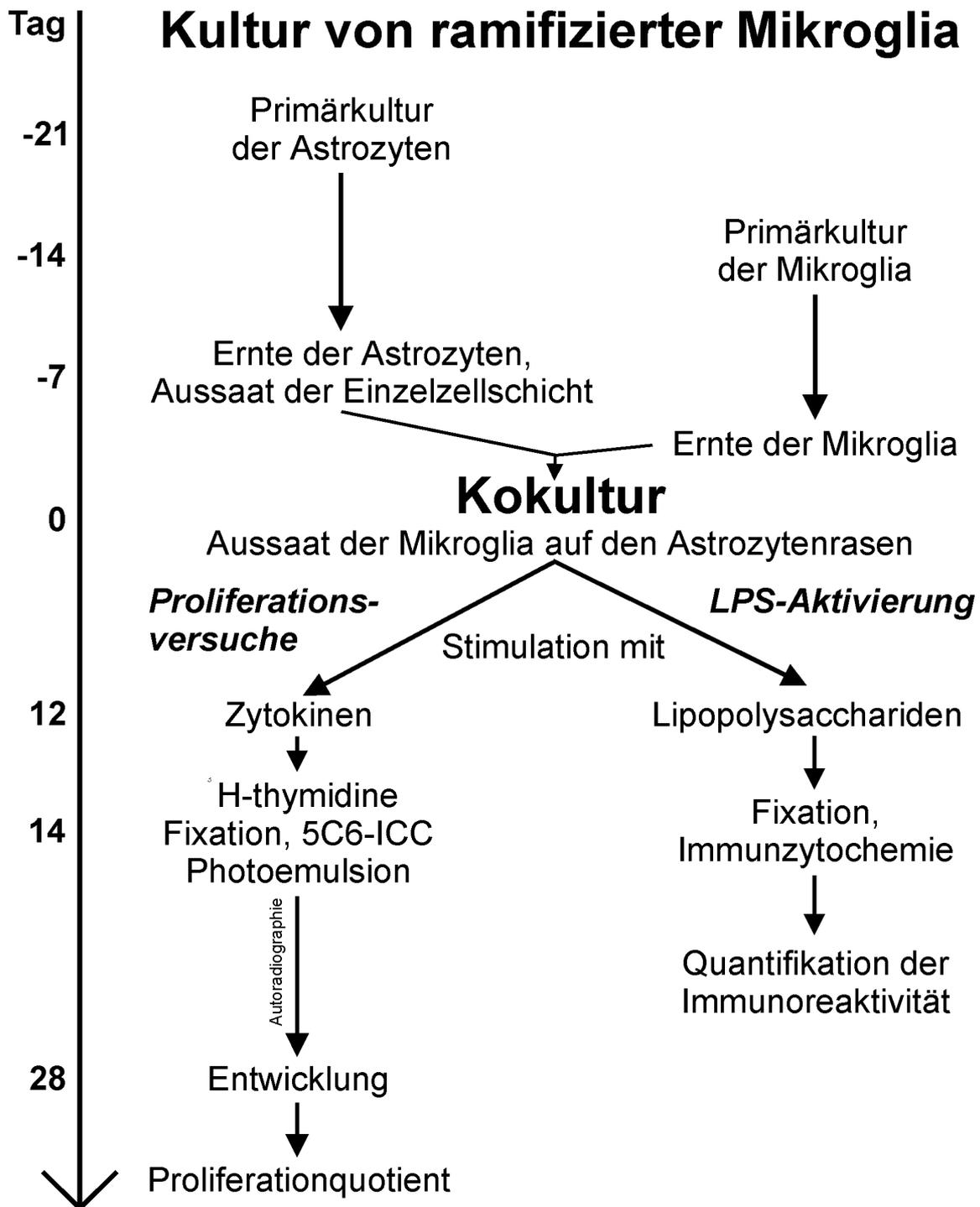


Abbildung 10. Kultur von ramifizierter Mikroglia. Die Astrozyten werden aus neugeborenen Ratten präpariert, kultiviert, nach ca. 14 Tagen geerntet und wieder ausgesät. Parallel wird die Mikroglia aus neugeborenen Mäusen präpariert und auf den Astrozytenrasen ausgesät, sobald er Konfluenz erreicht hat. Nach ca. 12 Tagen in Kokultur zeigt die Mikroglia eine ramifizierte Morphologie. Dann werden die Kulturen 2 Tage lang mit Zytokinen, inhibierenden Antikörpern oder Lipopolysacchariden (LPS) inkubiert. Für die Proliferationsversuche folgt 2 Stunden Zeit zur ³HT-Inkorporation, Fixierung der Kulturen, Färbung gegen das $\alpha M\beta 2$ -Integrin, Inkubation in Photoemulsionen, Entwicklung nach 2 Wochen und Errechnung der Proliferationsquotient. Für die LPS-Stimulation werden die Integrine gleich nach der zweitägigen Stimulation immunzytochemisch nachgewiesen und quantifiziert.

und wie zuvor in Kulturmedium bei 5% CO₂ gehalten. Nach 7 Tagen in Monokultur erfolgte ein Medienwechsel, und die Zellen wurden nach weiteren drei Tagen in Kultur photographiert.

2.2.1.3 Ramifizierten Mikroglia in Kokultur

Ramifizierte Mikroglia wurde nach einer leicht modifizierten Methode von Sievers kultiviert (Sievers et al., 1994a). Einen Überblick über die Kulturmethode gibt Abbildung 10 (Seite 60). Ein konfluenter Astrozytenrasen wurde, wie unter 2.2.1.1 beschrieben, angelegt. Auf diese Einzelzellschicht wurden dann Mikrogliazellen (siehe 2.2.1.2) in einer Dichte von 15.000 Zellen/Petrischale ausgesät. Die Kokulturen wurden 10 Tage lang in Kulturmedium (DMEM, 15% FCS, 100 IU/ml Penizillin, 100 µg/ml Streptomycin) bei 37°C in einem Gasgemisch aus Raumluft und 5% CO₂ gehalten, alle 2-3 Tage wurde das Kulturmedium gewechselt. Für die Proliferationsexperimente wurden die Zellen dann drei Tage lang in serumfreien Medium inkubiert (SFM; DMEM, 100 IU/ml Penizillin, 100 µg/ml Streptomycin, 5 µg/ml humanes Transferrin, 5 µg/ml Rinderinsulin, 12 ng/ml Progesteron, 60 nM Na₂SeO₂); für die LPS-Stimulation wurden sie die ganze Zeit in dem fötales Kälberserum enthaltenden Kulturmedium (DMEM mit 15% FCS, 100 IU/ml Penizillin und 100 µg/ml Streptomycin) belassen. Die Kokulturen standen nun für die Stimulationsversuche mit LPS oder Zytokinen und Wachstumsfaktoren zur Verfügung.

2.2.2 *Integrin-Expression in ruhenden Kulturen von ramifizierter Mikroglia und nach Stimulation mit LPS*

Nachdem in 2.2.1 die Kultur von ramifizierter Mikroglia auf einem Astrozytenrasen realisiert werden konnte, wurden die Integrin-Expression der ramifizierten Mikroglia untersucht. Zuerst wurde das Integrin-Immunoreaktivitätsmuster in unstimulierten Kulturen mit einer ganzen Reihe von monoklonalen Antikörpern, die spezifisch Integrin-Untereinheiten in der Milz oder dem Nervensystem der Maus erkennen, analysiert. Danach wurden die Kokulturen mit Lipopolysacchariden (LPS) aus *E. coli* (Stamm 055:B5) stimuliert. Von LPS ist bekannt, daß

es Zellen des Monozyten-Makrophagen-Systems in Kultur stark aktiviert. Um die Dosis-Wirkungsbeziehung zu ermitteln, wurden die Kulturen in Voruntersuchungen 2 Tage lang mit Lipopolysacchariden in Kulturmedium in Konzentrationen von 50n/ml, 500ng/ml, 5 μ g/ml, 50 μ g/ml und 500 μ g/ml inkubiert. Zur Kontrolle erhielten parallele Kokulturen nur Kulturmedium. Nachdem sich eine maximale morphologische Aktivierung der Mikroglia bereits bei einer Konzentration von 5 μ g/ml LPS fand (Abbildung 24, Seite 94), wurde diese Konzentration für die weiteren Untersuchungen der Integrin-Expression gewählt.

2.2.2.1 Immunzytochemie

Die verschiedenen Integrin-Untereinheiten wurden dann in den Kokulturen immunzytochemisch nachgewiesen. Dabei kam die unter 2.2.1.1.1 ausführlich beschriebene Methode mit leichten Modifikationen zur Anwendung. Die Kulturen wurden in -20°C kalten Methanol für 30 Minuten bei 4°C fixiert. Währenddessen wurden die Kammeraufbauten von den Kunststoffobjektträgern der verwendeten Vier-Kammer-Platten entfernt. Dann wurden die Zellen 5 Minuten durch Fixation in 4% Paraformaldehyd (in PB) kovalent an den Kunststoffobjektträger gebunden, gefolgt von einer Präinkubation in 5% Ziegen Serum für 1 Stunde. Dann wurden die Kulturen mit den monoklonalen Antikörpern gegen die gesuchten Integrin-Untereinheiten (Verdünnungen in PB/BSA siehe Tabelle VIII, Seite 68) über Nacht bei 4°C inkubiert. Die primären Antikörper wurden nun mit sekundären, biotinylierten, präinkubierten (siehe 2.1.3.1) Antiseren aus Ziege gegen Immunglobuline aus Ratte oder Hamster (entsprechend des Wirtes des Primärantikörpers) detektiert und dann mit ABC und DAB/H₂O₂ sichtbar gemacht. Die Kulturen wurden nach gründlicher Wässerung in KAISERS Glycerin-Gelatine eingebettet und bei 4°C gelagert.

2.2.2.2 Quantifizierung der Färbeintensität

Zur Messung der immunzytochemischen Färbeintensität der einzelnen Integrin-Antikörper wurde der MEAN-SD Algorithmus angewandt (siehe 2.1.4.3). Dazu wurden von jeder Kultur 5 zufällig ausgewählte Gesichtsfelder mit ca. 50 Mikrogliazellen pro Gesichtsfeld in einem

Zeiss Axiophot Mikroskop bei einer konstanten Beleuchtungsspannung (Stellung 5) mit einem 2,5x Objektiv und einer Sony 3CCD Color Video Kamera aufgenommen. Diese Farbkamera hat eine Auflösung von 640 x 400 Bildpunkten und liefert pro Bildpunkt (Pixel) einen Farbwert im 24-Bit RGB-Format. Das digitalisierte Bild wurde mit einem Computer und einer Image Technology OFG card (VP-1100-768) in das Bildverarbeitungsprogramm OPTIMAS eingelesen. Nun wurde das blaue Band in ein Graubild mit Pixelwerten von 0 bis 255 umgewandelt und die Färbeintensität für jedes Gesichtsfeld mit dem MEAN-SD Algorithmus nach 2.1.4.3 berechnet. Zur Erfassung des Hintergrundes wurde dann in jedem Gesichtsfeld eine möglichst große, von Mikrogliazellen freie Fläche als Auswertungsgebiet (ROI) markiert und die Färbeintensität des Hintergrundes auf dieselbe Weise berechnet. Die Färbeintensität einer jeden Kulturkammer ergab sich dann aus dem Mittelwert der Färbeintensitäten der 5 Gesichtsfelder minus dem Mittelwert der Färbeintensitäten der Hintergründe.

2.2.2.3 Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung wurden die Mittelwerte und Standardfehler jeder Gruppe gleich behandelter und gefärbter Kulturen gebildet (4 bis 6 Kulturen pro Gruppe) und graphisch aufgetragen. Die Integrin-Färbungen in den LPS-behandelten Gruppen wurden dann mit den unbehandelten Kontrollgruppen mit dem t-Test nach Student für unabhängige Stichproben auf statistisch signifikante Unterschiede auf dem 5% Niveau geprüft. Die Daten wurden mit OPTIMAS erfaßt, nach EXCEL exportiert und dort statistisch ausgewertet.

2.2.3 Proliferationsstudien in Zellkultur

Nachdem anhand der Integrin-Expression in ruhenden Kulturen und nach LPS-Stimulation der Aktivierungszustand der ramifizierten Mikroglia bestimmt werden konnte (2.2.2), standen die so definierten Kulturen nun zu Proliferationsstudien zur Verfügung.

2.2.3.1 Stimulation der Kokulturen mit Zytokinen und neutralisierenden Antikörpern

Nach 3-tägiger Inkubation der Kokulturen von ramifizierter Mikroglia auf einem

Astrozytenrasen in serumfreien Medium (SFM) (siehe 2.2.1.3), erfolgte eine 2-tägige Stimulation der Kulturen mit verschiedenen Zytokinen und neutralisierenden Antikörpern. Hierzu wurden dem SFM beim Medienwechsel folgende Stimulantien zugesetzt: fötales Kälberserum (FCS; 0%, 1%, 5%, 10%, 20%), Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (MCSF) in Konzentrationen von 0, 0,2, 2, 20 und 200 ng/ml, Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (GMCSF; 0, 4, 40, 400 ng/ml), Interleukin 1 (IL1; 0, 0,5, 5, 50, 500 ng/ml), Interleukin 2 (IL2; 0, 0,4, 4, 40 ng/ml), Interleukin 3 (IL3; 0, 0,2, 2, 20 ng/ml), Interleukin 4 (IL4; 0, 0,5, 5, 50), Interleukin 6 (IL6; 1, 10, 100); Interleukin 10 (IL10; 0, 0,2, 2, 20); Interferon- γ (IFN γ ; 0, 0,4, 4, 40 ng/ml), Leukämie inhibierender Faktor (LIF; 50, 500, 5000) und Tumornekrosefaktor- α (TNF α ; 0, 0,2, 2, 20). Um möglicherweise im Kultursystem vorhandene endogene Zytokine zu antagonisieren, wurde den Kulturen jeweils getrennt Antikörper gegen IL3, gegen GMCSF und gegen MCSF oder eine Kombination aus Antikörpern gegen MCSF und GMCSF (alle 25 mg/ml in SFM) zugegeben. Um den Effekt von IL1 besser zu analysieren, wurden die Kulturen schließlich mit 500 ng/ml IL1 stimuliert und gleichzeitig mit den neutralisierenden Antikörpern behandelt. Die Untersuchungen für die verschiedenen Stimulantien fanden in verschiedenen Tierpräparationen statt, was zu der interexperimentellen Variabilität in den unstimulierten Kontrollkulturen beigetragen haben könnte.

2.2.3.2 Autoradiographie und Immunzytochemie

Um proliferierende Zellen zu markieren, wurde den Kokulturen, zwei Tage nach der Stimulation (siehe 2.2.2) für zwei Stunden 5 μ Ci/ml 3 H-Thymidin zugesetzt. Proliferierende Zellen bauen dieses Thymidin in neu synthetisierte DNA ein und können durch die radioaktive Markierung später von nicht-proliferierenden Zellen unterschieden werden.

Zur Identifizierung der Mikroglia wurden die Kulturen dann analog zur der ausführlichen Beschreibung 2.2.1.1.1 das α M β 2-Integrin (CD11b/CD18) immunzytochemisch gefärbt. Dazu wurden die Kulturen zuerst in Methanol bei 4°C für 30 Minuten fixiert, dann mit einem monoklonalen Antikörper aus der Ratte gegen das α M β 2-Integrin (1:1000) inkubiert, dieser

primäre Antikörper mit einem sekundären, biotinylierten Antiserum aus der Ziege gegen Ratten-IgG (1:100) detektiert und schließlich mit ABC und der DAB/H₂O₂-Reaktion sichtbar gemacht. Wie oben beschrieben wurden die Kulturen nun auf der Rückseite mit Depex an einen Objektträger geklebt und in einer Alkoholreihe (Ethanol 70%, 70%, 90%, 95%, 100%, 100%; Isopropanol 100%, 100%; Xylol 100%, 100%) entfettet, dann wurden sie aber wieder rehydriert (Ethanol 100%, 100%, 95%, 90%, 70%, 70%) und an der Luft getrocknet.

Für die Autoradiographie wurden die Objektträger dann in NTB2 Filmemulsion (1:1 in Aqua dest. verdünnt, für 2 bis 3 Wochen im Dunkeln bei 4°C exponiert und dann in D-19 entwickelt, in Tetenal-Superfix fixiert, wieder in einer Alkoholreihe (Ethanol 70%, 70%, 90%, 95%, 100%, 100%; Isopropanol 100%, 100%; Xylol 100%, 100%) dehydriert und schließlich auf der Vorderseite in Depex eingebettet.

2.2.3.3 Bestimmung des Proliferationsindex

Die Mikroglia konnte anhand der α M β 2-Immunzytochemie identifiziert werden. Proliferierende konnten leicht von nicht-proliferierenden Zellen durch die Markierung ihres Kernes mit den Silberkörnchen unterschieden werden, mit denen der ³H-Thymidin-Einbau sichtbar gemacht wurde. Als ramifizierte Mikroglia wurden Zellen mit wenigstens zwei Fortsätzen gewertet, die wenigstens einen halben Zellkörper lang sein mußten (Tanaka und Maeda, 1996). Für jeden Objektträger wurden wenigstens zehn zufällig gewählte Gesichtsfelder mit insgesamt wenigstens 100 Zellen und einer Objektivvergrößerung von 10x ausgewertet und anhand der α M β 2-Morphologie die Zahl aller ramifizierten Mikrogliazellen sowie der proliferierenden und ramifizierten Mikroglia gezählt. Das Verhältnis der proliferierenden zu allen Mikrogliazellen definiert den Proliferationsindex:

$$\text{Proliferationsindex} = \frac{\text{Anzahl proliferierender Mikroglia}}{\text{Gesamtzahl der Mikroglia}} \quad (11)$$

2.2.3.4 Statistische Auswertung

Für jede Kultur wurde der Proliferationsindex einzeln errechnet. Für Gruppen identisch behandelte Kulturen (jeweils 4 bis 8) wurde dann der Mittelwert und Standardfehler der

Proliferationsindizes errechnet, graphisch aufgetragen und gegen die jeweiligen unbehandelten Kontrollgruppen mit dem t-Test nach Student für unabhängige Stichproben auf einen statistisch signifikanten Unterschied auf dem 5%-Niveau geprüft.

2.2.3.5 Proliferation *in vivo* nach Fazialis-Durchtrennung

Zum Vergleich der Mikroglia-Proliferation *in vitro* mit der Situation nach einer Verletzung *in vivo* wurde das oben beschriebene Modell der Fazialis-Durchtrennung gewählt (2.1.1). Hier kommt es nach der Verletzung ausschließlich zu einer Vermehrung der Mikroglia (Graeber et al., 1988c). Zur Identifizierung proliferierender Zellen wurde den Mäusen zwei Tage nach der Durchtrennung 200 mCi ^3H -Thymidin (NEN Dupont, Dreieich) intraperitoneal injiziert und das Gehirn zwei Stunden später analog zu 2.1.2 entnommen und geschnitten. In den Gewebsschnitten wurde dann, wie für die Zellkulturen in 2.2.3.2 beschrieben, die Mikroglia anhand des $\alpha\text{M}\beta 2$ -Integrins und die proliferierenden Zellen durch Autoradiographie identifiziert (Abbildung 23, Seite 90).

2.3 Materialien

2.3.1 Tiere

Mäuse, B6/C57	Charles River, Sulzfeld
Mäuse, FVB	Tierhaus des MPI für Neurobiologie
Ratten, Wistar	Tierhaus des MPI für Neurobiologie

2.3.2 Zellkulturmaterialien und -zusätze

Dibutyryl-cAMP	N ⁶ :2'-O-Dibutyryladenosen-3':5'-zyklisches Monophosphat, Sigma, Deisenhofen
Dulbeccos Modifiziertes Eagle Medium	GIBCO
Lipopolysacchariden	aus E. coli, Stamm 055:B5, Sigma, Deisenhofen
Penizillin	Sigma
Streptomycin	Sigma
Transferrin	Sigma
Rinderinsulin	Sigma
Progesteron	Sigma
Na ₂ SeO ₂	Sigma
Kälberserum, fötales	GIBCO
Kulturflaschen	NUNC
Petrischalen	NUNC
³ H-Thymidin	NEN, Dreieich
Vier-Kammer-Kulturobjektträger, Permanox	NUNC

2.3.2.1 Zytokine für die Zellkultur

Alle eingesetzten Zytokine sind rekombinante Mäuseproteine.	
GMCSF	Amimed
IL1 β	Amimed
IL4	Amimed
IL10	Amimed
LIF	Amimed
IFN γ	Genzyme
IL3	PeproTech
IL6	PeproTech
MCSF	R&D-Systems, Minneapolis, MN, USA
IL2	R&D-Systems, Minneapolis, MN, USA
TNF α	R&D-Systems, Minneapolis, MN, USA

2.3.2.2 Neutralisierende Antikörper für die Zellkultur

Alle benutzten Antikörper sind gegen Mäuseproteine.	
GMCSF	R&D-Systems, Minneapolis, MN, USA
MCSF	R&D-Systems, Minneapolis, MN, USA
IL3	R&D-Systems, Minneapolis, MN, USA

2.3.3 Chemikalien

Araldit	FLUKA
Azeton	Merck
Azur II	Merck
Bleizitrat	Leica
D-19 Entwickler	Kodak
Diaminobenzidin (3-3'-Diaminobenzidin)	Sigma, Deisenhofen
DiäthylÄther	Merck

Äther zur Narkose	Chinosol
Ethanol	Merck
Paraformaldehyd	Merck
Gelatine	Merck
Glutaraldehyd	Merck
Isopropanol	Merck
Perhydrol (H ₂ O ₂)	Merck
Kobaltchlorid (CoCl ₂)	Merck
Kochsalz (NaCl)	Merck
Methylenblau	Merck
Natriumdihydrogenphosphat	Merck
Natriumhydrogenphosphat	Merck
Nickelsulfat (NiSO ₄)	Merck
NTB2 Filmemulsion	Kodak
Rinderalbumin	Sigma, Deisenhofen
Saccharose	Merck
Superfix	Tetenal
Uranyl-Azetat	Leica
Xylol	Merck

2.3.4 Antikörper, Tierseren und Immunoagentien

Tabelle VIII. Primäre, monoklonale Antikörper

Antigen	CD	Spezifität	Wirt	Klon	Azeton	optimale Verdünnung	Herkunft
$\alpha 4$	49d	Maus	Ratte	R1-2	nein	1:1.000	Pharmingen, San Diego, CA, USA
$\alpha 5$	49e	Maus	Ratte	BMA5	nein	1:2.000	Chemicon, Temecula, CA, USA
		Maus	Ratte	5H10-27	nein	1:2.000	Pharmingen, San Diego, CA, USA
$\alpha 6$	49f	Maus	Ratte	MA6	ja	1:1.000	Chemicon, Temecula, CA, USA
		Maus	Ratte	GoH3	ja	1:3.000	Serotec, Kidlington, England
αL	11a	Maus	Ratte	KBA	nein	1:6.000	Serotec, Kidlington, England
αM	11b	Maus	Ratte	5C6	ja	1:4.000	Serotec, Kidlington, England
αX	11c	Maus	Hamster	N418	ja	1:100	Endogen
αE	103	Maus	Ratte	M290	-	-	Pharmingen, San Diego, CA, USA
αV	51	Maus	Hamster	H9.2B8	-	-	Pharmingen, San Diego, CA, USA
$\beta 1$	29	Maus	Ratte	MB1.2	ja	1:3.000	Chemicon, Temecula, CA, USA
		Maus	Ratte	9EG7	ja	1:800	Pharmingen, San Diego, CA, USA
		Maus	Ratte	KMI6	ja	1:600	Pharmingen, San Diego, CA, USA
$\beta 2$	18	Maus	Ratte	YTS 213.1	ja	1:2.000	Serotec, Kidlington, England
$\beta 3$	61	Maus	Hamster	Hm β 3	nein	1:800	Pharmingen, San Diego, CA, USA
$\beta 4$	104	Maus	Ratte	346-11A	ja	1:100	Pharmingen, San Diego, CA, USA
$\beta 7$		Maus	Ratte	M293	ja	1:1.600	Pharmingen, San Diego, CA, USA
$\alpha M\beta 2$		Ratte	Maus	OX42	nein	1:1.000	Serotec, Kidlington, England

Tabelle IX. Primäre, polyklonale Antikörper

Antigen	Spezifität	Wirt	Verdünnung	Herkunft
Galanin		Kaninchen	1:1.000	Peninsula, Heidelberg
GalC		Kaninchen	1:100	Sigma, Deisenhofen
GFAP	Rind	Kaninchen	1:6.000	DAKO, Hamburg
IBA1		Kaninchen	1:400	Dr. Y. Imai, Japan
Laminin		Kaninchen	1:1.000	DAKO

Tabelle X. Sekundäre Antikörper

Antigen	Wirt	Konjugat	Verdünnung	Herkunft
Hamster-Ig	Ziege	Biotin	1:100	Vector, Wiesbaden
Hamster-Ig	Ziege	FITC	1:100	Dianova, Hamburg
Kaninchen-Ig	Ziege	Biotin	1:100	Vector, Wiesbaden
Kaninchen-Ig	Esel	Biotin	1:100	Dianova, Hamburg
Maus- IgG	Pferd	Peroxidase	1:100	Vector, Wiesbaden
Maus-Ig	Pferd	Biotin	1:100	Vector, Wiesbaden
Ratte-Ig	Ziege	Biotin	1:100	Vector, Wiesbaden
Ratte-Ig	Ziege	FITC	1:100	Sigma, Deisenhofen
Ziege-Ig	Esel	FITC	1:100	Dianova, Hamburg

Tierseren

Esenserum	Vector, Wiesbaden
Pferdeserum	Vector, Wiesbaden
Mäuseserum	Sigma, Deisenhofen
Ziegenserum	Vector, Wiesbaden

Weitere Reagentien

Vectorstain [®] ABC Kit	Vector, Wiesbaden
DePeX (Gurr [®])	BDH Laboratory Supplies
KAISERS Glyzeringelatine	Merck
TexasRed-Avidin	Vector, Wiesbaden
Tyramin, biotinyliert	Dupont
VectaShield	Vector, Wiesbaden

2.3.5 Lösungen, Puffer, Kulturmedien

Phosphat-Puffer (PB)

100 mM Na₂HPO₄,
mit H₃PO₄ auf pH 7,4 eingestellt.

PB / BSA

PB mit 1g/l Rinderalbumin (BSA)

Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS)

10 mM Na₂HPO₄,
8,4 g/l NaCl,
mit H₃PO₄ auf pH 7,4 eingestellt.

Kulturmedium

Dulbeccos Modifiziertes Eagle Medium
mit 15% fötales Kälberserum (FCS),
100 IU/ml Penizillin,
100 µg/ml Streptomycin

Serumfreies Medium (SFM)

Dulbeccos Modifiziertes Eagle Medium
mit 100 IU/ml Penizillin,
100 µg/ml Streptomycin,
5 µg/ml humanes Transferrin,
5 µg/ml Rinderinsulin,
12 ng/ml Progesteron,
60 nM Na₂SeO₂

3 Ergebnisse

3.1 Integrine im Gehirn der Maus

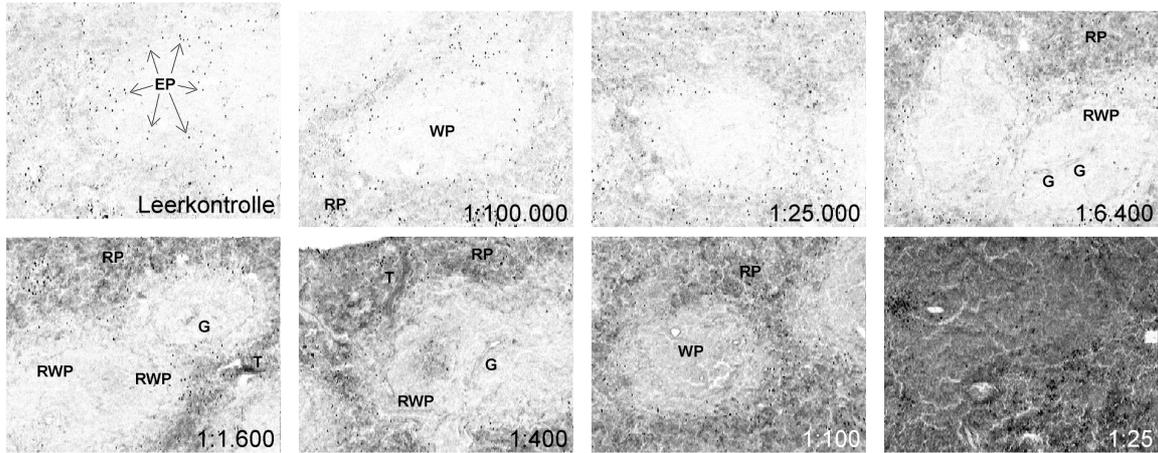
3.1.1 Die Milz zum Nachweis der Integrin-Immunoreaktivität

In vorliegender Arbeit wurde zuerst die Fähigkeit der monoklonalen Antikörpern gezeigt, Integrine mit der benutzten immunhistochemischen Methode zu erkennen. Dazu wurde die Milz als Positivkontrolle eingesetzt. Von den 17 verwendeten Antikörper-Klonen (Tabelle VIII, Seite 68) zeigten 15 in der Milz deutliche Immunoreaktivität. Mit den beiden in der Milz negativen Klonen gegen das αE und αV -Integrin konnte auch im gesunden und verletzten ZNS keine Immunoreaktivität nachgewiesen werden (Tabelle XI, Seite 82).

Bei der Titration der Antikörper in der Milz fanden sich bereits in Leerkontrolle ohne Antikörperzugabe vereinzelt angefärbte Zellen, die durch ihre endogenen Peroxidasen das DAB umsetzen konnten (Abbildung 11, Seite 71). Mit steigender Antikörperkonzentration reagierten zuerst die spezifischen Integrin-Epitope mit dem Antikörper und danach wurden auch unspezifische, niederaffine Bindungsstellen besetzt, bis schließlich der ganze Schnitt gefärbt war. Für jeden Antikörper konnte auf diese Weise die Konzentration mit dem besten Signal-Rausch-Verhältnis bestimmt werden (Tabelle VIII, Seite 68), und das spezifische Verteilungsmuster der Immunoreaktivität unterschied sich deutlich von den oben erwähnten endogenen Peroxidasen. Nach Vorbehandlung mit Azeton trat generell eine geringere Hintergrundfärbung auf, bei manchen Integrinen jedoch auch eine schlechtere Bindung der Antikörper und damit eine schwächere Anfärbung. Für den Nachweis dieser Integrine wurde im Weiteren auf eine Vorbehandlung des Gewebes mit Azeton verzichtet.

Die verschiedenen monoklonalen Antikörper zeigten eine charakteristische, immunhistologische Verteilung (Abbildung 12, Seite 72; Tabelle XI, Seite 82). Die Integrine der $\beta 2$ -Familie (αL , αM , αX , $\beta 2$) kamen hauptsächlich in der periarteriellen Lymphozytenscheide (PALS) der weißen Pulpa vor und nur in deutlich geringerem Maße auf Zellen der roten Pulpa. αM und αX fand sich häufig auf dendritischen Zellen. Die $\alpha 4$ - und $\beta 7$ -

ohne Azeton



mit Azeton

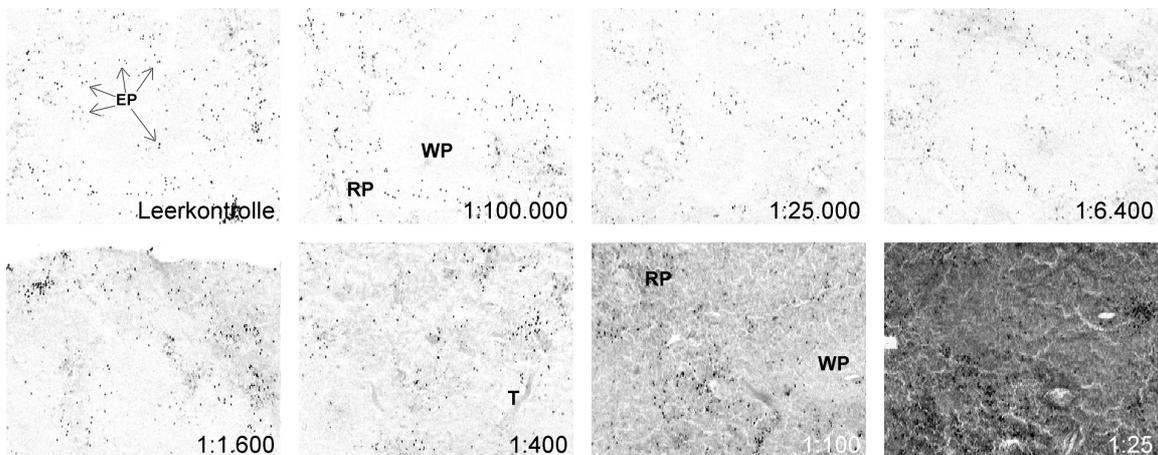


Abbildung 11. Titration in der Milz. Titration der DAB-Niederschlagsfärbung eines monoklonalen Integrin-Antikörpers in der murinen Milz am Beispiel des Klons BMA5 gegen die Integrin-Untereinheit $\alpha 5$. **Oberer Teil.** Bereits in der Leerkontrolle färben sich in Abwesenheit des anti-Integrin-Antikörpers einzelne Zellen an, die das DAB durch ihre endogene Peroxidasen umsetzen können (EP; hauptsächlich Granulozyten und Makrophagen). Mit steigender Konzentration werden dann zuerst die spezifischen Bindungsstellen des Antikörpers besetzt und das charakteristische Verteilungsmuster der Integrin-Untereinheit tritt hervor. Bei noch höheren Konzentrationen färbt sich der ganze Schnitt unspezifisch ein (1:25). Der abgebildete Klon BMA5 detektiert das $\alpha 5$ -Integrin auf Trabekeln (T), Retikula in der weißen Pulpa (RWP), Gefäßen (G) in der weißen Pulpa (WP) und diffus in der roten Pulpa (RP). Das beste Signal-Rausch-Verhältnis liefert eine 1.600-fache Verdünnung des Antikörpers. **Unterer Teil.** Eine Vorbehandlung des Gewebes mit Azeton verringert zwar das Hintergrundsignal. Bisweilen beeinträchtigt es aber, wie im abgebildeten Fall, die Bindung des Antikörpers an das Integrin. Beim Einsatz des Klons BMA5 wurde deshalb auf eine Vorbehandlung mit Azeton verzichtet.

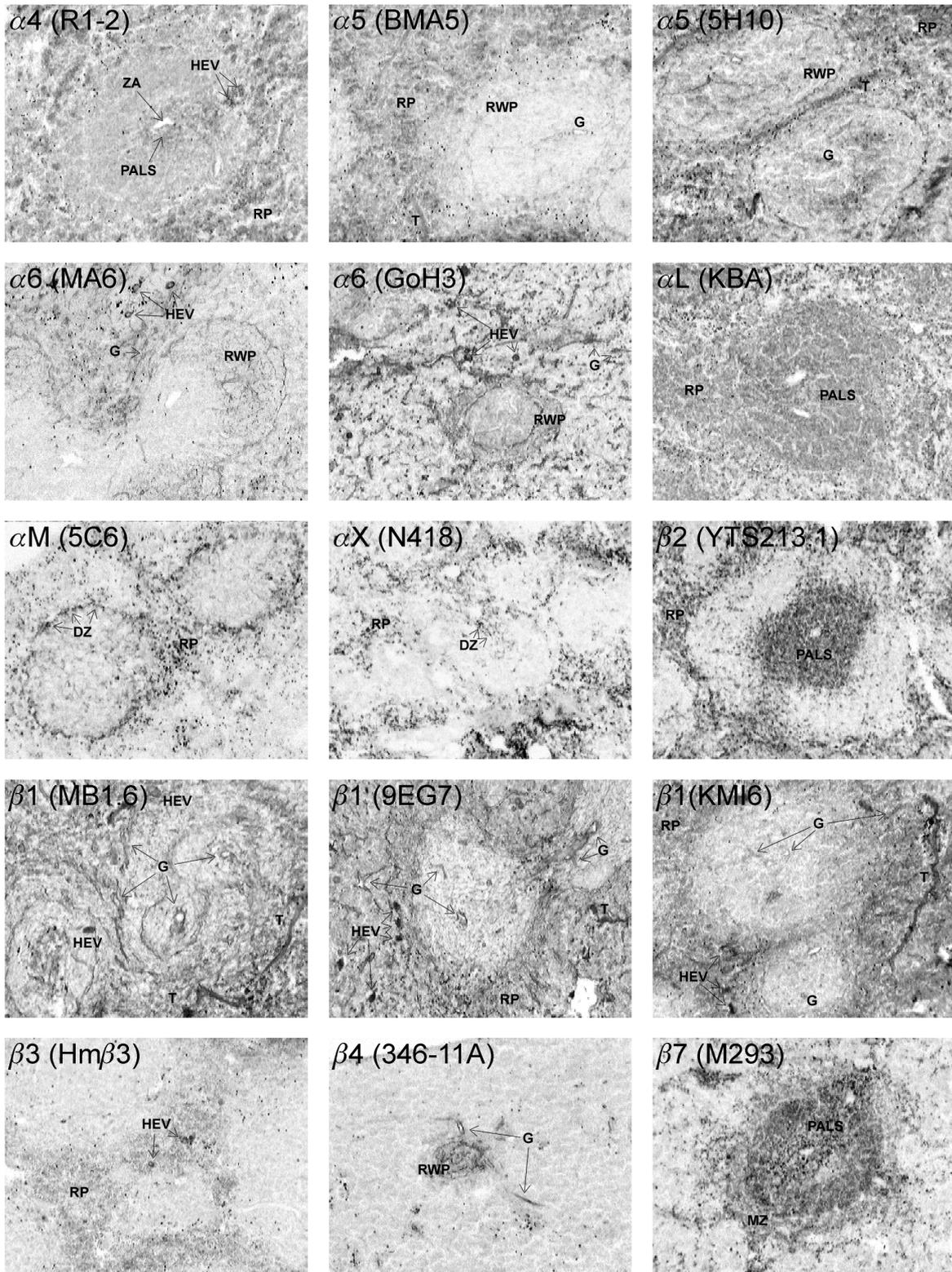


Abbildung 12. Integrine in der Milz. Gezeigt ist die charakteristische, immunhistochemische Verteilung verschiedener Integrine in der Milz mit monoklonalen Antikörpern verschiedener Hybridomklone und DAB-Niederschlagsfärbung. Die Integrine der $\beta 2$ -Familie (αL , αM , αX , $\beta 2$) kommen hauptsächlich in der periarteriellen Lymphozytenscheide (PALS) der weißen Pulpa (WP) vor und nur in deutlich geringerem Maße auf Zellen der roten Pulpa (RP). αM und αX fand sich häufig auf dendritischen Zellen (DZ). Die $\alpha 4$ - und $\beta 7$ -Untereinheiten kamen ebenfalls in der PALS vor, aber zusätzlich fand sich $\alpha 4$ auf hohen, endothelialen Venuolen (HEV) und $\beta 7$ in der Marginalzone (MZ). Die restlichen Integrine der $\beta 1$ -Familie ($\alpha 5$, $\alpha 6$ und $\beta 1$) sowie die $\beta 3$ - und $\beta 4$ -Untereinheit lokalisierten auf Retikula in der weißen Pulpa (RWP), Trabekeln (T), Gefäßen (G) und HEV. Verschiedene Hybridomklone gegen dieselbe Integrin-Untereinheit wiesen ein identisches, immunhistochemisches Färbungsmuster auf.

Untereinheiten kamen ebenfalls in der PALS vor, aber zusätzlich fand sich $\alpha 4$ auf hohen, endothelialen Venuolen (HEV) und $\beta 7$ in der Marginalzone. Die restlichen Integrine der $\beta 1$ -Familie ($\alpha 5$, $\alpha 6$ und $\beta 1$) sowie die $\beta 3$ - und $\beta 4$ -Untereinheit lokalisierten auf Retikula in der weißen Pulpa, Trabekeln, Gefäßen und HEV (Zusammenfassung in Tabelle XI, Seite 82). Verschiedene Hybridom-Klone gegen dieselbe Integrin-Untereinheit wiesen ein identisches immunhistochemisches Färbungsmuster auf.

3.1.2 Integrine im normalen Zentral-Nervensystem

Im gesunden, ventralen Hirnstamm und im Kleinhirn zeigten nur die Integrin-Untereinheiten αM , $\beta 2$, $\alpha 6$ und $\beta 1$ deutliche Immunoreaktivität. Die $\alpha M\beta 2$ -Immunoreaktivität fand sich dabei ausschließlich auf Zellen mit der typischen ramifizierten Morphologie von ruhenden Mikrogliazellen. Die Untereinheiten $\alpha 6$ und $\beta 1$ lokalisierten auf Blutgefäßen und $\beta 1$ zusätzlich schwach auf den Neuronen des Nucleus facialis und den Purkinjezellen des Kleinhirns. Sehr diskrete $\alpha 5$ -Immunoreaktivität fand sich auf Blutgefäßen und dem Neuropil der grauen Substanz des Nucleus facialis. Die Astrozyten nahe der Glia limitans und die zerebelläre Bergmann-Glia zeigten zusätzlich eine spärliche, gepunktete Anfärbung für die $\alpha 4$ - und die $\beta 1$ -Untereinheit auf Strukturen mit der Morphologie von Bergmann-Glia, wobei $\alpha 4$ nur in den Pia-nahen Anteilen zu sehen war und in der grauen Substanz die Anfärbung ganz verschwand.

Für die Integrine $\beta 3$, $\beta 4$ und $\beta 7$ fand sich keine spezifische Immunoreaktivität, obwohl sich diese Integrine unter Verwendung derselben Methodik in der Milz nachweisen ließen.

3.1.3 Regulation von Integrinen im axotomierten Nucleus facialis

Nach peripherer Durchtrennung des Nervus facialis fand sich ein starker Anstieg der Immunoreaktivität verschiedener Integrin-Untereinheiten im betroffenen, motorischen Nerven Kern auf Neuronen, Mikroglia, Lymphozyten und dem Neuropil (Abbildung 13, Seite 74; Abbildung 14, Seite 75; Abbildung 15, Seite 76). Die axotomierten Neurone zeigten einen deutlichen Anstieg der $\beta 1$ -Untereinheit (Abbildung 13, Seite 74). Der Anstieg war bereits 2

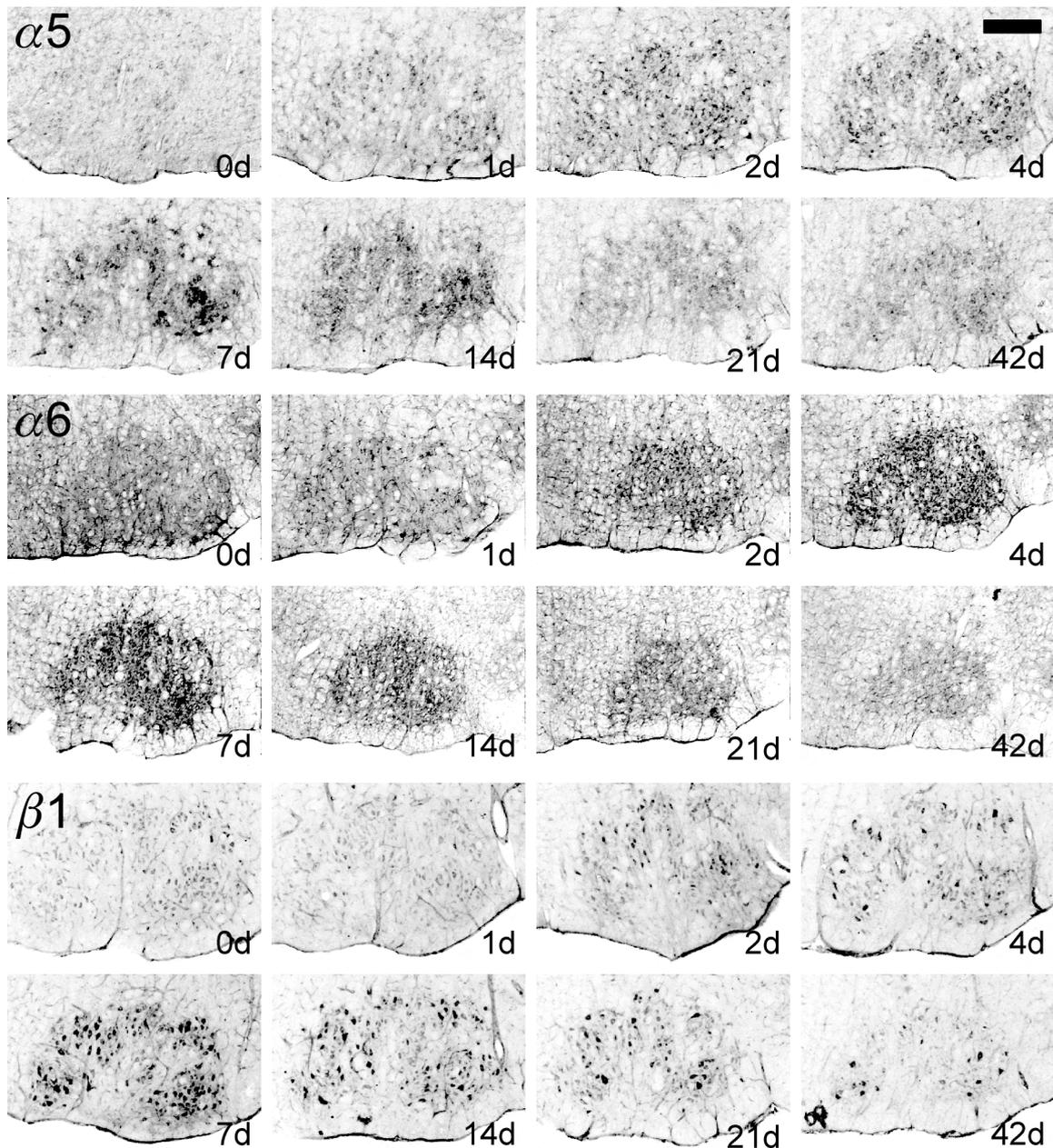


Abbildung 13. $\beta 1$ -Integrine im axotomierten Nucleus facialis. Immunhistochemischer Nachweis der Integrin-Untereinheiten $\alpha 5$, $\alpha 6$ und $\alpha 1$ im normalen (0d) und axotomierten Nucleus facialis (d1-d42). Alle drei Integrin-Untereinheiten zeigen eine maximale Färbung zwischen Tag 7 und 14 nach der Verletzung. Bei der abgebildeten, niedrigen Vergrößerung zeigt die $\alpha 5$ -Immunreaktivität eine gliale, $\alpha 6$ eine gliale und vaskuläre und $\beta 1$ eine vaskuläre und neuronale Verteilung. Maßstabsbalken = 500 μm .

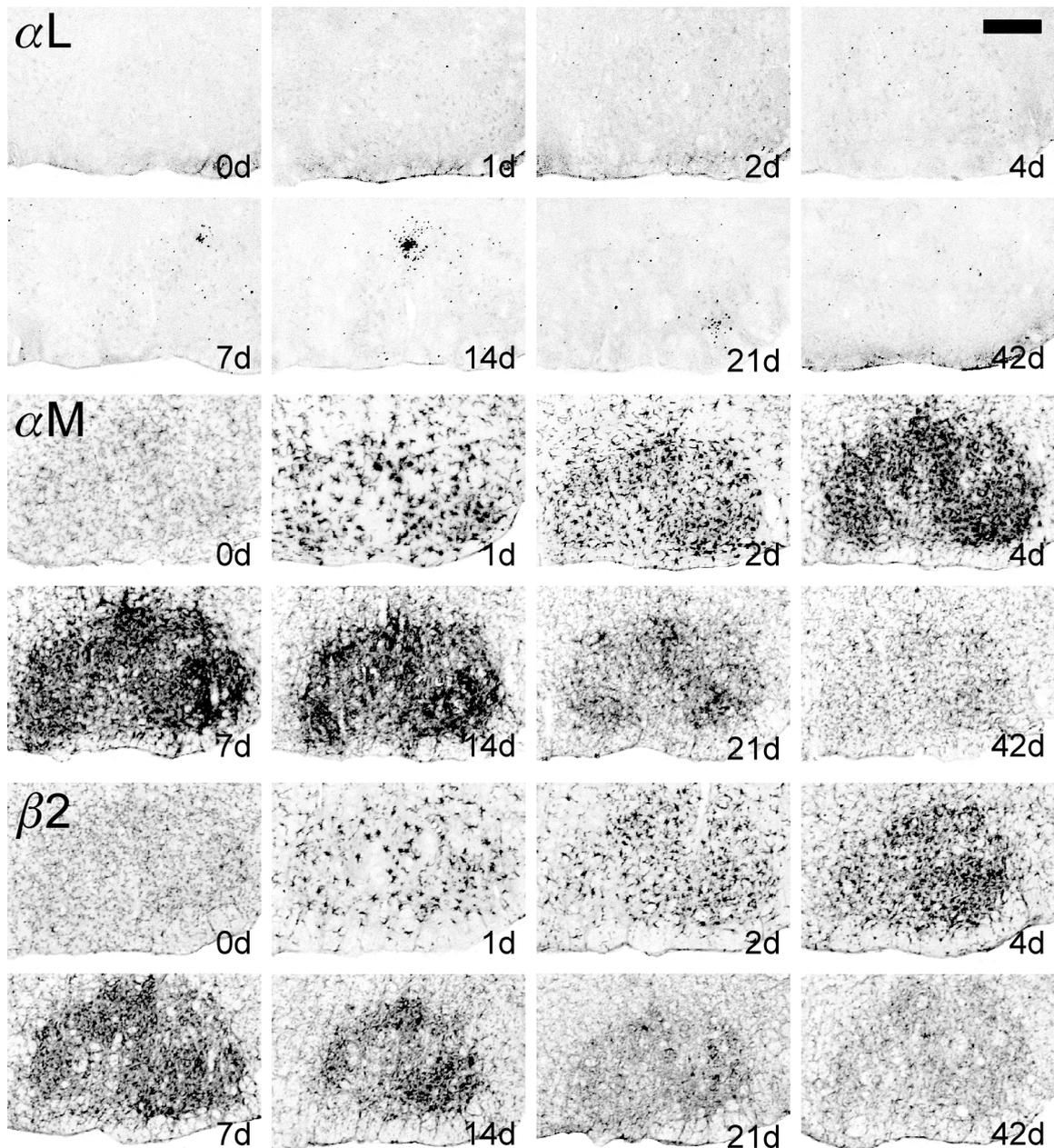


Abbildung 14. $\beta 2$ -Integrine im axotomierten Nucleus facialis. Immunhistochemie für die Integrin-Untereinheiten αL , αM und $\alpha 2$. Die Immunoreaktivität für αL findet sich auf kleinen, runden Zellen, deren Zahl am Tag 14 nach der Axotomie maximal wird. αM und $\beta 2$ zeigen einen Glia-Verteilungstyp mit einem Gipfel zwischen Tag 7 und Tag 14 nach der Verletzung. Maßstabsbalken = $500\mu m$.

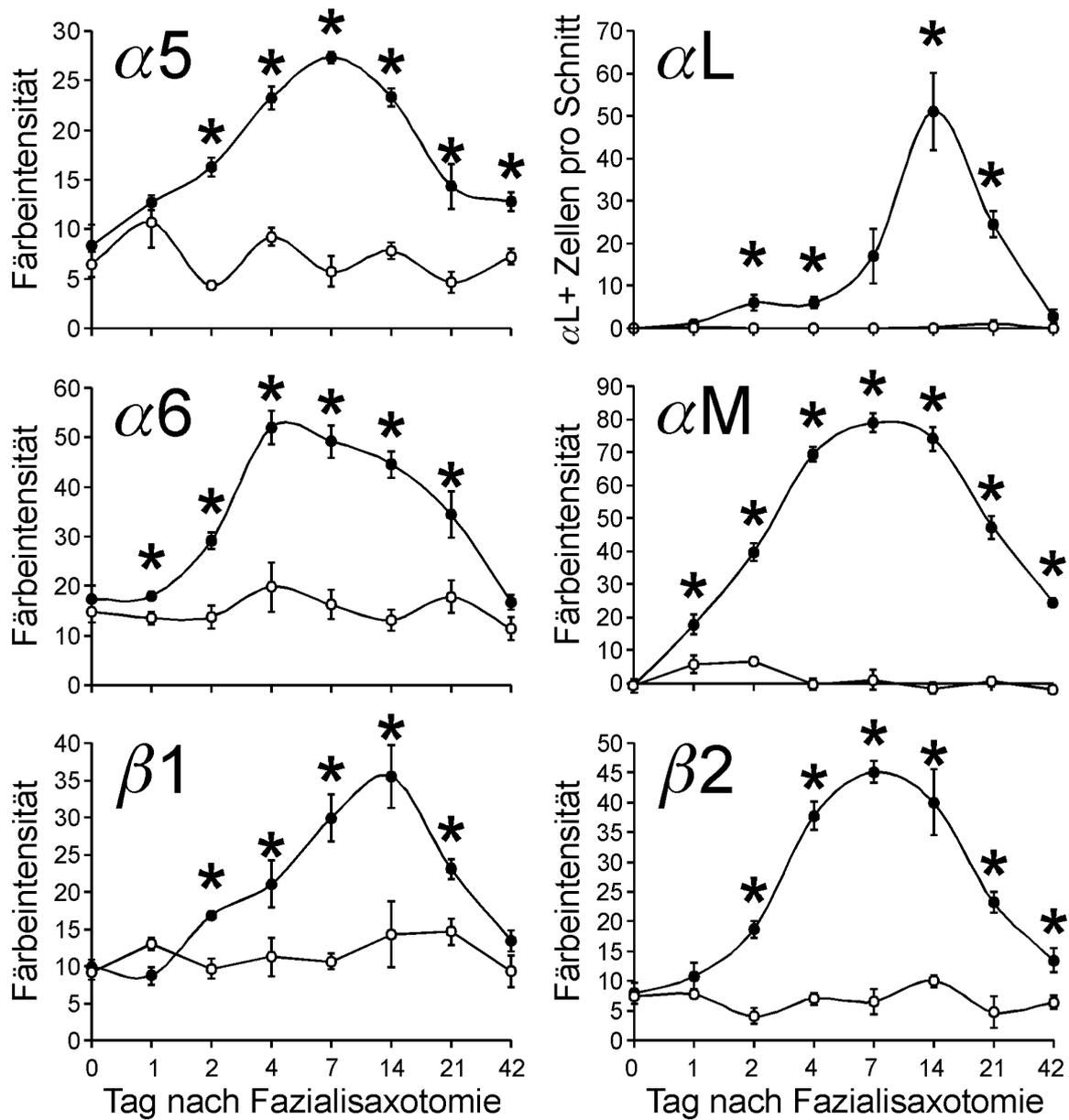


Abbildung 15. Zeitverlauf der Gesamt-Immunoreaktivität für Integrine im axotomierten Nucleus facialis. Quantifikation der gesamten Integrin-Immunoreaktivität. Färbeintensitäten im Nucleus facialis (ausgefüllte Kreise bezeichnen die operierte und offene Kreise die kontralaterale Kontrollseite). Der Graph für das αL -Integrin zeigt die Anzahl der immunoreaktiven Zellen, die Graphen für αM , $\beta 2$, $\alpha 5$, $\alpha 6$ und $\beta 1$ zeigen die mit dem MEAN-SD-Algorithmus errechnete DAB-Färbeintensität (Mittelwert \pm Standardfehler, jeweils 4-5 Tiere pro Zeitpunkt; * $p < 0,05$).

Tage nach Fazialis-Durchtrennung statistisch signifikant, hatte sein Maximum bei Tag 14 und war auch nach 42 Tagen noch nachweisbar (Abbildung 15, Seite 76). Dieses Maximum koinzidierte mit dem Auftauchen von $\beta 1$ -Immunoreaktivität auf Wachstumskegeln von axonalen Aussprossungen im Nucleus facialis und dem intrazerebralen Teil des Nervus facialis (siehe 3.1.3.1). Die benachbarte Mikroglia im Nucleus facialis zeigte schon 1 Tag nach der Axotomie eine starke Steigerung der Immunoreaktivität für das $\alpha M\beta 2$ -Integrin (Abbildung 13, Seite 74). Ab Tag 2 zeigte sich auch Immunoreaktivität für die $\alpha 5$ -, $\alpha 6$ - und $\beta 1$ -Integrin-Untereinheiten auf Zellen mit Mikroglia-Morphologie (Abbildung 14, Seite 75). Die deutliche Vermehrung der Mikroglia an Tag 4 und Tag 7 ging mit einem Anstieg der Färbeintensität der Gesamtfärbung dieser Integrin-Untereinheiten einher (Abbildung 15, Seite 76). An Tag 14, fand sich nun auch αX -Immunoreaktivität, die ausschließlich auf Knötchen im Nucleus facialis lokalisiert war und von einem schwachen Anstieg des $\alpha 4$ -Integrins in Neuropil des Nucleus facialis begleitet wurde. Zusätzlich zu den Neuronen und Mikroglia konnte auch Immunoreaktivität gegen die Integrin-Untereinheiten $\alpha 4$, $\beta 1$, $\beta 7$, αL und $\beta 2$ auf ca. 6 bis 8 μm großen, runden Zellen mit lymphozytärer Morphologie beobachtet werden. Einzelne αL -positive Zellen traten bereits einen Tag nach dem Trauma auf und an Tag 14 nach der Fazialis-Durchtrennung wurde ihre Zahl maximal (Abbildung 14, Seite 75; Abbildung 15, Seite 76).

3.1.3.1 Zelluläre Lokalisation von Integrin-Untereinheiten

Um die zelluläre Lokalisation der Integrin-Untereinheiten auf Mikroglia, Astrozyten, Endothelien und axonalen Wachstumskegeln zu bestätigen, wurden Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen angefertigt und mit konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie ausgewertet (Abbildung 16, Seite 78; Abbildung 16, Seite 78; Abbildung 17, Seite 79). Die Mikroglia wurde entweder über das endogen gebundene Immunglobulin G oder mit dem polyklonalen IBA1 Antikörper identifiziert und die Integrine von monoklonalen Antikörpern aus der Ratte oder dem Hamster detektiert und dann kolokalisiert. Sowohl endogenes Immunglobulin G als

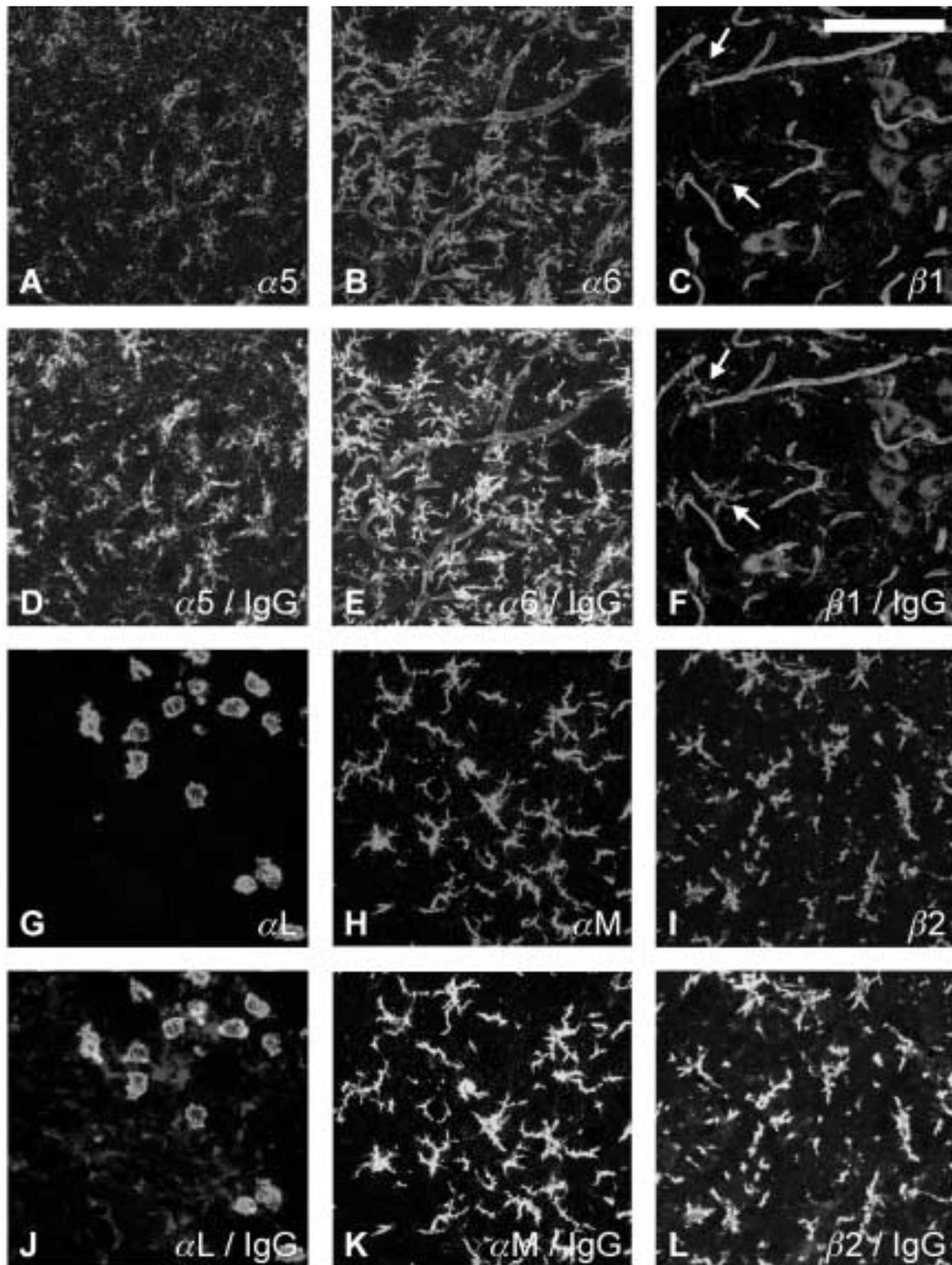


Abbildung 16. Kolokalisation der Integrine $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\beta 1$, αL , αM und $\beta 2$ mit Mikroglia. Konfokale Laser-Scanning-Fluoreszenz-Immunhistochemie für verschiedene Integrin-Untereinheiten (grün) und überlagerte Mikroglia-Anfärbung mit Maus-IgG-Immunoreaktivität (rot; D-F, J-K). Kolokalisation der Mikroglia mit $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\beta 1$, αM und $\beta 2$ kann an der gelb-orangen Färbung erkannt werden (Tag 2 nach Nerven-Durchtrennung). Die Pfeile in C und F bezeichnen die nur schwach angefärbte $\beta 1$ -reaktive Mikroglia. Die kleinen, runden αL -positiven Zellen (G, J; Tag 14) sind IgG-negativ machen aber Kontakt zu den IgG-positiven Mikroglia-Knötchen. Maßstabsbalken = 100 μm .

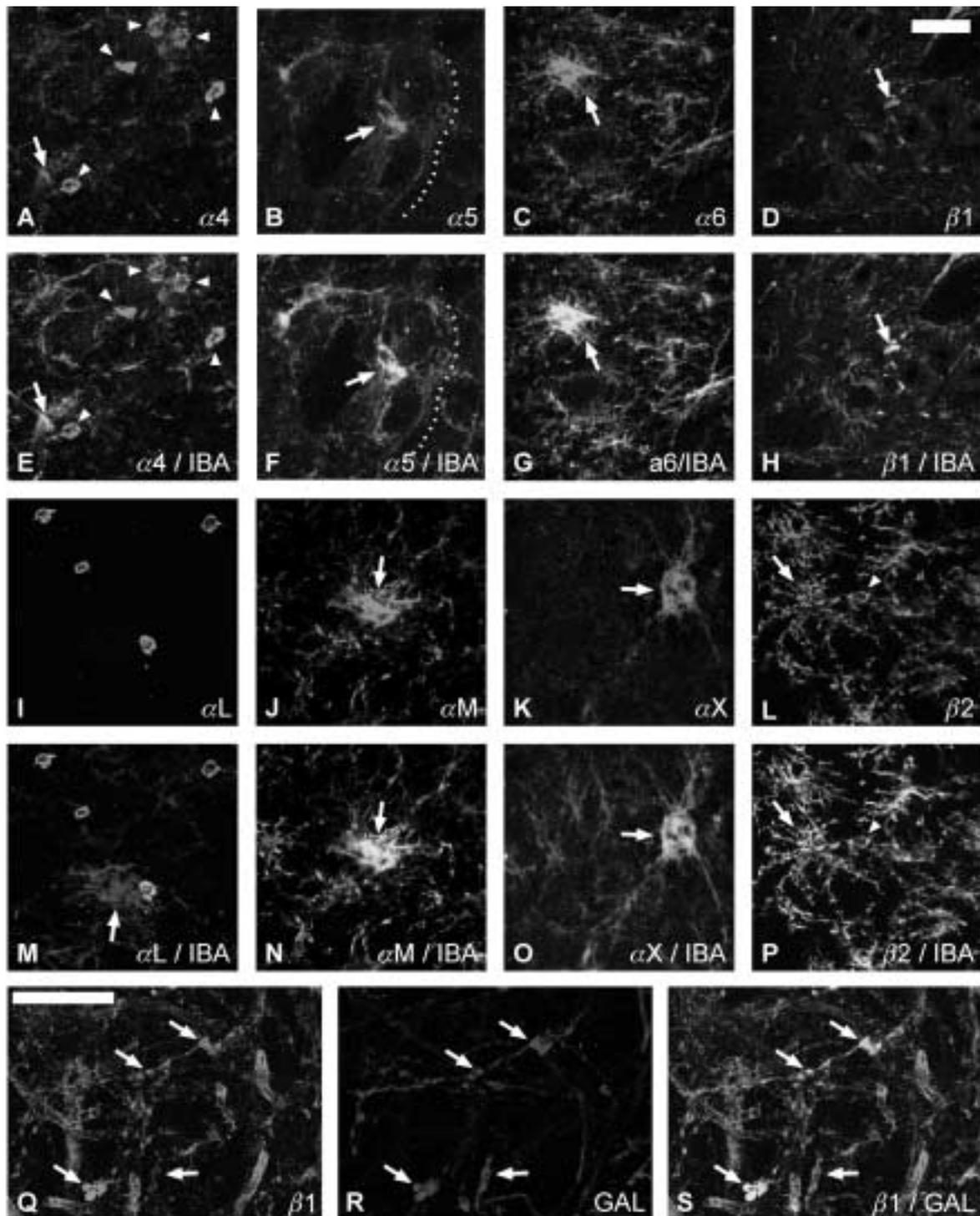


Abbildung 17. Kolokalisation der Integrine $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\beta 1$, αM , αL , αX und $\beta 2$ am Tag 14 nach Fazialis-Durchtrennung. Integrin-Kolokalisation mit Mikroglia (A-P) und axonalen Wachstumskegeln (Q-S) 14 Tage nach der Axotomie. Mikroglia wurden anhand der IBA1-Immunoreaktivität erkannt, Axone waren Galanin-positiv (rote Farbe). A-P. Immunofluoreszenz für die Integrin-Untereinheiten $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\beta 1$, αM und αX auf den IBA1-positiven Knötchen von phagozytischer Mikroglia (Pfeile). Immunoreaktivität für $\alpha 4$, αL und $\beta 2$ findet sich auch auf $8 \mu m$ großen, runden Zellen, die IBA1-negativ sind (Pfeilköpfe in A, E, L, P; in I und M sind ausschließlich diese Zellen grün). Zusätzlich findet sich $\alpha 5$ -Immunoreaktivität auf dem Gefäßendothel (B, F; kleine Pfeilköpfe). Maßstabsbalken = $25 \mu m$. Q-S. Kolokalisation von der $\beta 1$ -Integrin-Untereinheit (grün) und Galanin-immunoreaktiven aussprossenden Axonen im intrazerebralen Teil des Nervus facialis. Die Integrin-Immunoreaktivität ist besonders kräftig auf den deutlich zu erkennenden axonalen Wachstumskegeln, die stark Galanin-reaktiv sind (Pfeile). Die $\beta 1$ -Anfärbung der einzelnen Wachstumskegel schwankt stark. Maßstabsbalken = $25 \mu m$.

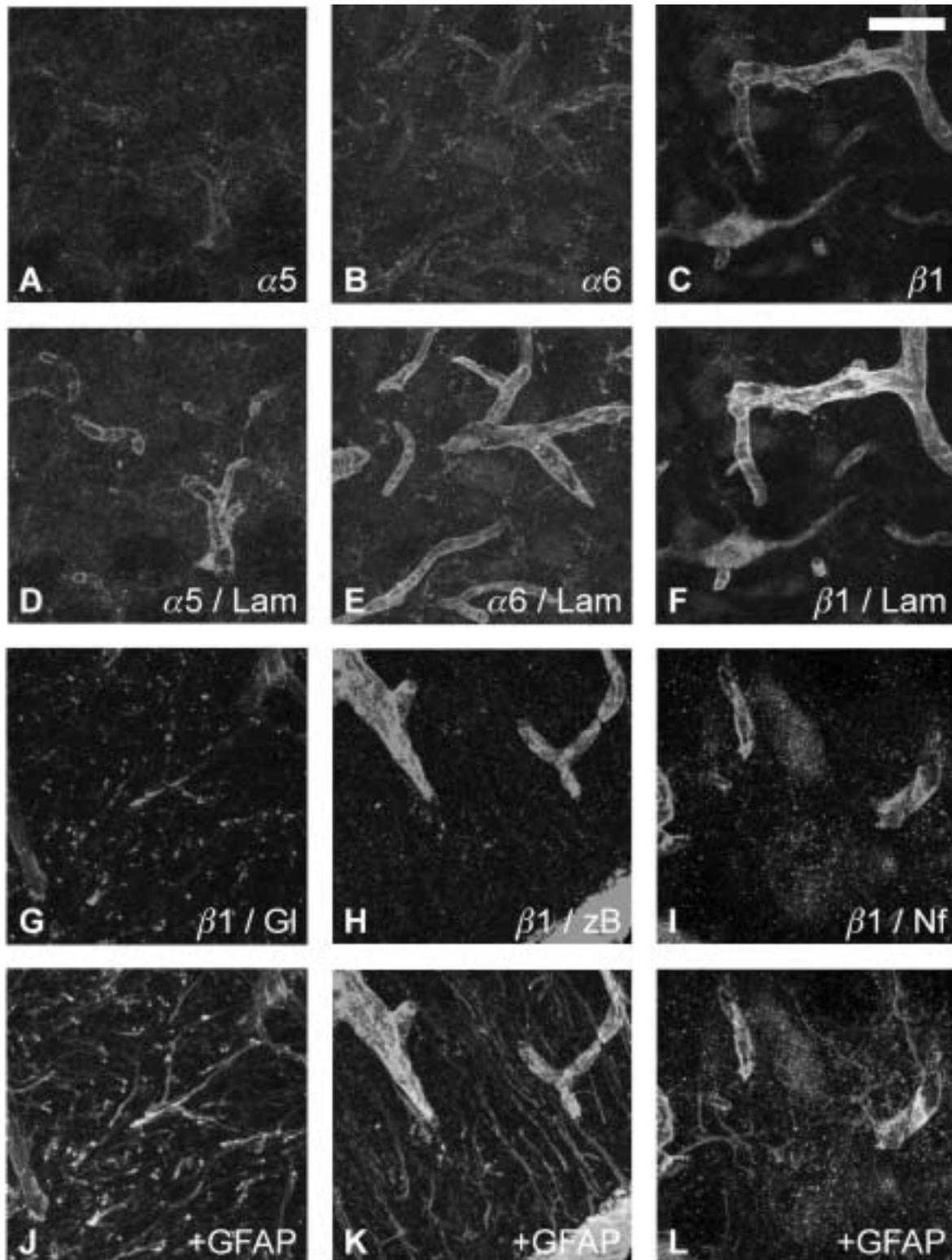


Abbildung 18. Kolokalisation der Integrine $\alpha 5$, $\alpha 6$ und $\beta 1$ mit Endothelien und Astrozyten. Integrin-Kolokalisation mit vaskulärem Endothel (A-F) und Astrozyten (G-L). Die Endothelien wurden durch Laminin-Immunreaktivität detektiert (Lam, rot), die Astrozyten durch die GFAP-Färbung (GFAP, rot). A-F. $\alpha 5$ -, $\alpha 6$ - und $\beta 1$ -Immunreaktivität (grün) liegt auf vaskulären Gefäßendothelien am Tag 14 nach Axotomie. G-L. $\beta 1$ -Integrin-Immunreaktivität (grün) in der normalen weißen Substanz, im normalen Kleinhirn, und im axotomierten Nucleus facialis. Die $\beta 1$ -Immunreaktivität kolokalisiert mit den GFAP-positiven Astrozyten der weißen Substanz nahe der Glia limitans (G,J; Gl), und eine schwächere, gepunktete Färbung findet sich auch auf der zerebellären Bergmann-Glia (H,K; zB). Im axotomierten Nucleus facialis kolokalisierten GFAP-positive, reaktive Astrozyten hingegen nicht mit dem $\beta 1$ -Integrin, am Tag 4 nach der Axotomie (I,L; Nf). Maßstabsbalken = $25 \mu m$.

auch IBA1 sind spezifische Marker für Mikroglia (Fishman und Savitt, 1989; Vedeler et al., 1994; Imai et al., 1996; Werner et al., 1998). Wie in Abbildung 16 (Seite 78) gezeigt, kolokalisiert am Tag 2 nach Fazialis-Durchtrennung die Immunoreaktivität für α M und β 2 komplett mit der durch endogenen IgG detektierten Mikroglia. Diese IgG-positive Mikroglia zeigt ebenfalls eine klare aber unvollständige Kolokalisation mit den Untereinheiten α 5, α 6 und β 1. Abbildung 16 (Seite 78) zeigt bei Tag 14 eine

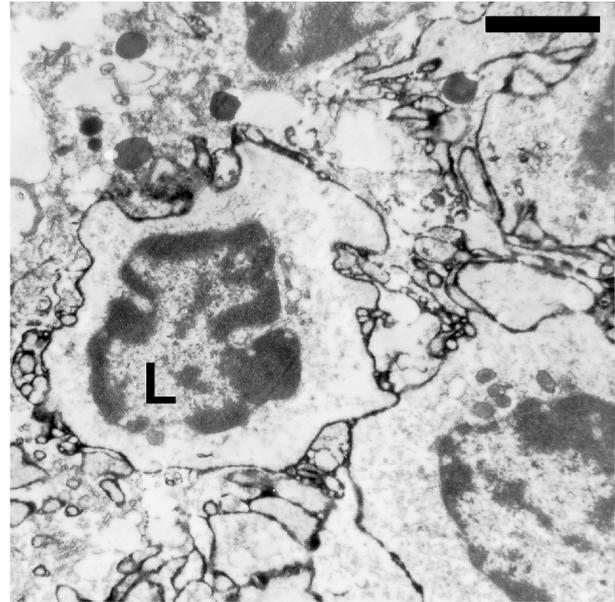


Abbildung 19. Ultrastrukturelle Lokalisation der α L-Immunoreaktivität. Ultrastrukturelle Lokalisation der α L-Immunoreaktivität, 14 Tage nach der Axotomie. Mittelstarke α L-Färbung auf der Zellmembran (Pfeile) eines Lymphozyten (L), der an seinem Elektronendurchlässigen Zytoplasma und dem typischen, tief eingekerbten Zellkern zu erkennen ist. Maßstabsbalken = 2μ m.

besonders starke Mikroglia-Immunoreaktivität für die α M-, α X-, α 5-, α 6- und β 1-Integrin-Untereinheiten auf Knötchen von phagozytischer, IBA1-positiver Mikroglia. Diese Knötchen zeigten auch eine β 2-Anfärbung. Aktivierte Mikroglia zeigte bei Tag 14 ebenfalls eine Immunoreaktivität für das α 4-Integrin, allerdings war sie auf allen Mikrogliazellen etwa gleich stark und nicht vorzugsweise auf den phagozytischen Knötchen zu finden (Abbildung 16, Seite 78). Zusätzlich zu der Mikroglia-Färbung fanden sich in der Doppelmarkierung auch α 4-, α L- und β 2-Immunoreaktivität auf ca. 8μ m großen, runden Zellen, die IgG- und IBA1-negativ waren. Diese α L- und α 4-positiven Zellen tendierten dazu, an den IgG- und IBA1-immunoreaktive, Mikroglia-Knötchen zu aggregieren (Abbildung 16; Seite 78; Abbildung 16, Seite 78). Eine ähnliche Lokalisation fand sich auch für die β 1-Immunoreaktivität, und einige wenige runde Zellen zeigten auch Immunoreaktivität für das β 7-Integrin (nicht abgebildet). Die Identität dieser kleinen, runden Zellen wurde in der Immunelektronenmikroskopie untersucht. Die Abbildung 18 (Seite 81) zeigt die α L-Immunoreaktivität auf der Plasmamembran von Zellen mit der typischen Morphologie reaktiver Lymphozyten, mit

einem elektronendurchlässigen Zytoplasma und einem tief eingekerbten Zellkern (Mori und Lennert, 1969).

Tabelle XI. Lokalisation der Integrin-Immunoreaktivität in der Maus

Antigen	CD	Milz	Zerebellum	normaler Nucleus facialis	axotomierter Nucleus facialis
$\alpha 4$	49d	PALS, RP, HEV	Bergmann-Glia	-	Lymphozyten, Mikroglia
$\alpha 5$	49e	T, RWP, G, RP	Gefäße	Neuropil, Gefäße	Mikroglia, Neuropil, Gefäße
$\alpha 6$	49f	RWP, G, HEV	Gefäße	Gefäße	Mikroglia, Gefäße
αL	11a	PALS, RP	-	-	Lymphozyten
αM	11b	PALS, DZ, RP	Mikroglia	Mikroglia	Mikroglia
αX	11c	PALS, DZ, RP	-	-	Mikroglia
αE	103	-	-	-	-
αV	51	-	-	-	-
$\beta 1$	29	RP, HEV, T, G	Neurone, Gefäße, Bergmann-Glia	Neurone, Gefäße	Neurone, Gefäße, Mikroglia, Lymphozyten
$\beta 2$	18	PALS, DZ, RP	Mikroglia	Mikroglia	Mikroglia, Lymphozyten
$\beta 3$	61	HEV, RP	-	-	-
$\beta 4$	104	RWP, G	-	-	-
$\beta 7$		PALS, MZ	-	-	Lymphozyten

Abkürzungen. **DZ** dendritische Zellen, **G** Gefäße, **HEV** hohe, endotheliale Venuolen, **MZ** Marginalzone, **PALS** periarterielle Lymphozytenscheide, **RP** rote Pulpa, **RWP** Retikula in WP, **T** Trabekel, **WS** weiße Substanz.

Starke Immunoreaktivität für die $\beta 1$ -Integrin-Untereinheit fand sich auch auf benachbarten Motoneuronen (Abbildung 16, Seite 78). Diese $\beta 1$ -Immunoreaktivität tauchte auch auf den axonalen Wachstumskegeln im Nucleus facialis und dem intrazerebralen Teil der Nervus facialis auf (Abbildung 16, Seite 78), wo sie mit Galanin, einem Neuropeptid, das in einer großen Subpopulation von axotomierten Motoneuronen der Maus vorkommt, kolokalisierte (Moore, 1989; Klein et al., 1997). Eine deutliche Immunoreaktivität für das $\alpha 5$ -, $\alpha 6$ - und $\beta 1$ -Integrin fand sich auf Laminin-positiven Endothelien (Abbildung 17, Seite 79). Im Gegensatz zu Neuronen, Mikroglia und Endothelien fand sich in dieser Studie bei keinem Integrin eine Kolokalisation mit GFAP-positiven Astrozyten in der grauen Substanz des axotomierten Nucleus facialis. Allerdings zeigte sich eine punktförmige Anfärbung von $\beta 1$ auf GFAP-positiven Astrozyten in der Nähe der Glia limitans in der weißen Substanz und etwas

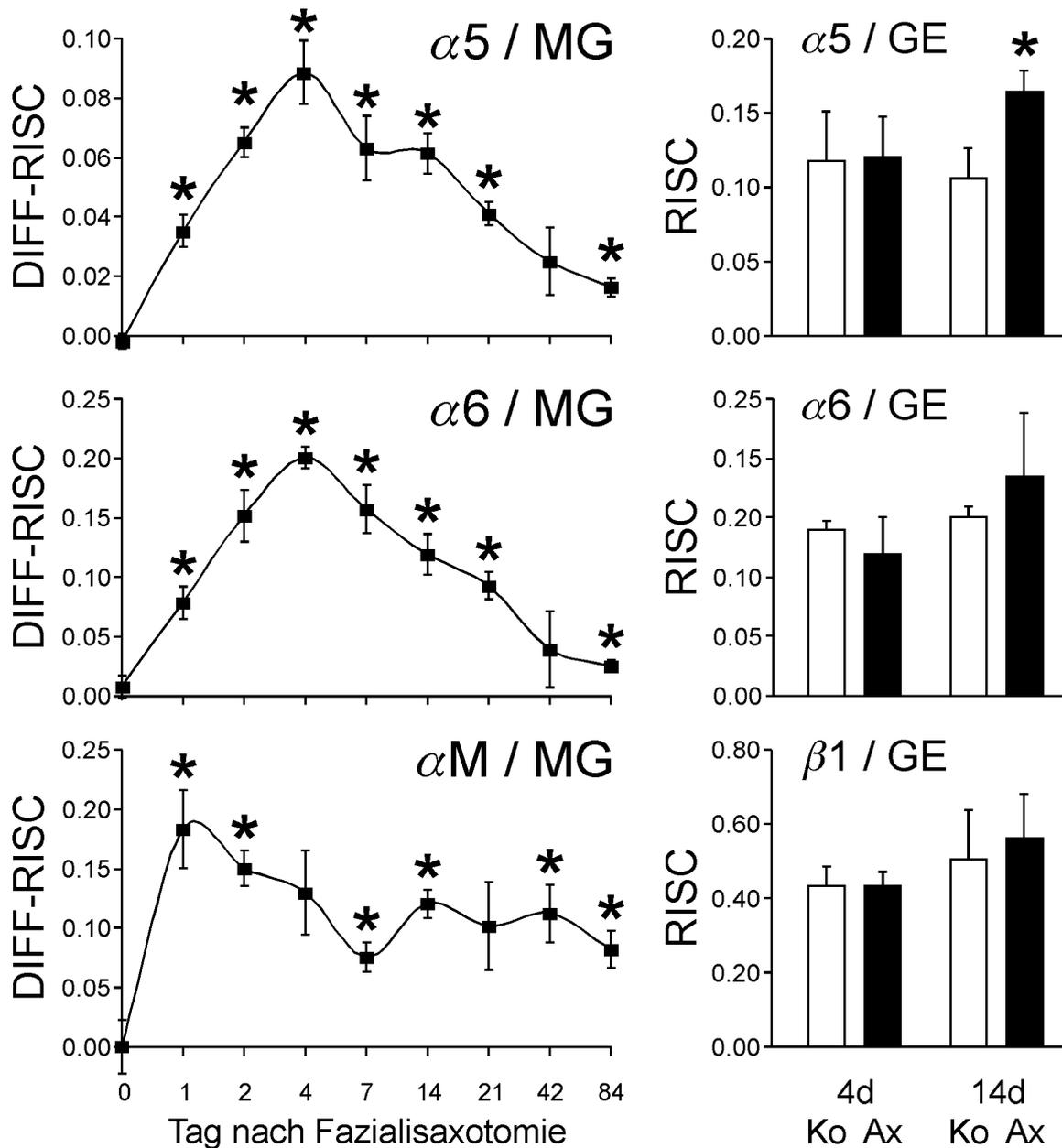


Abbildung 20. Zeitverlauf der zellulären Immunoreaktivität für Integrine im axotomierten Nucleus facialis. Links. Veränderungen des Integrin-Färbefaktoren auf Immunglobulin G-abgegrenzten, mikroglialen Profilen (MG), axotomierte gegen Kontrollseite, errechnet mit dem DIFF-RISC-Algorithmus. Die Untereinheiten $\alpha 5$ und $\alpha 6$ zeigen einen monophasischen Verlauf mit einem Maximum an Tag 4. Die αM -Immunoreaktivität verläuft biphasisch, mit einem frühen Gipfel an Tag 1, gefolgt von einem Abfall und einem zweiten Anstieg mit Plateau von Tag 14 bis 42. **Rechts.** Integrin-Immunoreaktivität für $\alpha 5$, $\alpha 6$ und $\beta 1$ auf Gefäßendothelien (GE) im axotomierten Nucleus facialis. Einzig die $\alpha 5$ -Immunoreaktivität zeigte einen statistisch signifikanten Anstieg am Tag 14 auf der axotomierten Seite (Ax) gegenüber der Kontrollseite (Ko). Für $\alpha 6$ und $\beta 1$ fand sich an diesem Tag auch ein Trend zum Anstieg, der aber nicht statistisch signifikant war (Mittelwerte \pm Standardfehler, 3-5 Tiere pro Zeitpunkt, * $p < 0,05$).

schwächer auf der zerebellären Bergmann-Glia (Abbildung 17, Seite 79). Auch das $\alpha 4$ -Integrin fand sich auf den Pia-nahen Astrozytenfortsätzen an der Glia limitans und der Bergmann-Glia.

3.1.3.2 Quantitative Integrin-Immunoreaktivität auf Mikroglia und Endothelien

Die Dichte der Integrin-Immunoreaktivität wurde wie in 2.1.5 beschrieben auf einzelnen Mikrogliazellen und Endothelien mit Hilfe von Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen, dem Laser-Scanning-Mikroskop und dem RISC-Algorithmus bestimmt. Endogenes IgG diente als Mikroglia-Zellmarker, Laminin um Endothelien zu identifizieren (Abbildung 19, Seite 83). Messung der αM -Immunoreaktivität auf der Mikroglia zeigte einen biphasischen Verlauf mit einem Maximum bei Tag 1 nach Fazialis-Durchtrennung, einer langsamen Abnahme bis Tag 7, und einem zweiten, kleineren Anstieg zu einem Plateau von Tag 14 bis Tag 42. Die Untereinheiten $\alpha 5$ und $\alpha 6$ zeigten auf der Mikroglia einen stetigen, monophasischen Anstieg mit einem Gipfel bei Tag 14, gefolgt von einem langsamen Rückgang bis Tag 84.

Die Messung der $\alpha 5$ -Untereinheit zeigte einen statistisch signifikanten Anstieg der Immunoreaktivität auf den Laminin-positiven Endothelien im axotomierten Nucleus facialis am Tag 14 nach dem Trauma (Abbildung 19, Seite 83). Zusätzlich fand sich ein Trend zu einem Anstieg des $\alpha 6$ - und $\beta 1$ -Integrins zu diesem Zeitpunkt auf den Endothelien, der aber keine statistische Signifikanz erreichte. Am Tag 4 nach Fazialis-Durchtrennung fand sich für keine Integrin-Untereinheit ein Anstieg auf den Endothelien der axotomierten Seite.

3.1.4 Integrine auf der Mikroglia im normalen Hirnstamm und nach LPS-Gabe

3.1.4.1 Mikroglia-Morphologie im dorsalen Hirnstamm

Wie im Nucleus facialis gezeigt, erkennt der monoklonale 5C6-Antikörper spezifisch die murine Mikroglia im normalem Hirnstamm anhand ihres konstitutiv exprimierten Integrins $\alpha M\beta 2$ und kann deshalb zur Darstellung der Mikroglia-Morphologie benutzt werden (Perry et al., 1985; Raivich et al., 1994). Im normalen, lateralen Hirnstamm fand sich die typische ramifizierte Morphologie ruhender Mikroglia mit kleinem Zellkörper, vielen, verzweigten,

schlanken Fortsätzen und extensiver Ramifizierung der distalen Zellausläufer (Abbildung 20, Seite 86). In der Area postrema hatte die Mikroglia etwas plumpere Fortsätze, reduzierte Ramifizierung der distalen Ausläufer und eine intensivere Anfärbung für das Integrin $\alpha M\beta 2$, alles Zeichen einer leichten Aktivierung (Kreutzberg, 1996; Raivich et al., 1999). In der Area postrema gibt es keine Blut-Hirn-Schranke und Serumbestandteile haben Zugang zum Gehirnparenchym, wo sie die Mikroglia aktivieren können (Broadwell und Sofroniew, 1993; Pedersen et al., 1997). Diese Aktivierung nahm innerhalb von 200 μm um die Area postrema rapide ab, bis die Mikroglia wieder eine stark ramifizierte Morphologie zeigte (Abbildung 20, Seite 86).

3.1.4.2 Mikroglia-Morphologie im LPS-stimulierten Hirnstamm

Bereits 12 Stunden nach der Injektion der bakteriellen Lipopolysaccharide (LPS) kam es zu ersten Veränderungen der Mikroglia-Morphologie im Sinne einer Aktivierung, die nach 48 Stunden maximal wurde und dann wieder abnahm. Wie in Abbildung 20 (Seite 86) gezeigt, kam es zwei Tage nach peripherer LPS-Injektion zu einer dosisabhängigen, morphologischen Aktivierung der Mikroglia im dorso-lateralen Hirnstamm und der Area postrema. Applikation von 1 μg LPS hatte nur einen Einfluß auf die Mikroglia in der BHS-defizienten Area postrema. Ab Dosen von 10 μg LPS fand sich zusätzlich eine Aktivierung der Mikroglia im dorso-lateralen Hirnstamm, die ab 100 μg LPS maximal wurde. Höhere Gaben von LPS bis zu 3 mg führten zu keiner weiteren Änderung der Mikroglia-Morphologie. Die vollständig aktivierte Mikroglia im Hirnstamm zeigte große Zellkörper, starke proximale Fortsätze, eine deutliche Reduktion der distalen Ramifikation und einen Anstieg der $\alpha M\beta 2$ -Immunoreaktivität. Interessanterweise verlor die Mikroglia ihre Ramifikation nicht vollständig und nahm trotz maximaler LPS-Dosen weder in der Area postrema noch im lateralen Hirnstamm die runde Morphologie typischer Makrophagen an (Abbildung 21, Seite 87).

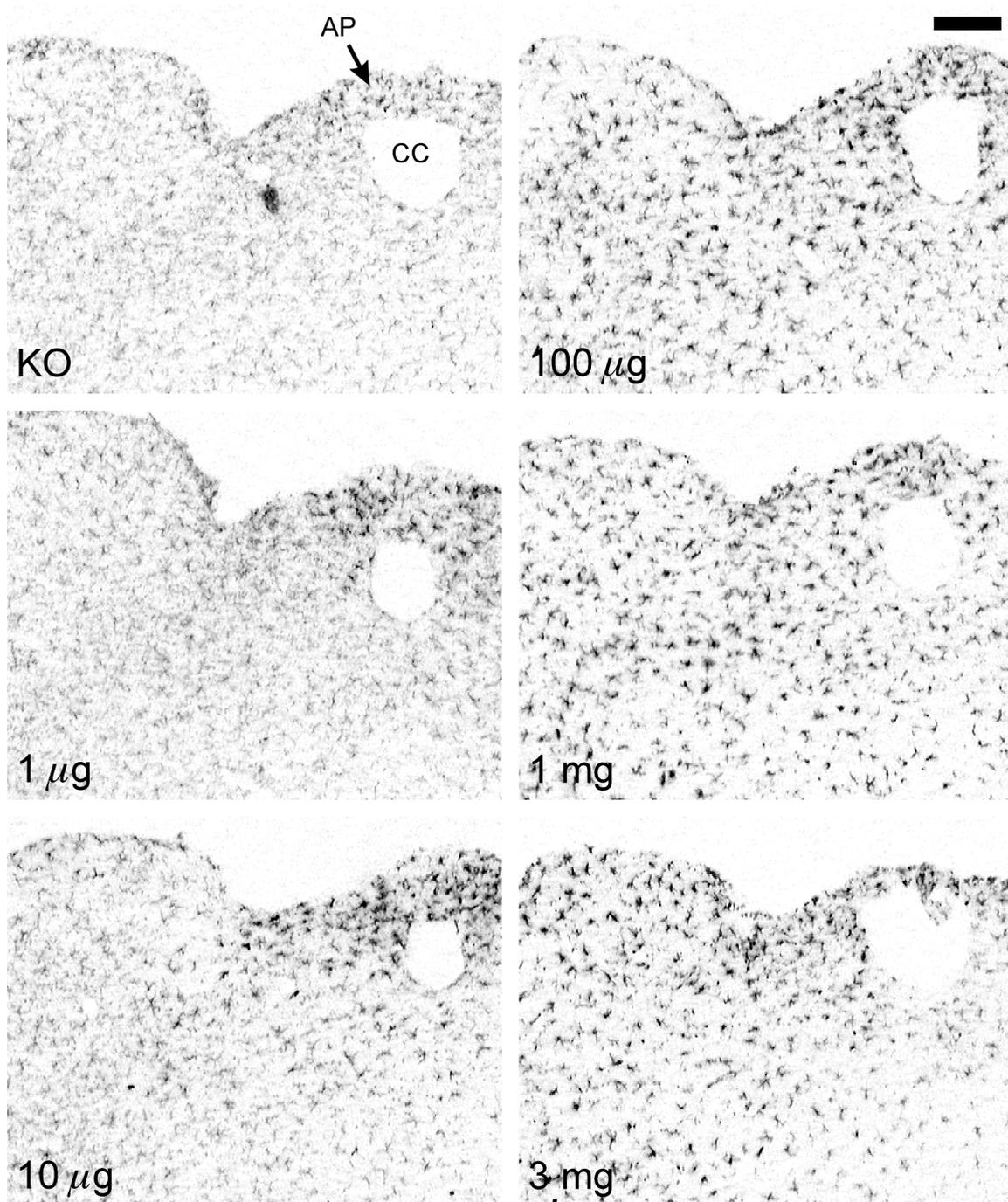


Abbildung 21. Mikroglia-Aktivierung im Hirnstamm bei steigender LPS-Dosis. Mikroglia im dorsalen Hirnstamm mit $\alpha M\beta 2$ -Integrin-Immunoreaktivität detektiert. Im normalen Hirnstamm (KO) zeigt nur die Mikroglia in den lateralen Anteilen die extensive Verästelung ruhender Mikroglia, in der Area postrema (AP) dorso-lateral des Canalis centralis (CC) zeigt die Mikroglia bereits erste Aktivierungszeichen wie leichte Verplumpung der Fortsätze, und stärkere $\alpha M\beta 2$ -Anfärbung. Zwei Tage nach systemischer Gabe von $1 \mu\text{g}$ Lipopolysacchariden (LPS) wurde die Mikroglia-Aktivierung in der Area postrema stärker. Aktivierung der Mikroglia in den lateralen Hirnstammanteilen fand sich ab $10 \mu\text{g}$ und wurde bei $100 \mu\text{g}$ maximal. Höhere Dosen bis hin zu 3 mg führten zu keiner weiteren morphologischen Aktivierung in der Area postrema oder dem lateralen Hirnstamm. Maßstabsbalken = $250 \mu\text{m}$.

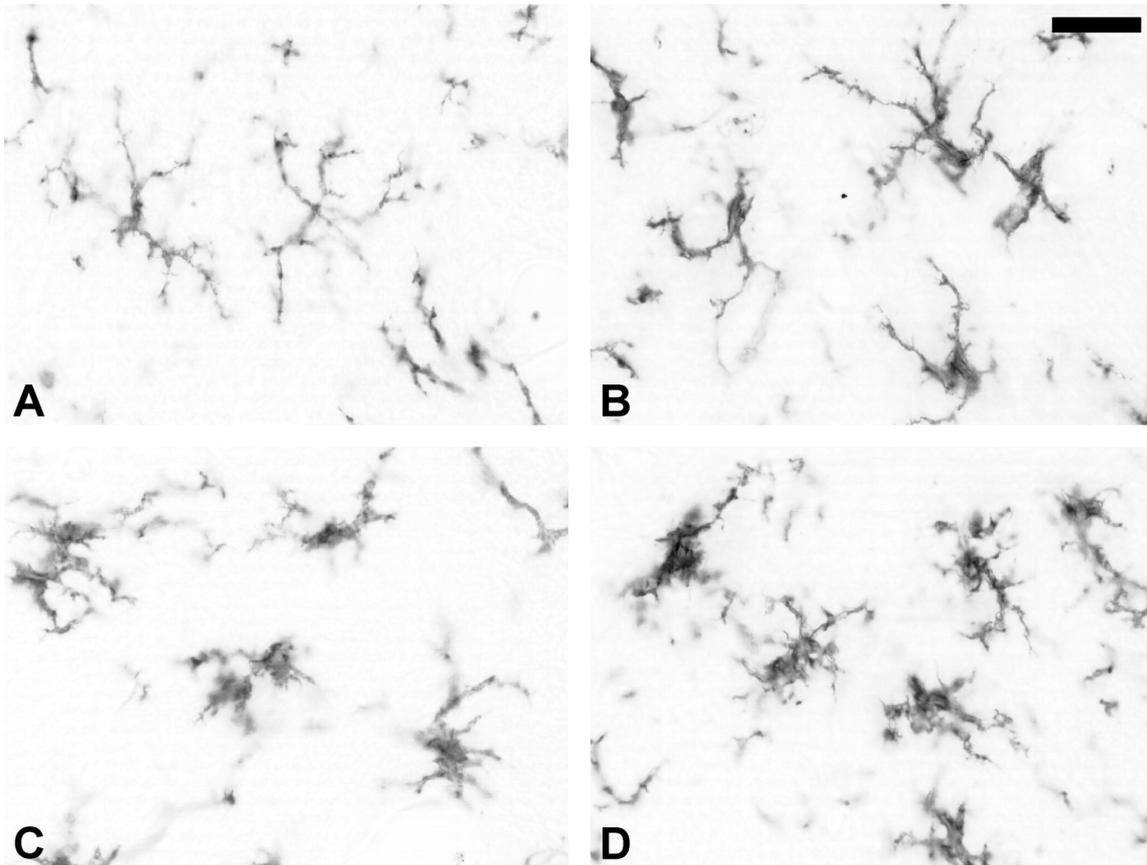


Abbildung 22. Morphologie normaler und LPS-aktivierter Hirnstammikroglia. $\alpha M\beta 2$ -positive Mikroglia im lateralen Hirnstamm (A,C) und der Area postrema (B,D), im normalen Gehirn (A,B) und 2 Tage nach Stimulation mit 3 mg LPS (C,D). Im normalen Hirnstamm zeigt die Mikroglia 200 μm von der Area postrema entfernt (A) die Morphologie ruhender Mikroglia mit einem kleinen Zellkörper, langen, schlanken Fortsätzen und starker, distaler Ramifikation. Nach LPS-Stimulation (C) verplumpen die proximalen Fortsätze, die distale Verästelung geht zurück und die $\alpha M\beta 2$ -Immunoreaktivität steigt an, Zeichen einer Mikroglia-Aktivierung. In der Area postrema sieht die Mikroglia bereits im normalen Gehirn (B) leicht aktiviert aus und diese Aktivierung nimmt nach LPS-Stimulation noch zu (D). Interessanterweise findet sich an beiden Orten aber kein vollständiger Verlust der Ramifikation und keine morphologische Transformation zu runden Makrophagen. Maßstabsbalken = 25 μm .

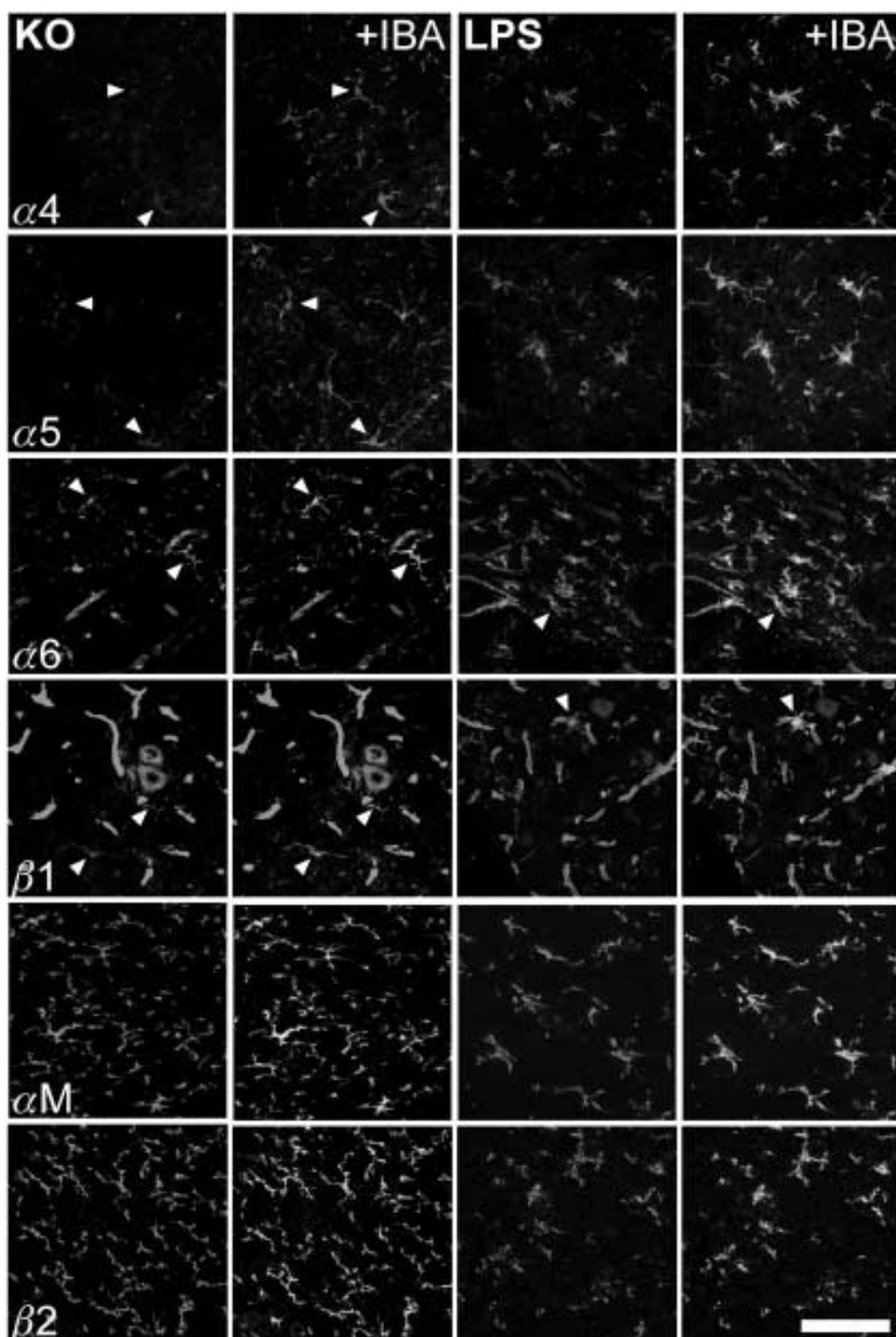


Abbildung 23. Lipopolysaccharid-Effekt auf Integrin-Expression im Hirnstamm. Die Integrin-Untereinheiten $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\beta 1$, αM und $\beta 2$ in der konfokalen Laser-Scanning-Fluoreszenz-Immunohistochemie (grün; alle Spalten) und überlagerte Immunoreaktivität für den IBA1-positive Mikroglia (rot; +IBA) im Hirnstamm 200 μm von der Area postrema. Im normalen Gehirn (linke beiden Spalte) findet sich für die Integrin-Untereinheiten αM und $\beta 2$ starke und für $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$ und $\beta 1$ eine schwächere (Pfeilköpfe in KO und KO+IBA) Immunoreaktivität, die mit der IBA1-positiven Mikroglia kolokalisiert (KO+IBA). Zwei Tage nach Stimulation mit 100 μg Lipopolysacchariden (LPS; rechte beiden Spalten) findet sich ein starker Anstieg aller Integrin-Untereinheiten auf der Mikroglia. Die $\alpha 6\beta 1$ -positiven Gefäße und die $\beta 1$ -reaktiven Neurone zeigen keine Reaktion auf die LPS-Exposition. Maßstabsbalken = 50 μm .

3.1.4.3 Integrin-Expression im normalen LPS-stimulierten Hirnstamm

Wie im Nucleus facialis fand sich auch im normalen, dorsalen Hirnstamm deutliche Immunoreaktivität für die Integrine αM , $\beta 2$, $\alpha 6$ und $\beta 1$, wobei die $\alpha M\beta 2$ -Immunoreaktivität auf Mikroglia beschränkt war, $\alpha 6\beta 1$ vornehmlich Gefäßendothelien färbte und $\beta 1$ auch noch auf Neuronen zu finden war. Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie mit Immunfluoreszenz-Doppelmarkierungen zeigte aber im Gegensatz zum Nucleus facialis im dorsalen Hirnstamm, 200 μm von der Area postrema entfernt, zusätzlich eine schwache Anfärbung für die Integrin-Untereinheiten $\alpha 5$, $\alpha 6$ und $\beta 1$ sowie eine kaum detektierbare $\alpha 4$ -Immunoreaktivität, die alle mit der IBA1-positiven Mikroglia kolokalisierten (Abbildung 22, Seite 88).

Die periphere Injektion von 100 μg LPS aktivierte nach zwei Tagen die Mikroglia im gesamten Hirnstamm (vgl. Abbildung 20, Seite 86) und führte zu deutlichen Veränderungen in der Integrin-Expression. Die LPS-Stimulation führte 200 μm von der Area postrema entfernt zu einer drastischen Hochregulation der Integrin-Untereinheiten $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, αM , $\beta 1$ und $\beta 2$ (Abbildung 22, Seite 88). In der grauen Substanz kolokalisierten die Integrine nur mit IBA1-positiver Mikroglia, nicht aber mit GFAP-positiven Astrozyten (nicht abgebildet). Die $\alpha 6\beta 1$ -Expression der Gefäßendothelien und das neuronale $\beta 1$ wurden durch die LPS-Stimulation nicht beeinflusst. Für die Integrin-Untereinheiten αL , αX , $\beta 3$, $\beta 4$ und $\beta 7$ fand sich im normalen oder LPS-stimulierten dorsalen Hirnstamm keine Immunoreaktivität für Antikörper, die in der Milz und im axotomierten Nucleus facialis spezifisch Integrine erkannten.

3.2 Ramifizierte Mikroglia in Zellkultur

3.2.1 Morphologie der ramifizierten Mikroglia

Wie *in vivo* konnte die Mikroglia auch *in vitro* eindeutig anhand der konstitutiven Expression des $\alpha M\beta 2$ -Integrins identifiziert werden. Im Gegensatz zu der Morphologie im normalen

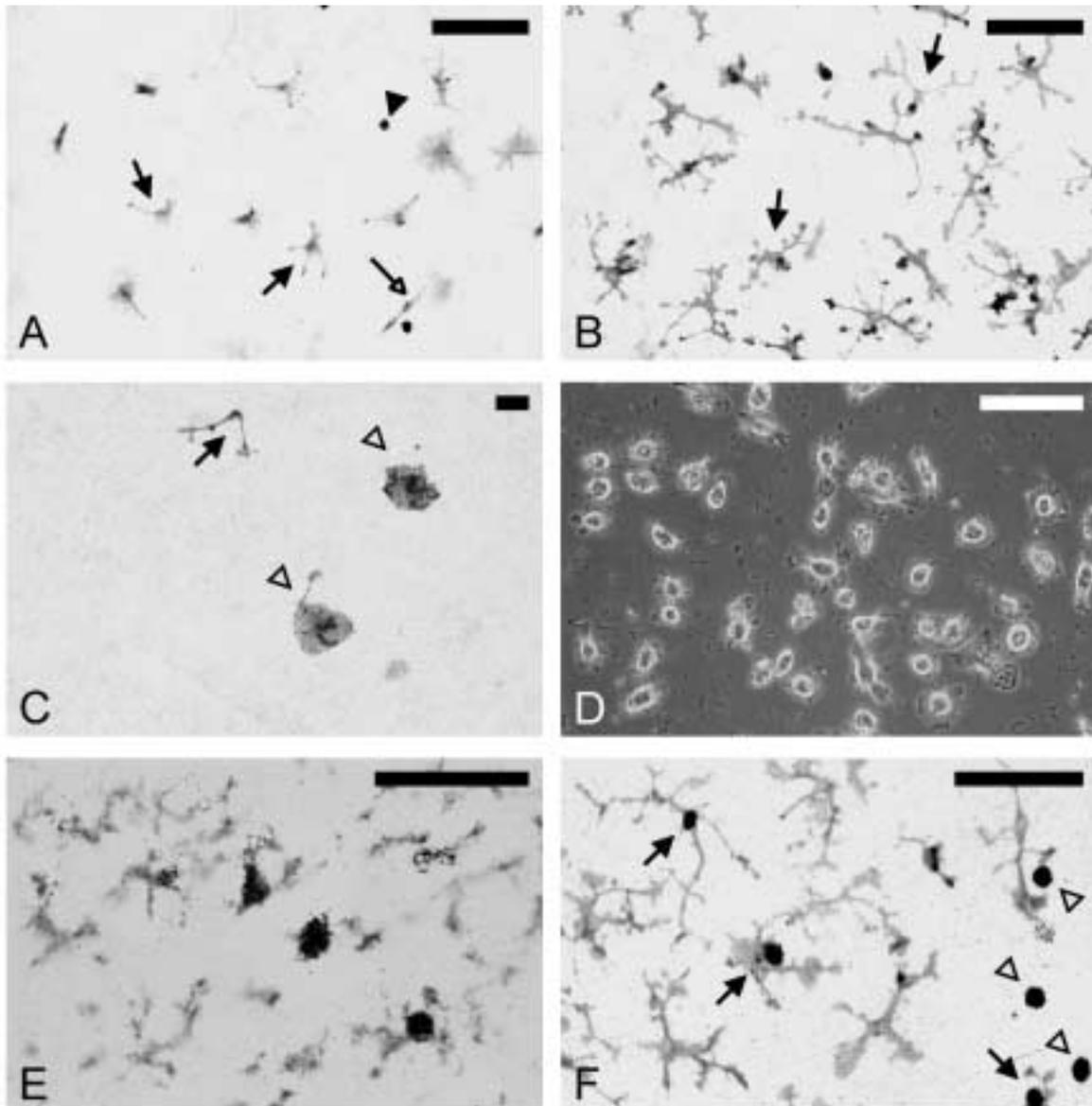


Abbildung 24. Mikrogliakulturen *in vivo* und *in vitro*. A und B. Entwicklung von Maus-Mikroglia auf einem konfluenten Ratten-Astrozytenrasen, detektiert mit dem 5C6-Antikörper gegen das $\alpha M\beta 2$ -Integrin. A. Tag 2 in Kokultur. Einige Mikrogliazellen haben noch eine runde, makrophagenähnliche Morphologie (offene Pfeilköpfe), andere zeigen bereits eine leichte Ramifikation (ausgefüllter Pfeile). Es finden sich auch bipolare Mikrogliazellen (offener Pfeil) und zellulärer Debris (ausgefüllter Pfeilkopf). B. Tag 14 in Kokultur. Die meisten $\alpha M\beta 2$ -positiven Mikrogliazellen haben jetzt eine deutlich ramifizierte Morphologie (Pfeil) und ähneln ihren Gegenstücken *in vivo* (Abbildung 22). C. OX42-positive Ratten-Mikroglia, die mit dem Astrozytenrasen assoziiert ist. Die meisten Zellen haben eine große, runde, flache Morphologie (offene Pfeilköpfe), wenige Rattenmikrogliazellen sind spärlich ramifiziert. Der 5C6-Antikörper erkennt nur Maus-Mikroglia, während OX42 der Mikroglia in Ratte und Maus reagiert. D. Reine Mikroglia-Kultur im Phasenkontrast. Makrophagenähnliche Zellen mit Pseudopodien und kurzen, filopodischen Fortsätzen. E. Mikroglia im Nucleus facialis, Tag 2 nach Axotomie. Kolokalisation des $\alpha M\beta 2$ -Integrins (Klon 5C6) mit 3H -Thymidin-positiven Kernen von ramifizierter, proliferierender Mikroglia. F. Kulturen von ramifizierter Mikroglia auf einem konfluenten Astrozytenrasen. Kombinierte $\alpha M\beta 2$ -Immunhistochemie (5C6) und Autoradiographie. Die 3H -Thymidin-positiven Mikrogliazellen zeigen eine deutliche Ramifizierung. Einige 3H -Thymidin-positiven Zellen sind $\alpha M\beta 2$ -negativ (offene Pfeilköpfe). Maßstabsbalken jeweils 100 μm .

Gehirn fanden sich in den Monokulturen von Mikroglia nur runde, Makrophagen ähnelnde Zellen, einige mit Pseudopodien und kurzen filopodischen Fortsätzen (Abbildung 14, Seite 75 und Abbildung 23d, Seite 90). Keiner dieser Makrophagen zeigte eine Ramifikation wie die Mikroglia *in vivo*. Da Mikroglia ihre Morphologie je nach ihren Funktionszustand ändert, stellt sich die Frage, inwieweit Studien an diesen Makrophagen in Monokulturen zum Studium der Mikroglia geeignet sind.

Aus diesem Grunde wurde in dieser Arbeit die von Sievers et al. beschriebene Methode einer heterologen Kokultur benutzt, um die Ramifikation von Mikroglia zu induzieren (Sievers et al., 1994a; siehe 1.5). Diese Technik erlaubt es, eine uniforme Population von Maus-Mikroglia zu untersuchen, die an einem definierten Zeitpunkt auf eine Einzelzellschicht von Astrozyten ausgesät worden sind. Verunreinigungen mit Ratten-Mikroglia, die beim Anlegen des Astrozytenrasen entstanden sind und deshalb aus älteren Mikroglia bestehen, werden vom Maus-spezifischen Antikörperklon 5C6 gegen das $\alpha M\beta 2$ -Integrin nicht erkannt, konnten aber mit dem OX42-Antikörper nachgewiesen werden, der $\alpha M\beta 2$ in der Ratte und in der Maus erkennt (Reid et al., 1993). Wie in Abbildung 23c (Seite 90) gezeigt, sind diese zeitgleich mit den Astrozyten ausgesäten OX42-positiven Ratten-Mikrogliazellen sehr groß und haben häufig eine runde, flache Morphologie wie Makrophagen. In den Kokulturen machte die Ratten-Mikroglia etwa 20% der Gesamtmikroglia aus, konnte aber von der quantitativen Auswertung ausgeschlossen werden, da sie nicht vom 5C6-Antikörper erkannt wurde.

Die Maus-Mikroglia begann bereits zwei Tage nach der Aussaat auf dem Astrozytenrasen erste Fortsätze zu entwickeln und nach 14 Tagen zeigten über 90% der Zellen eine gute Ramifikation (Abbildung 23a,b; Seite 90). Diese ramifizierte Mikroglia war in der Lage zu proliferieren und ihre Morphologie erinnerte an die proliferierende Mikroglia *in vivo* (Abbildung 23e,f; Seite 90).

3.2.2 Wirkung von LPS auf ramifizierte Mikroglia in Kultur

Im lebenden Organismus ist nicht geklärt, ob das Endotoxin LPS direkt auf die Neuroglia

wirkt oder sein Effekt durch Gefäßendothelien, Ependym, Makrophagen im Plexus choroideus oder andere Mediatoren vermittelt wird (van Dam et al., 1995; Buttini et al., 1996). Eine Möglichkeit, dieses Problem anzugehen, ist die Reduktion der Komplexität des Gewebsverbandes in der Zellkultur.

3.2.2.1 Morphologie von LPS-stimulierter Mikroglia *in vitro*

Die Gabe von Lipopolysacchariden führte *in vitro* zu einer morphologischen Veränderung der Mikroglia, die parallel zu der Aktivierung durch LPS im zentralen Nervensystem verlief (vergleiche Abbildung 20, Seite 86 und Abbildung 24, Seite 94). In den ruhenden Kokulturen hatte die Mikroglia kleine Zellkörper, lange, schlanke Ausläufer und distale Ramifikation. Bereits eine 2-tägige Inkubation mit 50 ng/ml LPS induzierte eine milde Aktivierung. Höhere Konzentrationen als 5 μ g/ml LPS führten zu keiner zusätzlichen morphologischen Veränderung. Im maximal LPS-aktivierten Zustand hatten die meisten Mikrogliazellen einen vergrößerten Zellkörper, dicke, kurze, proximale Fortsätze, einen Verlust der distalen Ramifikation und einen Anstieg der α M β 2-Immunoreaktivität (Abbildung 24, Seite 94). Sie ähnelten auffällig den vollständig LPS-aktivierten Zellen im dorsalen Hirnstamm (Abbildung 20, Seite 86). Wie *in vivo* führte auch *in vitro* keine LPS-Konzentration zu einer vollständigen Umwandlung der Mikroglia zu kleinen runden Makrophagen. Interessanterweise traten bereits ab sehr geringen LPS-Konzentrationen von 50 ng/ml große, runde, flache Zellen mit schwacher α M β 2-Immunoreaktivität auf, die ca. 5% der gesamten α M β 2-positiven Zellen ausmachten (Abbildung 21, Seite 87). Der Anteil dieser Zellen an den gesamten α M β 2-positiven Zellen stieg bei höheren LPS-Konzentrationen nicht weiter an.

3.2.2.2 Integrin-Expression in LPS-stimulierten, Mikroglia-Zellkulturen

Zum Nachweis der Integrine in den Mikroglia-Zellkulturen wurden die gleichen, monoklonalen Antikörper benutzt wie in der Mäusemilz, dem axotomierten Nucleus facialis und dem LPS-stimulierten Hirnstamm (Tabelle VIII, Seite 68). Wie in Abbildung 25 (Seite 94) zu sehen, fand sich in den unstimulierten Kokulturen eine starke Immunoreaktivität für die

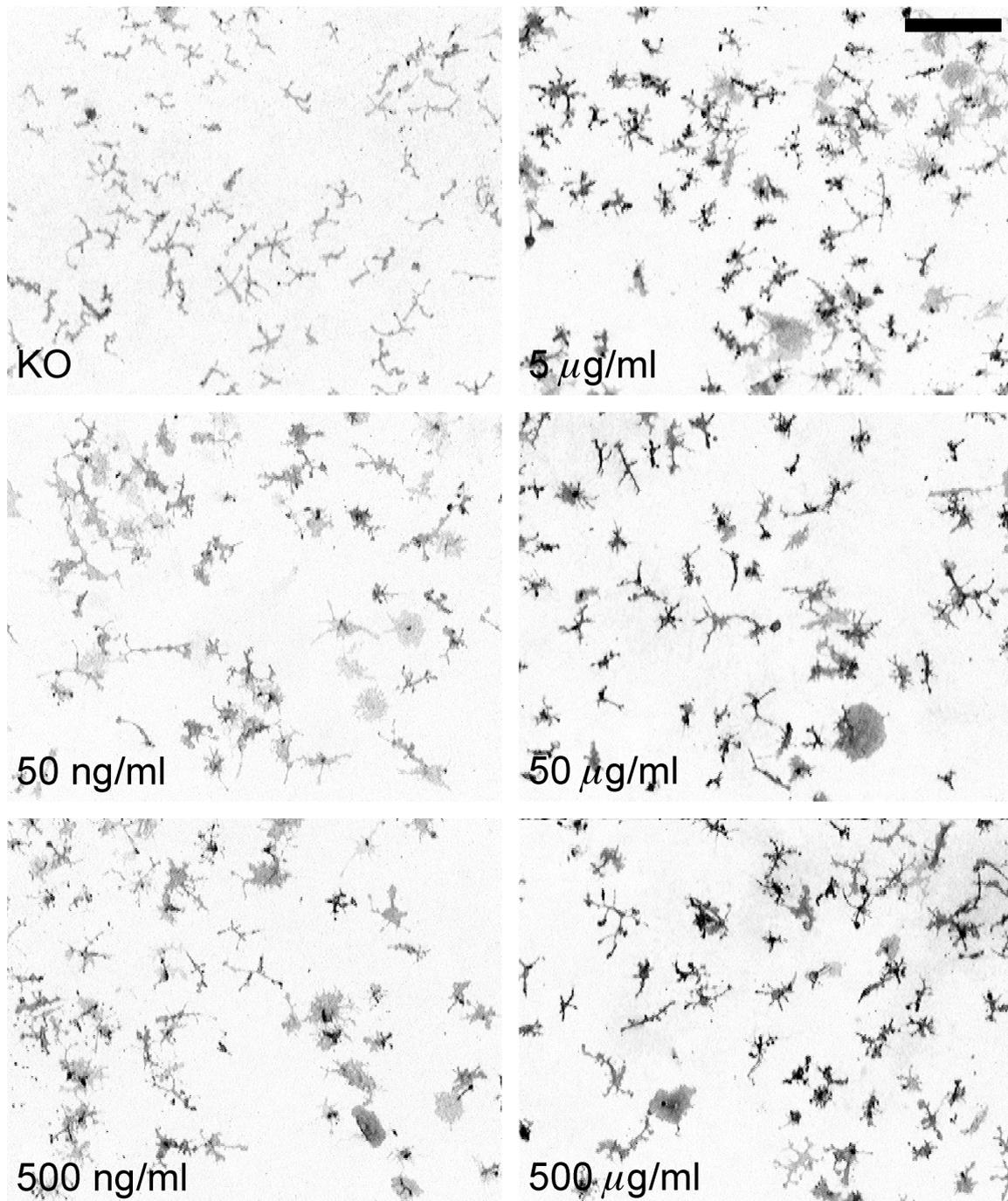


Abbildung 25. Dosisabhängiger Effekt von LPS auf kultivierte, ramifizierte Mikroglia. Ramifizierte Mikroglia auf einem konfluenten Astrozytenrasen, sichtbar gemacht durch $\alpha M\beta 2$ /DAB-Immunozytochemie. In den unstimulierten Kokulturen (KO) zeigen die Mikroglia-Zellen lange, schlanke Fortsätze, distale Ramifizierung und moderate $\alpha M\beta 2$ -Immunoreaktivität. Nach 2-tägiger Stimulation mit Lipopolysacchariden findet sich ein dosisabhängiger Effekt auf die Mikroglia-Morphologie. Die große Mehrzahl der Mikroglia verkürzt und verdickt ihre Fortsätze, reduziert die Ramifizierung und reguliert die $\alpha M\beta 2$ -Immunoreaktivität hoch. Ca. 5% der Mikroglia wird zu großen, runden, flachen Zellen mit zur geringer $\alpha M\beta 2$ -Immunoreaktivität. Ein Effekt des LPS auf die kultivierte Mikroglia findet sich bereits ab Konzentrationen von 50 ng/ml und er wird ab 5 μ g/ml maximal. Auch bei höchsten Konzentrationen verliert die Mikroglia ihre Ramifikation nicht vollständig und nimmt nicht die Morphologie von runden Makrophagen an (vgl. Abbildung 21 und Abbildung 24). Maßstabsbalken = 250 μ m.

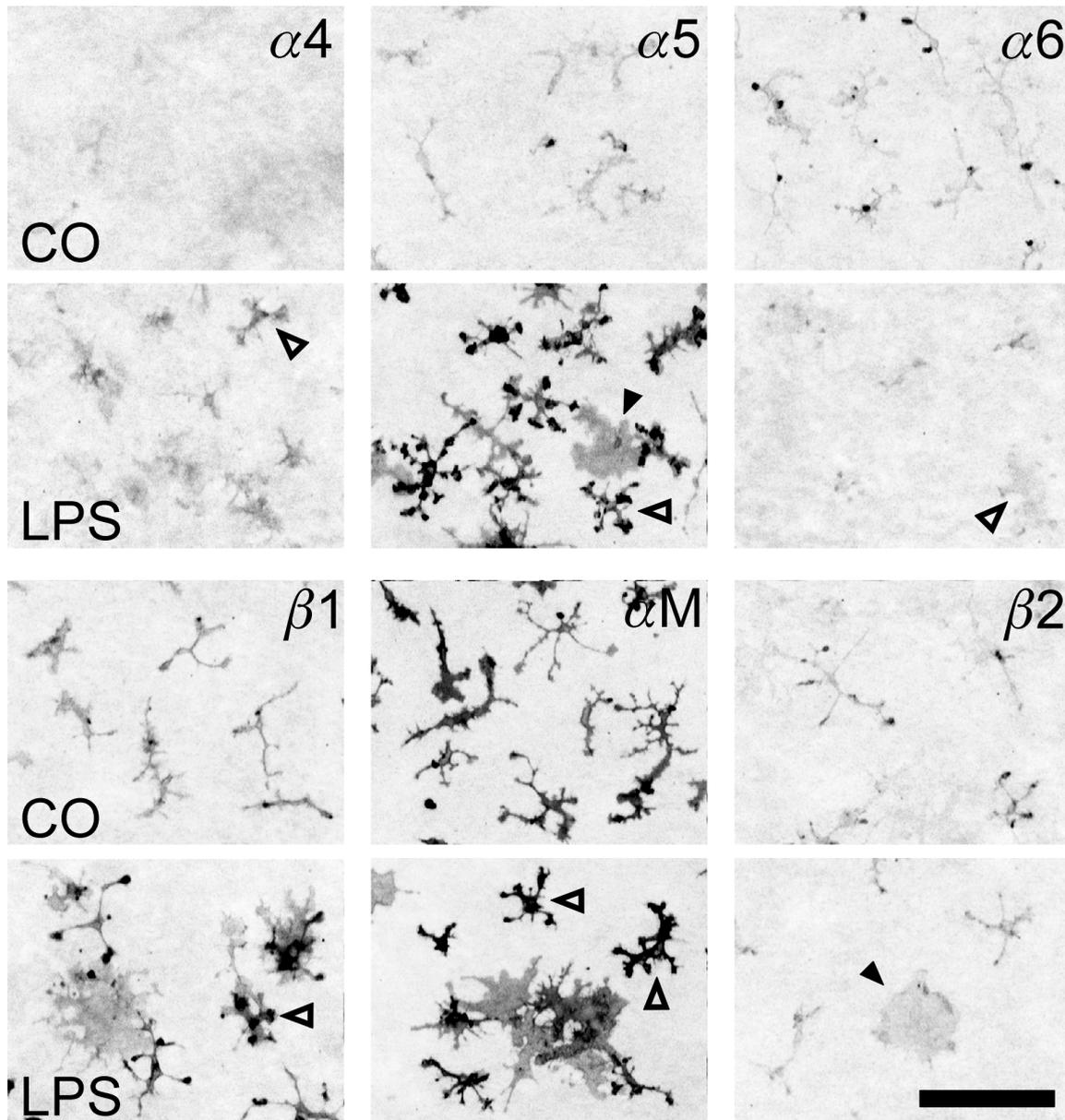


Abbildung 26. LPS-Effekt auf Integrin-Immunoreaktivität ramifizierter Mikroglia in Kultur. Detektion der Integrinuntereinheiten $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\beta 1$, αM und $\beta 2$ mit DAB-Immunocytochemie. Die unstimulierten Kontrollkulturen (KO) zeigten Ramifizierung, deutliche Immunoreaktivität für αM , moderate Anfärbung für $\beta 1$ und $\beta 2$ und eine kaum wahrnehmbare Markierung von $\alpha 5$ und $\alpha 6$. Nach 2-tägiger Inkubation in $5 \mu\text{g/ml}$ LPS deutlichen Anstieg der Integrine $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\beta 1$ und αM sowie Rückgang der $\alpha 6$ -Immunoreaktivität. Auf den kokultivierten Ratten-Astrozytenrasen fand sich keine Integrin-Immunoreaktivität. Maßstabsbalken = $250 \mu\text{m}$.

α M-Integrin-Untereinheit und eine schwächere, aber deutliche Anfärbung für die Integrine α 5, α 6, β 1 und β 2 auf ramifizierter Mikroglia. Die Untereinheiten α 4, α L, α X, β 3, β 4 und β 7 zeigten in Kontrollkulturen keine Anfärbung mit monoklonalen Antikörpern, die in der Lage waren, diese Integrine in anderen Geweben bei gleicher Färbetechnik zu erkennen.

Abbildung 24 (Seite 94) zeigt die vollständige, morphologische Aktivierung der Mikroglia bei einer Dosis von 5 μ g/ml LPS. In Abbildung 25 (Seite 94) ist die Integrin-Immunoreaktivität für die Integrin-Untereinheiten α 4, α 5, α 6, β 1, α M und β 2 nach LPS-Stimulation zu sehen und in Abbildung 26 (Seite 96) quantifiziert. Zwei Tage nach LPS-Exposition zeigte die aktivierte Mikroglia einen 5,7-fachen Anstieg der α 5-Immunoreaktivität, einen 3,1-fachen Anstieg für α 4, einen 2,3-fachen Anstieg für β 1 und einen 1,5-fachen Anstieg der Untereinheit α M. Lediglich die α 6-Anfärbung nahm um 39% statistisch signifikant nach der LPS-Stimulation ab (Abbildung 26, Seite 96; Rohdaten im Anhang). Für alle Integrin-Untereinheiten war die Immunoreaktivität auf den 5% immunoreaktiven, großen, runden, flachen Zellen geringer als auf der ramifizierten Mikrogliazellen in derselben Kultur. Die in dem Kokultursystem anwesenden kokultivierten Astrozyten aus der Ratte zeigten keine Immunoreaktivität für die untersuchten Integrin-Untereinheiten (Abbildung 25, Seite 94).

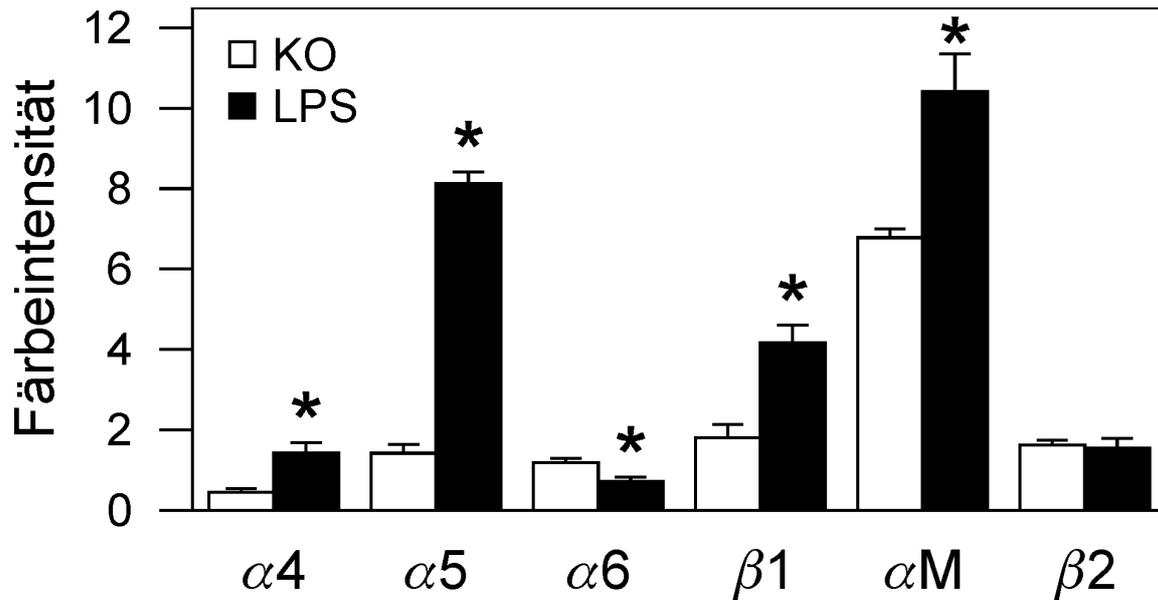


Abbildung 27. Messung des LPS-Effektes auf die Integrin-Immunoreaktivität in Mikroglia-Kokulturen. DAB-Färbeintensität der Integrin-Untereinheiten $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\beta 1$, αM und $\beta 2$ auf ramifizierter Mikroglia in normalen Kokulturen (weiße Balken) und nach 2-tägiger Inkubation in 5 $\mu\text{g/ml}$ LPS (schwarze Balken; MEAN-SD-Algorithmus; Mittelwert \pm Standardfehler; * $p < 0,05$ im ungepaarten, zweiseitigen t-Test gegenüber der unstimulierten Kontrollkultur).

3.2.3 Effekt von Zytokinen und Wachstumsfaktoren auf die ramifizierte Mikroglia

Die posttraumatische Proliferation von Mikroglia im Nucleus facialis zwei Tage nach Axotomie diente als positive Kontrolle für die Immunhistochemie und die ^3H -Thymidin-Markierung mit nachfolgender Autoradiographie für die Proliferationsstudien. Wie in Abbildung 23e,f (Seite 90) gezeigt, lag die autoradiographische Markierung des ^3H -Thymidin zwei Tage nach Fazialis-Durchtrennung ausschließlich auf den Zellkernen $\alpha M\beta 2$ -positiver Mikroglia. In der Zellkultur fand sich zusätzlich vereinzelt auch ^3H -Thymidin-Markierung auf Kernen von $\alpha M\beta 2$ -negativen Zellen der Astrozyten oder der Ratten-Mikroglia, diese Markierung wurde bei der Quantifizierung der Proliferation nicht berücksichtigt.

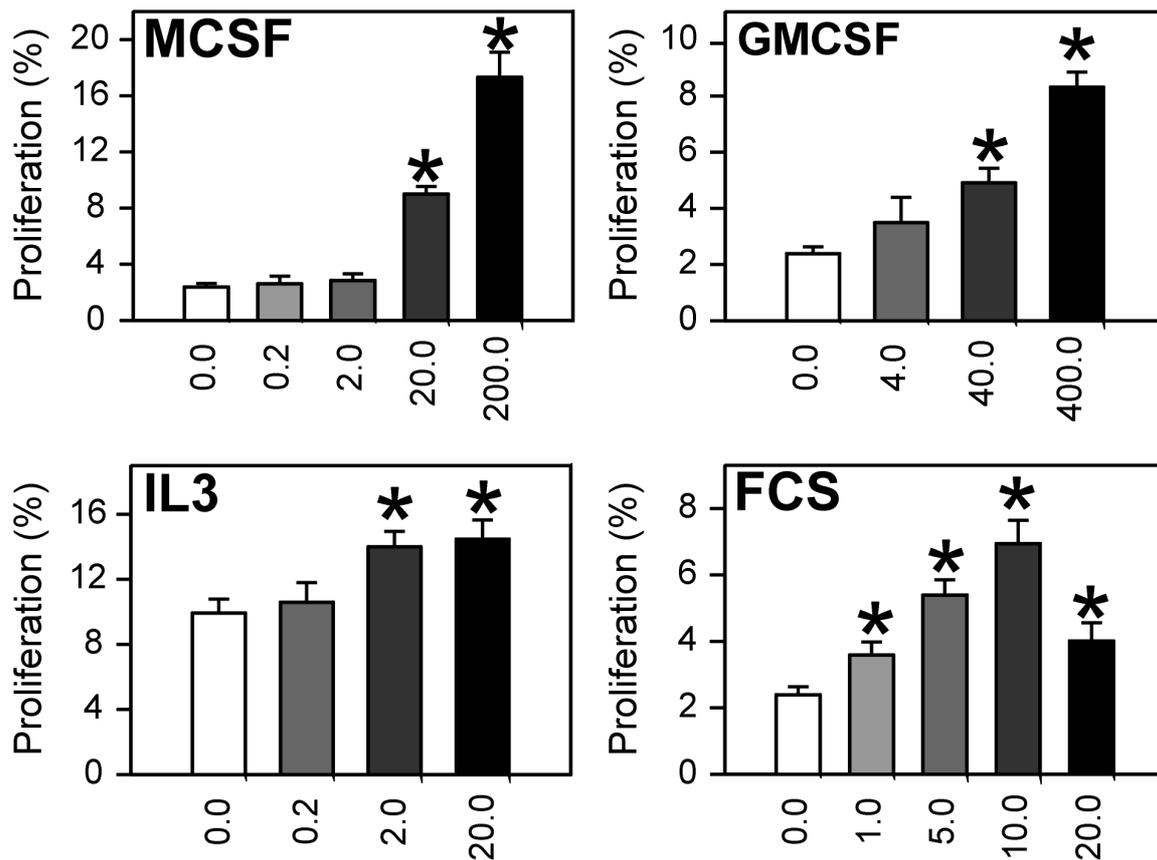


Abbildung 28. Wirkung klassischer Mitogene auf die Mikroglia-Proliferation. MCSF, GMCSF, IL3 und fötales Kälberserum (FCS) stimulieren die proliferation der ramifizierten Mikroglia in Kokultur mit Astrozyten. (Zytokin-Konzentrationen in ng/ml, FCS in Prozent; Mittelwert \pm Standardfehler; * $p < 0,05$ im ungepaarten, zweiseitigen t-Test gegenüber der unstimulierten Kontrollkultur).

3.2.3.1 Proliferation von ramifizierten Mikroglia in Kultur nach Stimulierung

In den Kokulturen von ramifizierter Mikroglia wurde nun die Wirkung verschiedener Zytokine auf die Mikroglia-Proliferation untersucht. Der Zusatz der klassischen Makrophagen-Mitogene Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (MCSF), Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (GMCSF) und Interleukin 3 (IL3) führte unter serumfreien Bedingungen zu einem starken Anstieg der Proliferation ramifizierten Mikroglia (Abbildung 27, Seite 97). Im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollkulturen bewirkte die Stimulation mit 200 ng/ml MCSF einen 7,2-fachen Anstieg der Proliferation, 400 ng/ml GMCSF führten zu einem 3,5-fachen und 20 ng/ml IL3 zu einem 1,5-fachen Anstieg. Fötales Kälberserum (FCS) hatte ebenfalls einen deutlichen, mitogenen Einfluß auf die Mikroglia mit maximaler

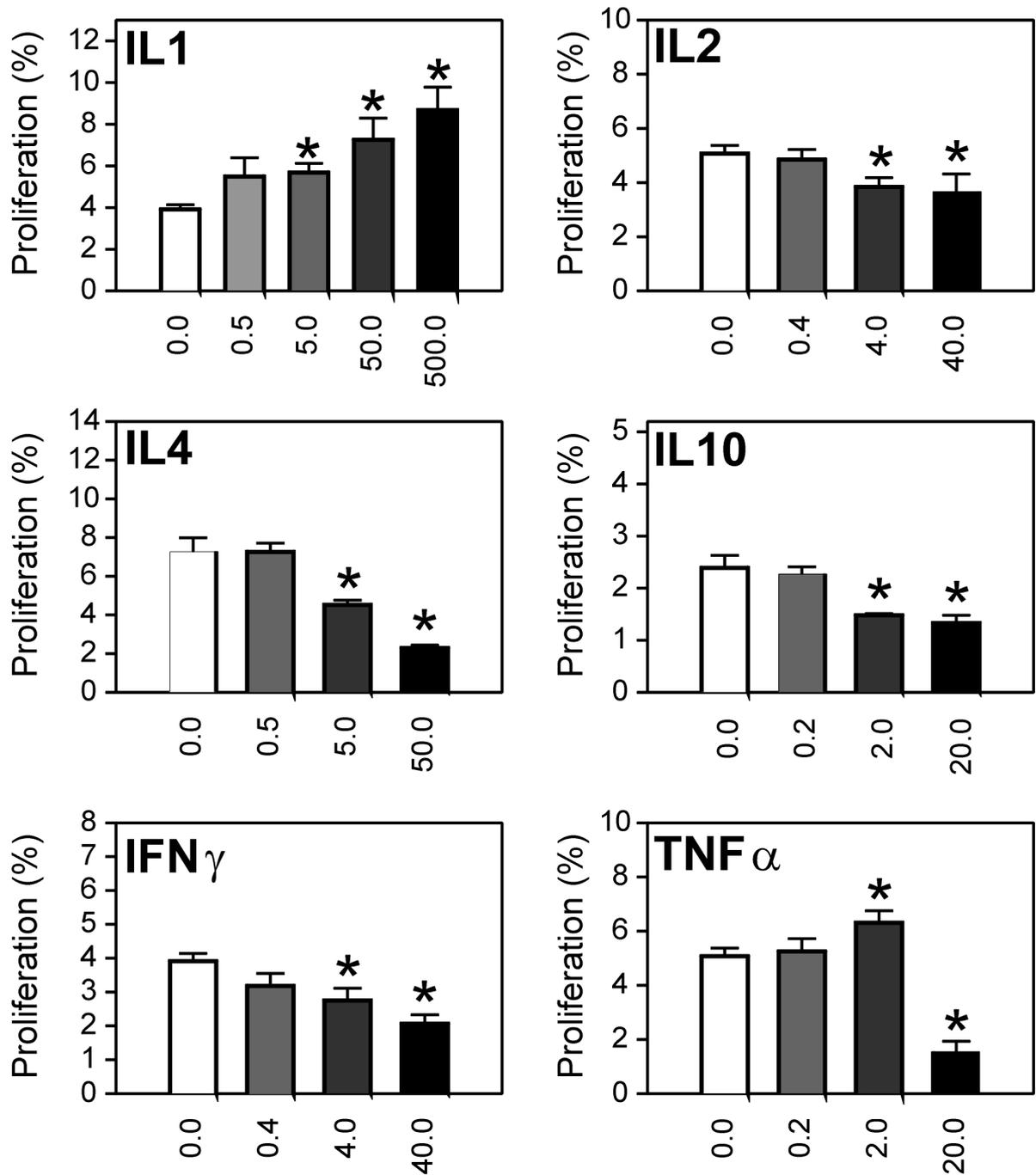


Abbildung 29. Wirkung weiterer Zytokine auf die Mikroglia-Proliferation. Effekt von IL1, IL2, IL4, IL10, TNF α und INF γ auf die mikrogliale Proliferation. Nur IL1 bewirkt einen starken Anstieg des Anteils proliferierender, ramifizierter Mikroglia. Aller anderen Zytokine inhibieren in hohen Konzentrationen die mikrogliale Proliferation. (Zytokin-Konzentrationen in ng/ml; Mittelwert \pm Standardfehler; * bezeichnet $p < 0,05$ im ungepaarten, zweiseitigen t-Test gegenüber der unstimulierten Kontrollkultur).

Stimulation auf die 2,9-fachen Proliferationsrate bei 10% FCS. Höhere Konzentrationen von FCS führten wieder zu einer Abnahme der Proliferation. Um den mitogenen Effekt des

fötalen Kälberserums (FCS) auf die Mikroglia bei dem Studium der anderen Zytokine in vorliegender Arbeit zu vermeiden, wurde bei der Zellkultur auf Zusatz von FCS vor der Stimulation verzichtet und die Zellen in serumfreien Medium gehalten.

Abbildung 28 (Seite 97) zeigt die Wirkung der Interleukine 1β (IL 1β), IL2, IL4, IL10, Interferon- γ (IFN γ) und Tumornekrosefaktor α (TNF α) auf die ramifizierte Mikroglia. Nur IL 1β stimulierte die Proliferation deutlich mit einem 2,4-fachen Anstieg nach 500 ng/ml IL 1β . Die meisten anderen Zytokine inhibierten die Mikroglia. Die Abnahme der Proliferation betrug nach Zugabe von 40 ng/ml IL2 28%, nach 50 ng/ml IL4 68%, nach 20 ng/ml IL10 44% und nach Gabe von 40 ng/ml IFN γ 47%. TNF α hatte in niedrigen Dosen einen leicht mitogenen Effekt (+25% bei 2 ng/ml TNF α), in höheren Konzentrationen inhibierte es aber die Proliferation stark (-70% bei 20 ng/ml TNF α). Die Zugabe von 2 ng/ml IL6 oder 5 ng/ml Leukämie-inhibierenden Faktor (LIF) zeigten einen leichten (+37% bzw. +54%), aber statistisch nicht signifikanten Trend zu einer Stimulation der Mikroglia-Proliferation ($p=0,17$ bzw. 0,09). Bei höheren Konzentrationen war die Wirkung noch geringer.

3.2.3.2 Inhibition der Proliferation durch neutralisierende Antikörper

Von IL1 ist bekannt, daß es astrozytäre Freisetzung einer Reihe von Zytokinen bewirkt (Giulian und Lachman, 1985; Merrill, 1991; Théry et al., 1992). Um festzustellen, ob in dem hier angewandten Kokulturmodell IL1 direkt oder über andere Zytokine wirkt, wurden neutralisierende Antikörper gegen alle vorher identifizierten Mitogene (MCSF, GMCSF und IL3) zu unbehandelten und IL1-stimulierten Kokulturen zugesetzt (Abbildung 29, Seite 100). In den unbehandelten Kokulturen (Abbildung 29a, Seite 100) führten nur die neutralisierenden Antikörper gegen MCSF zu einer signifikanten Reduktion der Proliferation (-27%), Antiseren gegen GMCSF und IL3 bewirkten lediglich eine geringe und statistisch nicht signifikante Abnahme (-12% bzw. -1%). Die gleichzeitige Gabe von anti-MCSF und anti-GMCSF führte zu einer Abnahme von 3% der Ausgangsproliferation bezogen auf anti-MCSF allein. Wurden die Kokulturen nun gleichzeitig mit IL1 und den neutralisierenden Antiseren behandelt (Abbildung 29b, Seite 100), führten Antikörper gegen MCSF und

GMCSF zu einer signifikanten Reduktion der Proliferation (-32% bzw. -42%). Antiseren gegen IL3 konnten auch bei Stimulation mit IL1 die Proliferation nur gering und nicht signifikant senken (-4%). In den IL1-behandelten Kokulturen führte die gleichzeitige Gabe von anti-MCSF und anti-GMCSF zu einer Reduktion der Proliferation um 56%. Bei Gabe dieser beiden Antiseren war das Proliferationsniveau der Mikroglia nach gleichzeitiger IL1-Stimulation etwa gleich groß wie ohne die IL1-Stimulation und ohne neutralisierende Antikörper (2,4% vs. 2,9%; Abbildung 29, Seite 100).

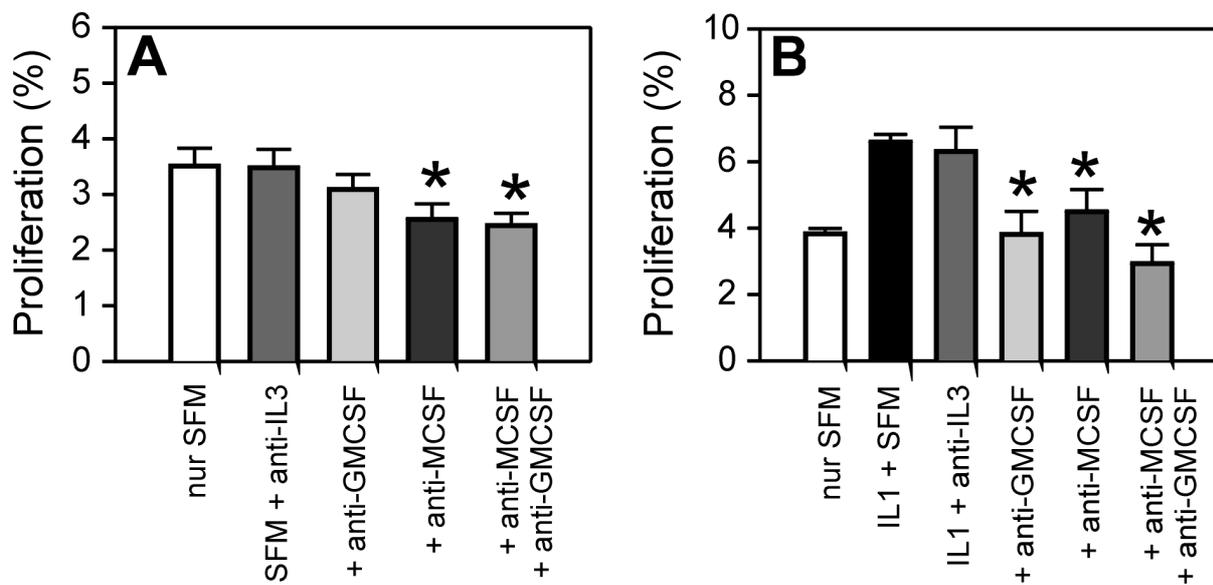


Abbildung 30. Wirkung neutralisierender Antikörper auf die mikrogliale Proliferation. Effekt von Antikörpern gegen MCSF, GMCSF und IL3 (25 ng/ml) auf die mikrogliale Proliferation in unstimulierten (A) und IL1-stimulierten (B) Mikroglia-Astrozyten-Kokulturen. **A.** Nur Antikörper gegen MCSF bewirkten eine signifikante Inhibition der mikroglialen Proliferation in den unstimulierten Kokulturen. **B.** Bei Stimulation mit 500 ng/ml IL1 wurde die mikrogliale Proliferation ebenfalls von GMCSF-Antikörpern behindert. Antikörper gegen IL3 hatten keinen Effekt. (SFM = serumfreies Medium; Mittelwert \pm Standardfehler; * $p < 0,05$ im ungepaarten, zweiseitigen t-Test gegenüber den Kontrollkulturen ohne Antikörperzusatz).

3.2.3.3 Morphologie der Zytokin-stimulierten Mikroglia

Interessanterweise führte im Gegensatz zu LPS keiner der zugesetzten Faktoren, MCSF, GMCSF, IL1, IL2, IL3, IL4, IL6, IL10, IFN γ , TNF α oder FCS zu einer deutlichen morphologischen Umwandlung der Mikroglia. Vielmehr behielten die α M β 2-positiven Zellen ihre kleinen Zellkörper, ihre schlanken Zellausläufer mit der distalen Ramifizierung bei. Insbesondere konnte keine morphologische Umwandlung zu Makrophagen induziert werden.

4 Diskussion

Die vorliegende Arbeit untersucht die molekulare Regulation von Integrinen und der Proliferation bei der Mikroglia-Aktivierung im verletzten, zentralen Nervensystems und in stimulierten Zellkulturen.

4.1 Integrine im normalen Nucleus facialis und nach Axotomie

Der erste Teil der Arbeit beschreibt die zelluläre Lokalisation der Integrine im normalen ZNS und ihre Veränderung nach Durchtrennung des Fazialis-Nerven. Diese reversible, neuronale Verletzung führte zu einem starken Anstieg verschiedener Integrin-Untereinheiten auf Neuronen, Mikroglia, Gefäßendothelien und Lymphozyten in betroffenen Nucleus facialis mit jeweils charakteristische Zeitverläufe. Axotomierte Neuronen exprimierten die $\beta 1$ -Integrin-Untereinheit. Aktivierte Mikroglia in der Umgebung zeigte zu verschiedenen Zeitpunkten einen Anstieg der Integrine $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$, $\alpha M\beta 2$ und $\alpha X\beta 2$. $\alpha L\beta 2$ -, $\alpha 4$ -, $\beta 1$ - und $\beta 7$ -positive Lymphozyten invadierten den axotomierten Nucleus facialis zum Zeitpunkt des späten neuronalen Todes mit einem Maximum 14 Tage nach der Axotomie (Möller et al., 1996; Raivich et al., 1998b). Der neuronale Zelltod und die Leukozyteneinwanderung wurden von einem Anstieg des $\alpha 5\beta 1$ -Integrins auf den Gefäßendothelien begleitet. Astrozyten zeigten im Nucleus facialis keine Immunreaktivität für Integrine, auf Astrozyten nahe der Glia limitans fand sich aber die $\beta 1$ -Untereinheit und auf zerebellärer Bergmann-Glia zusätzlich noch $\alpha 4$ -Immunreaktivität.

4.1.1 Milz und Fazialis-Kern zum Nachweis der Integrin-Expression

Leukozyten exprimieren eine große Anzahl von Integrinen, die für ihre Funktion eine essentielle Rolle spielen (Larson und Springer, 1990; Hemler, 1990; Etzioni, 1994; Mazzone und Ricevuti, 1995; Rozdzinski und Tuomanen, 1995; Stewart und Hogg, 1996; Gahmberg et al., 1997; Newton et al., 1997; Wei et al., 1997). Die Milz enthält sehr viele Integrin-exprimierenden Leukozyten und kann deshalb als gute Positivkontrolle dienen, um den Färbeerfolg und die Spezifität der Integrin-Immunreaktivität zu belegen. Alle Antikörper in

dieser Studie, die Immunoreaktivität im normalen oder verletzten ZNS nachwies, erkannten die Integrine auch in der Milz. Auf der anderen Seite argumentiert die erfolgreiche Detektion von $\beta 3$ - und $\beta 4$ -Integrin-Immunoreaktivität in der Milz und ihr gleichzeitiges Fehlen im normalen oder verletzten Gehirn dagegen, daß es sich bei der ausgebliebenen Färbung um ein technisches Problem handelt, sondern legt nahe, daß diese Integrine im Gehirn nicht vorkommen.

Im ersten Teil dieser Arbeit war die initiale Fragestellung, die Integrin-Expression auf hirneigenen Zellen zu untersuchen. Ein Problem bei den meisten Modellen der ZNS-Verletzung (wie direktes Trauma, Ischämie, Infektion und Enzephalomyelitis) ist aber der frühe Einstrom von Blutmakrophagen, der nur schwer von der seßhaften, aktivierten Mikroglia unterschieden werden können (Perry und Gordon, 1988; Williams et al., 1992; Dickson et al., 1993; McGeer et al., 1993; Lassmann et al., 1994; Kreutzberg, 1996). Hier bietet die Fazialis-Durchtrennung eine Reihe von Vorteilen (siehe auch Tabelle VI, Seite 39). Wegen der Distanz zwischen Läsion und Nucleus facialis, kommt es zu keiner Einwanderung von Blutmakrophagen oder Permeabilitätssteigerung der Blut-Hirn-Schranke für Serumproteine (Kreutzberg, 1996; Raivich et al., 1998b). Dieses Modell ermöglicht damit das Studium der spezifischen Aktivierung der endogenen Mikroglia. Ferner ist es für die gut charakterisierte Folge von Zellveränderungen bekannt, die zu erfolgreicher, neuronaler Regeneration führen kann (Sinatra und Ford, 1979; Soreide, 1981a, b; Vaughan, 1990; Ito und Kudo, 1994; Raivich et al., 1996; Kreutzberg, 1996; Guntinas-Lichius et al., 1996; Ferri et al., 1998). Auf der anderen Seite tritt aber im Nucleus facialis der erwachsenen Maus auch neuronaler Zelltod auf (Torvik und Skjörten, 1971; Torvik und Soreide, 1975; Möller et al., 1996), was mit dem Einstrom von Lymphozyten und ihrer Aggregation an Mikroglia-Knötchen assoziiert ist (Raivich et al., 1998b; Werner et al., 1998). Welche Moleküle hierbei Proliferation, Migration, Adhäsion und Interaktion der Zellen im verletzten, zentralen Nervensystem steuern, ist noch weitgehend ungeklärt.

4.1.2 Neuronale Integrine

4.1.2.1 Monophasischer Anstieg von β 1-Integrinen auf Motoneuronen

Auf den Neuronen konnte in dieser Arbeit nur Immunoreaktivität für die β 1-Integrin-Untereinheit (CD29) nachgewiesen werden, die bereits im normalen Gehirn vorhanden war und in den verletzten und regenerierenden Motoneuronen stark anstieg (Abbildung 13, Seite 74). Die Hochregulation des β 1-Integrins war zeitlich mit dem Beginn der axonalen Regeneration assoziiert (Bisby, 1988; Taskinen et al., 1995), und deutliche Immunoreaktivität für die β 1-Integrin-Untereinheit konnte auf Wachtstumskegeln der Axonaussprossungen im verletzten Nucleus facialis und dem intrazerebralen Anteil des Nervus facialis beobachtet werden, ein ähnliches Phänomen existiert auch im peripheren Nerven (Werner et al., 2000). *In vitro* sind β 1-Integrine an das Zytoskelett am vorderen Rand der Wachtstumskegels gekoppelt (Schmidt et al., 1995) und essentiell für die neuronale Adhäsion und das Neuritenwachstum auf Laminin (Wang et al., 1992; McKerracher et al., 1996). Nach peripherer Transektion des Nerven führt die Wallersche Degeneration distal zum Zerfall der diskonnektierten Axone und des zugehörigen Myelins, gefolgt von der Überbrückung der Lücke zwischen proximalem und distalem Nervenstumpf mit proliferierenden Schwanzzellen und Fibroblasten. Diese Zellen bilden eine lamininreiche Matrix für das Einsprossen der Axone durch das röhrenartige Basalmembrangerüst in den distalen Teil des Nerven. Von verschiedenen Lamininformen ist bekannt, daß sie auf der Oberfläche der denervierten Schwanzzellen akkumulieren, die innere, dem axonalen Wachtstumskegel zugewandte Seite der Basalmembran auskleiden und dort eine wichtige permissive Funktion für die axonale Regeneration haben (Westerfield, 1987; Kuecherer-Ehret et al., 1990; Letourneau et al., 1992; Agius et al., 1996; Luckenbill-Edds, 1997).

4.1.2.2 Neuronale β 1-Integrin-Rezeptoren für Laminin bei der Regeneration

Bisher sind fünf Integrine der β 1-Familie beschrieben, die Laminin binden und die auf Neuronen vorkommen, α 1 β 1, α 2 β 1, α 3 β 1, α 6 β 1 und α 7 β 1 (Tomaselli et al., 1993;

McKerracher et al., 1996; Powell und Kleinman, 1997; Luckenbill-Edds, 1997). Die fehlende Nachweisbarkeit neuronaler Expression der β 1-assoziierten Untereinheiten α 4, α 5 und α 6 mit fünf verschiedenen, monoklonalen Antikörpern spricht gegen ihre Beteiligung an der neuronalen Regeneration im Nucleus facialis. Obwohl das α 5-Integrin in Motoneuronen des Rattenrückenmarkes beschrieben worden ist, spricht die prominente, nukleäre Anfärbung in der betreffenden Studie gegen eine spezifische Reaktion mit dem angewandten, polyklonalen Antikörper (Grooms und Jones, 1997). Im Lichte der vorliegenden Studie, sind noch die Integrine α 1 β 1, α 2 β 1, α 3 β 1 und α 7 β 1 Kandidaten für den Lamin-Rezeptor auf regenerierenden Neuronen. *In vitro* interferieren neutralisierende Antikörper gegen das Integrin α 3 β 1 und in geringerem Maße auch gegen α 1 β 1 mit dem Auswachsen von Neuriten auf Laminin (Tomaselli et al., 1993). Interessanterweise ist das α 3 β 1-Integrin auch an der Neuritenausprossung auf Thrombospondin und Tenascin beteiligt (DeFreitas et al., 1995). Diese beiden Moleküle der extrazellulären Matrix (EZM) sind im verletzten, peripheren Nerven vorhanden und könnten bei der neuralen Regeneration involviert sein (Hoffman et al., 1994; Fruttiger et al., 1995). Das Fehlen von monoklonalen Antikörpern gegen die restlichen erwähnten α -Untereinheiten könnte z.B. mit Studien auf der mRNA-Ebene überprüft werden, um die an der Neuroregeneration beteiligten Integrine zu identifizieren. Interessanterweise fand sich in einer Studie mit einem polyklonalen Antikörper ein starker Anstieg des α 7-Integrins auf regenerierenden Motoneuronen und Wachstumskegeln nach Fazialis-Durchtrennung, und genetisch für die α 7-Untereinheit defiziente Mäuse zeigten eine deutlich verzögerte Auswachsgeschwindigkeit der regenerierenden Axone (Werner et al., 2000). Diese Arbeit deutet also darauf hin, daß der α 7 β 1-Lamin-Rezeptor eine funktionelle Rolle bei der Neuroregeneration hat. Sie schließt aber eine Beteiligung der anderen diskutierten β 1-Laminin-Rezeptoren nicht aus.

4.1.3 Integrine auf aktivierter Mikroglia

4.1.3.1 Integrine bei der stadienspezifischen Mikroglia-Aktivierung

Die Aktivierung der Mikroglia im ZNS verläuft in verschiedenen Aktivierungsstadien (siehe auch 1.3.1.3; Tabelle III, Seite 22; Abbildung 3, Seite 17; Raivich et al., 1999). Die Mikroglia verändert ihre Morphologie mit einer Hypertrophie des Zellkerns und der proximalen Fortsätze und einem Verlust der distalen Ramifikation (Stadium 1, Alarm), gefolgt von Proliferation, der Adhäsion an neuronale Zellkörper (Stadium 2, Zielfindung und Adhäsion) und dem Entfernen der synaptischen Boutons ("synaptic stripping"; Blinzinger und Kreuzberg, 1968). Im Nucleus facialis der Maus hat der neuronale Zelltod 14 Tage nach der Axotomie ein Maximum und führt zum Auftreten phagozytischer Mikroglia (Stadium 3a, Phagozytose), die den neuronalen Debris entfernt, begleitet von einer massiven Induktion proinflammatorischer Zytokine, die die benachbarte Mikroglia aktivieren können (Stadium 3b, Umgebungsaktivierung; Raivich et al., 1998a, b; Werner et al., 1998). Die vorliegende Studie beschreibt nun eine ganze Reihe von Integrinen, wie $\alpha4\beta1$, $\alpha5\beta1$, $\alpha6\beta1$, $\alpha M\beta2$ und $\alpha X\beta2$, die auf der aktivierten Mikroglia hochreguliert werden und deren charakteristischer Zeitverlauf mit der frühen Aktivierung im Alarm-Stadium ($\alpha M\beta2$), der Zielfindung und Adhäsion ($\alpha5\beta1$, $\alpha6\beta1$) und der Umgebungsaktivierung ($\alpha4\beta1$, $\alpha M\beta2$) einhergeht. Alle Integrine außer $\alpha4\beta1$ wurden auch auf phagozytischen Mikroglia hochreguliert. Interessanterweise stehen das Fehlen einer Expression von $\alpha L\beta2$ und der Nachweis von $\alpha4\beta1$ auf ramifizierten, nicht-phagozytischen Mikroglia im Kontrast zu Studien im Rattenhirn (Moneta et al., 1993; Hailer et al., 1997) und deuten auf eine Spezies-spezifische Regulation dieser Zelladhäsionsmoleküle nach Verletzung und bei der Regeneration hin.

Tabelle XII (Seite 106) faßt die Integrin-Expressionsmuster zu den verschiedenen Stadien der Mikroglia-Aktivierung im Nucleus facialis nach Axotomie zusammen (vgl. Tabelle III, Seite 22). Jedes Stadium ist mit der Regulation bestimmter Mikroglia-Integrine assoziiert. Umgekehrt läßt sich auch vom Expressionsmuster der Integrine auf der Mikroglia auf ihren Aktivierungszustand schließen und ermöglicht damit ein einfaches immunhistochemisches

Staging des Mikroglia-Aktivierungszustandes.

Tabelle XII. Integrin-Expression zu den verschiedenen Stadien der Mikroglia-Aktivierung

	Stadium	Integrine	andere Marker
0	Normales Gehirn	$\alpha M\beta 2$	Fc γ R, IgG
1	Alarm	$\alpha M\beta 2 \uparrow$	IgG \uparrow , $\alpha M\beta 2 \uparrow$, ICAM1 \uparrow , Tsp \uparrow
2	Zielfindung & Adhäsion	$\alpha 5\beta 1 \uparrow$, $\alpha 6\beta 1 \uparrow$	MCSFR \uparrow , MHC1 \uparrow , B7.2 \uparrow , Vim \uparrow
3a	Phagozytose	$\alpha X\beta 2 \uparrow$, $\alpha M\beta 2 \uparrow$, $\alpha 5\beta 1 \uparrow$, $\alpha 6\beta 1 \uparrow$	MHC1 \uparrow , B7.2 \uparrow , IgG \uparrow , ICAM1 \uparrow , Tsp \uparrow
3b	Umgebungsaktivierung	$\alpha 4\beta 1 \uparrow$, $\alpha M\beta 2 \uparrow$	MHC1 \uparrow , B7.2 \uparrow , ICAM1 \uparrow

vgl. Tabelle III (Seite 22), modifiziert nach Raivich et al., 1999

4.1.3.2 Biphasischer Anstieg von $\alpha M\beta 2$

Im Mäusehirn konnte als erstes ein Anstieg der Immunoreaktivität für das $\alpha M\beta 2$ -Integrin (CD11b/CD18, CR3, Mac-1) beobachtet werden. Obwohl eine ähnlich starke Zunahme dieses Glykoproteins nach Axotomie schon früher beschrieben worden ist (Graeber et al., 1988a; Eriksson et al., 1993), war nicht klar, ob der Anstieg der $\alpha M\beta 2$ -Färbeintensität nach Verletzung nur durch die massive Proliferation der Mikroglia zustande kam oder ob auch die einzelne Mikrogliazelle auf ihrer Membran die Dichte des $\alpha M\beta 2$ -Proteins erhöht. Dieser Unterschied ist aber erheblich, weil die Einzelzelle über die Rezeptordichte ihre Adhäsionseigenschaften verändert und dadurch erst die Funktion der Mikroglia im verletzten ZNS reguliert wird. In dieser Studie zeigt die Messung der $\alpha M\beta 2$ -Immunoreaktivität auf zuvor durch Fluoreszenzdoppelmarkierung identifizierten Mikrogliazellen bereits an Tag 1 ein Maximum, obwohl die Gesamtimmunoreaktivität für $\alpha M\beta 2$ im axotomierten Nucleus facialis erst am Tag 7 ihren Gipfel erreicht (vgl. Abbildung 15, Seite 76 mit Abbildung 19, Seite 83). Diese frühe Induktion von $\alpha M\beta 2$ am Tag 1 geht dem Beginn der Mikroglia-Proliferation zwischen Tag 1 und Tag 2 nach Axotomie unmittelbar voraus (Raivich et al., 1994) und deutet auf eine Beteiligung des $\alpha M\beta 2$ -Integrins am schnellen Alarmsystem der Mikroglia-Aktivierung hin (Stadium 1, Alarm). Interessanterweise ist das interzelluläre

Adhäsionsmolekül 1 (ICAM1), der Hauptligand von $\alpha M\beta 2$, ebenfalls auf der Mikroglia exprimiert und wird mit einem nahezu identischen Zeitverlauf nach Fazialis-Durchtrennung reguliert, mit einem frühen Gipfel am Tag 1 und einen späten um Tag 14 (Werner et al., 1998). Diese simultane Hochregulation des Rezeptors und seines Liganden auf der Mikroglia ist Basis für eine stärkere Adhäsion zwischen Mikrogliazellen und könnte durch Zusammenarbeit die synaptische Deafferenzierung oder die Phagozytose erleichtern. ICAM1 auf infiltrierenden Leukozyten (Werner et al., 1998) kann ferner zum Kontakt zwischen Immunsystem und Gehirnparenchym beitragen und die Antigenpräsentation erleichtern.

4.1.3.3 Anstieg von $\alpha 5\beta 1$ und $\alpha 6\beta 1$ bei der Zielfindung und Adhäsion

Im Gegensatz zu den $\alpha M\beta 2$ -Integrin, zeigen die α -Untereinheiten des Integrins $\alpha 5\beta 1$ (CD49e/CD29, VLA-5) und $\alpha 6\beta 1$ (CD49f/CD29, VLA-6) einen langsameren, graduellen Anstieg mit einem Maximum um Tag 4. Zu dieser Zeitpunkt werden die verletzten Neurone von den umgebenden Mikroglia eingeschlossen und die afferenten Synapsen von der Oberfläche der axotomierten Neurone entfernt (Stadium 2, Zielfindung und Adhäsion). Obwohl auch die Mikroglia $\beta 1$ -positiv ist, ist die neuronale Färbung viel stärker (Abbildung 13, Seite 74) und der Anstieg der $\beta 1$ -Immunoreaktivität mit seinem Maximum am Tag 14 hauptsächlich auf die neuronale Induktion zurückzuführen (Abbildung 15, Seite 76). Sowohl $\alpha 5\beta 1$ als auch $\alpha 6\beta 1$ sind Rezeptoren für Moleküle der extrazellulären Matrix (EZM): $\alpha 5\beta 1$ für Fibronectin und $\alpha 6\beta 1$ für Laminin. Diese beiden Liganden spielen eine Rolle in der embryonalen Entwicklung und tauchen in der Neuroregeneration wieder auf (Egan und Vijayan, 1991; Lefcort et al., 1992; Brodkey et al., 1993; Pasinetti et al., 1993). Eine gleichzeitige Hochregulation von Laminin und Fibronectin auf verletzten Neuronen (Le Beau et al., 1995; Kerber et al., 1997) und ihren Rezeptoren $\alpha 6\beta 1$ und $\alpha 5\beta 1$ auf der umgebenden Mikroglia könnte für die Mikroglia-Adhäsion an die Neurone während des "synaptic stripping" (Zielfindung und Adhäsion) aber auch für die spätere Phagozytose wichtig sein. Interessanterweise üben Fibronectin und Laminin *in vitro* gegenteilige Effekte auf die Differentierung der Mikroglia aus. Während Laminin die Umwandlung von Mikroglia zu

Makrophages begünstigt, führt Fibronectin zu einer Reduktion der Makrophagen-assoziierten Eigenschaften wie Phagozytose, Esteraseaktivität und Superoxidanionen-Produktion und induziert eine ramifizierte Morphologie (Chamak und Mallat, 1991; Varner et al., 1995). Ebenso führt eine Inhibition der $\alpha 5\beta 1$ -Bindung an Fibronectin mit RGD-Tripeptiden *in vitro* zu einer Reduktion der Ramifizierung der Mikroglia (Tanaka und Maeda, 1996). In der vorliegenden Arbeit folgt die Regulation der Integrine $\alpha 5\beta 1$ und $\alpha 6\beta 1$ auf der Mikroglia einem nahezu identischen Zeitverlauf mit einem Maximum am Tag 4 nach Fazialis-Durchtrennung. Dieser simultane Anstieg von den scheinbar gegensätzlich wirkenden Rezeptoren $\alpha 5\beta 1$ und $\alpha 6\beta 1$ deutet auf die feine Balance der Rezeptor-Liganden-Interaktion hin, die bei der Regulation der Morphologie und der Funktion der Mikroglia wichtig sein kann.

4.1.3.4 Integrine auf Mikroglia bei der Phagozytose

Die phagozytische Mikroglia zeigt eine besonders hohe Expression von verschiedenen Integrinen (Akiyama und McGeer, 1990; Möller et al., 1996; Raivich et al., 1998a). Das Integrin $\alpha X\beta 2$ (CD11c/CD18, p150,95) war ausschließlich auf den phagozytischen Zellen lokalisiert (Abbildung 16, Seite 78). Immunoreaktivität für die $\alpha 5\beta 1$ -, $\alpha 6\beta 1$ - und $\alpha M\beta 2$ -Integrine war ebenfalls stärker auf den Mikroglia-Knötchen als auf der umliegenden, ramifizierten Mikroglia. Die Phagozytose geht mit der Induktion von Makrophagen-Aktivationsmarkern einher (Streit et al., 1988; Kreutzberg, 1996; Hailer et al., 1997; Raivich et al., 1999). Der Anstieg der Immunoreaktivität für $\alpha M\beta 2$, $\alpha X\beta 2$, $\alpha 5\beta 1$ und $\alpha 6\beta 1$ auf der Mikroglia könnte diesen Prozeß reflektieren, aber gleichzeitig auch die Adhäsion, Endozytose und Degradation des zellulären Debris erleichtern. Interessanterweise ist der Neuronenuntergang im axotomierten Nucleus facialis der Maus von der Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie Interleukin 1, Tumornekrosefaktor- α und Interferon- γ begleitet (Raivich et al., 1998b). Diese löslichen Zytokine könnten lokal diffundieren und die umgebende, nicht-phagozytische Mikroglia und Gefäßendothelien aktivieren (Umgebungsaktivierung, Stadium 3b). Die aktivierte Mikroglia zeigt einen Anstieg in der $\alpha M\beta 2$ -Expression, von Tag 14 bis Tag 42 nach Fazialis-Durchtrennung (Abbildung 19, Seite

83), der mit einem zweiten Anstieg von ICAM1 (Werner et al., 1998) und erstmaligen Auftreten von $\alpha 4$ -Immunoreaktivität auf der Mikroglia einhergeht (Abbildung 16, Seite 78). In dieser Situation, könnte die lokale Wirkung der proinflammatorischen Zytokine die Phagozytose erleichtern, andererseits aber die Entzündungsreaktion mit nachfolgenden Gewebsschaden verstärken.

4.1.4 Integrine auf Astrozyten

Das Fehlen von Integrinen auf protoplasmatischen und reaktiven Astrozyten im axotomierten Nucleus facialis in vorliegender Arbeit bildet einen Kontrast zu dem Integrin-Nachweis auf den umliegenden Neuronen, Mikrogliazellen und Gefäßendothelien. Im Pavian konnte das Laminin-bindende Integrin $\alpha 6\beta 4$ auf den perivaskulären Endfüßen der Astrozytenfortsätze in der grauen Substanz nachgewiesen werden (Wagner et al., 1997). Es ist möglich, daß in der Maus diese Laminin-Rezeptorfunktion auf die 5'-Nukleotidase (Zimmermann et al., 1993) oder Dystroglykan (Tian et al., 1996) übergegangen ist. Im Gegensatz zu den Astrozyten in der grauen Substanz zeigen die fibrillären Astrozyten in Nähe der Glia limitans und stärker noch die zerebelläre Bergmann-Glia deutliche $\beta 1$ -Expression. Die EZM-bindenden $\beta 1$ -Integrine sind oft in sogenannten fokalen Adhäsionspunkten ("focal adhesions points") zusammengezogen und die Inhomogenität der Verteilung der Astrozytenimmunoreaktivität für $\beta 1$ könnte diese Organisation widerspiegeln (Abbildung 17, Seite 79; Grooms et al., 1993). Obwohl sich in vorliegender Studie nur die $\alpha 4$ -Untereinheiten als möglicher, astrozytärer Bindungspartner für $\beta 1$ fand, zeigen Astrozyten *in vitro* Expression der $\beta 1$ -Integrine $\alpha 1, \alpha 2, \alpha 3$ und αV (Aloisi et al., 1992a; Paulus et al., 1993; Tawil et al., 1994; Yamazaki et al., 1997) und *in vivo* könnten diese α -Untereinheiten mit $\beta 1$ funktionale Integrine bilden. Jedenfalls verdeutlicht der Unterschied in der Expression der $\beta 1$ -Integrin-Untereinheit die Diversität protoplasmatischer und fibrillärer Astrozyten in der grauen und weißen Substanz und deutet auf verschiedene Adhäsionsmechanismen der Astrozyten im adulten Gehirn hin.

4.1.5 Integrine auf Leukozyten

Extravasation von Lymphozyten ist eine wichtige Komponente der zellulären Antwort im axotomierten Nucleus facialis. Die vorliegende Studie zeigt die Einwanderung von α L β 2-, α 4 β 1- und α 4 β 7-immunoreaktiven Lymphozyten, deren Zahl am Tag 14 maximal wurde. Gleichartige Befunde konnten auch für CD3-, CD43- und CD44-immunoreaktive T-Lymphozyten erhoben werden (Raivich et al., 1998b). Diese Einwanderung ist lymphozytenspezifisch, es finden sich keine Makrophagen oder Granulozyten, noch kommt es zu einer Verletzung der Blut-Hirn-Schranke (Rieske et al., 1989; Kreutzberg, 1996; Raivich et al., 1998b). Alle drei Integrine, α L β 2 (CD11a/CD18, LFA-1), α 4 β 1 (CD49d/CD29, VLA-4) und α 4 β 7 (LPAM-1) spielen eine wichtige Rolle in der lymphozytären Biologie (Baron et al., 1993; Luscinskas und Lawler, 1994; Berlin et al., 1995; Greenwood et al., 1995; Springer, 1995). Sowohl α 4 β 1 als auch α 4 β 7 können endotheliales VCAM binden und damit das initiale Lymphozytenrollen an der luminalen Endothelseite stoppen, der erste Schritt der Leukozytenextravasation. Das Integrin α 4 β 7 besitzt jedoch eine höhere Affinität zu dem "mucosal addressing cell adhesion molecule" (MAdCAM) und aggregiert vorzugsweise in Peyerschen Plaques (Wagner und Müller, 1998; Yang et al., 1998; Kunkel et al., 1998). Bei der experimentellen Autoimmunenzephalitis scheint das α 4 β 7-Integrin für die Leukozyteninvasion in das Gehirn nicht notwendig zu sein (Engelhardt et al., 1995, 1998). Die Einwanderung von vereinzelt α 4 β 7-positiven Lymphozyten in den axotomierten Nucleus facialis in vorliegender Studie zeigt jedoch, daß dieses Integrin kein Hindernis für die Extravasation ins Gehirnparenchym darstellt. Dennoch tragen weitaus mehr Lymphozyten das α 4 β 1-Heterodimer, so daß diesem Rezeptor wohl die größere Bedeutung bei der Extravasation zukommt. Die Interaktion von lymphozytären α L β 2 mit vaskulärem ICAM1 oder verwandten Moleküle verstärkt die Adhäsion weiter und partizipiert so ebenfalls im Extravasationsprozeß. Im verletzten ZNS der Maus kann zusätzlich die Bindung von α L β 2 an ICAM1 auf den Mikroglia-Knötchen die Antigenpräsentation dieser MHC-tragenden, residenten Gehirnmakrophagen vereinfachen (Streit et al., 1988; Lassmann et al., 1994;

Kreutzberg, 1996; Werner et al., 1998).

4.1.6 Integrine auf Gefäßendothelien

Wie in dieser Studie gezeigt, wurde der neuronale Zelltod, die phagozytische Umwandlung der Mikroglia und die Einwanderung von Lymphozyten am Tag 14 nach Fazialis-Durchtrennung von einem Anstieg der Immunoreaktivität für das $\alpha 5$ -Immunoreaktivität auf Gefäßendothelien begleitet. Für die Immunoreaktivität der Integrin-Untereinheiten $\alpha 6$ und $\beta 1$ zeigte sich ebenfalls ein Anstieg, der jedoch statistisch nicht signifikant war. Von proinflammatorischen Zytokinen ist bekannt, daß sie endotheliale Zelladhäsionsmoleküle induzieren können (Swerlick et al., 1991; Jiang et al., 1997; Kim und Yamada, 1997), und der Anstieg von $\alpha 5\beta 1$ kann Teil dieser Entzündungsreaktion sein. Integrine finden sich sowohl auf der der luminalen als auch auf der basalen Zellmembran (Conforti et al., 1992; Navratil et al., 1997). An der Basalseite können sie an viele Basalmembranmoleküle wie Laminin, Kollagen und Fibronectin binden (Webersinke et al., 1992). Ferner kann spekuliert werden, daß das luminaire $\alpha 5\beta 1$ -Integrin an einer Interaktion mit fibronectinartigen Domänen auf zirkulierenden Leukozyten und ihrer posttraumatischen Extravasation beteiligt ist.

4.1.7 Integrine im axotomierten Nucleus facialis

Zusammenfassend zeigt der erste Teil dieser Arbeit die zelluläre Lokalisation von Zelladhäsionsmolekülen der $\beta 1$ - und $\beta 2$ -Integrinfamilie im normalen und im regenerierenden zentralen Nervensystem der Maus (Tabelle XIII, Seite 112). Die posttraumatischen Veränderungen der Integrin-Expression können zu veränderter Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktion führen und so eine Rolle bei der axonalen Regeneration wie auch bei der Adhäsion zwischen Neuronen, Mikroglia und Lymphozyten während der Reparaturvorgänge im verletzten Gehirn spielen. Spezifische Einflußnahme auf diese Zelladhäsionsmoleküle könnte Licht auf ihre Funktion im verletzten ZNS werfen.

Tabelle XIII. Zusammenfassung der zellulären Lokalisation von β 1- und β 2-Integrinen im normalen und verletzten Nucleus facialis

Zelltyp	Normaler Hirnstamm	Axotomierter Nucleus facialis (Tag der maximalen Immunoreaktivität)
Neurone	α 7 [†] β 1	α 7 [†] β 1 \uparrow (Tag 14)
Mikroglia	α M β 2	α M β 2 \uparrow (Tag 1 und Tag 7-21) α 5 β 1 \uparrow , α 6 β 1 \uparrow (Tag 4) α 4 β 1 \uparrow , α X β 2 \uparrow (Tag 14)
Astrozyten (graue Substanz)	–	–
Astrozyten (weiße Substanz)	α 4 β 1	nicht vorhanden
Gefäßendothelien	α 5 β 1, α 6 β 1	α 5 β 1 \uparrow , α 6 β 1 (Tag 14)
Lymphozyten	nicht vorhanden	α L β 2, α 4 β 1, α 4 β 7 (Tag 14)

Ergebnisse dieser Studie; [†]Werner et al., 2000

4.2 Proliferation ramifizierter Mikroglia in Zellkultur

Neben der Modulation der Integrin-Zelladhäsionsmolekülen ist die Proliferation ein zentraler Bestandteil der frühen Reaktion der Mikroglia auf Verletzung des zentralen Nervensystems (Graeber et al., 1988c). Bereits ein bis zwei Tage nach Fazialis-Durchtrennung beginnt die den verletzten Neuronen benachbarte, ramifizierte Mikroglia sich zu vermehren (Raivich et al., 1994). Bisher ist nur wenig darüber bekannt, wie diese Proliferation der ramifizierten Mikroglia ausgelöst und gesteuert wird. In dieser Arbeit wurden deshalb die Effekte verschiedener Zytokine auf die Proliferation der ramifizierten Mikroglia untersucht.

Die ramifizierte Mikroglia in vorliegender Studie behält auch bei Kultur in serumfreien Medium die Fähigkeit zur Proliferation bei. Unter diesen Bedingungen stimulieren die gut bekannten Makrophagen-Mitogene MCSF, GMCSF und IL3 die Mikroglia-Proliferation stark. Von den anderen Zytokine hatten die meisten (IL2, IL4, IL10, IFN γ und TNF α) einen inhibierenden Effekt, nur IL1 steigerte die Proliferation. Die Stimulation durch IL1 war aber indirekt und konnte mit Antikörpern gegen MCSF und GMCSF blockiert werden, vereinbar mit früheren Studien, wo IL1 die Synthese von Makrophagen-Mitogen in Astrozyten steigerte (Théry et al., 1992; Aloisi et al., 1992b; Liu et al., 1994).

4.2.1 *Ramifizierte Mikroglia in Kokultur auf einen konfluenten Rasen von Astrozyten*

Die Ähnlichkeit zwischen der kultivierten Mikroglia und den runden, amöboiden, aktivierten Makrophagen ist ein prinzipielles Problem der meisten bisherigen Studien an reinen Mikroglia-Kulturen. Bezeichnenderweise gibt es viele physiologische Unterschiede zwischen ramifizierter Mikroglia und Makrophagen z.B. die Zelladhäsions-Molekülexpression (Tabelle XII, Seite 106), die enzymatische Aktivität (Suzumura et al., 1991), elektrophysiologische Eigenschaften (Kettenmann et al., 1990; Schmidtmayer et al., 1994; Eder et al., 2000) und den zytoskelettären Aufbau (Perry und Gordon, 1988; Chamak und Mallat, 1991; Ilschner und Brandt, 1996). Es ist daher fraglich, inwieweit sich von Versuchen in den Kulturen von Makrophagen-ähnlicher Mikroglia auf die ramifizierte Mikroglia schließen läßt, die die vorherrschende Morphologie im normalen Gehirn repräsentiert. Von der Vielzahl der Methoden, die beschrieben worden sind, um die Ramifikation der Mikroglia in Kultur zu induzieren (Tabelle V, Seite 29), liefert einzig die Kokultur von Mausmikroglia auf einem konfluenten Astrozytenrasen einen hohen Anteil an stark ramifizierter Mikroglia und konnte in mehreren Laboratorien reproduziert werden (Liu et al., 1994; Sievers et al., 1994a; Schmidtmayer et al., 1994; Tanaka und Maeda, 1996; Wilms et al., 1997; Wilms et al., 1999; Tanaka et al., 1999). Außerdem vermeidet diese Methode, den Kulturen bereits zur Induktion der Ramifizierung unphysiologische Substanzen oder Stoffe, deren Rolle für die Aktivierung bereits bekannt ist, zuzusetzen. Neben der morphologischen Ähnlichkeit zwischen der kokultivierten Mikroglia und der ramifizierten Mikroglia im normalen Gehirn spricht auch das vergleichbare Integrin-Expressionsmuster in vorliegender Studie dafür, daß das Aktivitätsstadium der Mikrogliazellen in dieser Kulturmethode den Zellen im normalen Gehirn entspricht.

4.2.2 *Zytokineffekt auf Proliferation von ramifizierter Mikroglia und Makrophagen*

Wie in dieser Arbeit gezeigt, stimulieren die klassischen Monozyten-Mitogene MCSF, GMCSF und IL3 die Proliferation der ramifizierten Mikroglia. Dieser Effekt ist sehr ähnlich dem Effekt auf kultivierte Gehirnmakrophagen in früheren Arbeiten (Giulian und Ingeman,

1988; Suzumura et al., 1990). Der antiproliferative Effekt von IL10 war ebenfalls vereinbar mit dem generell inhibierenden Effekt dieses Zytokines auf Gehirnmakrophagen (Howard und O'Garra, 1992; Oswald et al., 1992; Frei et al., 1994; Lodge und Sriram, 1996). Auf der anderen Seite, hatten einige Zytokine auch eine entgegengesetzte Wirkung. IL2 und IL4 hemmten die Proliferation von ramifizierter Mikroglia, stimulierten aber Makrophagen (Sawada et al., 1993; Brodie und Goldreich, 1994; Sawada et al., 1995). $IFN\gamma$ und $TNF\alpha$ schienen keinen Einfluß auf die Proliferation von Makrophagen in Monokulturen zu haben (Giulian und Ingeman, 1988) oder erhöhten die Anzahl der leicht angehefteten, proliferierenden Makrophagen in reinen oder gemischten Gliakulturen (Ganter et al., 1992; Théry und Mallat, 1993; Lee et al., 1994). Im Gegensatz dazu inhibierten in vorliegender Studie die proinflammatorischen Zytokine $IFN\gamma$ und $TNF\alpha$ die Proliferation der ramifizierten Mikroglia dramatisch. Dieser Unterschied könnte auch durch einen indirekten Effekt der kokultivierten Astrozyten vermittelt werden. Hier bietet die neuere Kulturmethode mittelstark ramifizierter Mikroglia in Astrozyten-konditionierten Medium (Tanaka und Maeda, 1996; Eder et al., 2000) eine Möglichkeit, um zwischen direktem und indirektem Effekt zu unterscheiden. Auf jeden Fall ist die divergierende Wirkung von IL2 und IL4 – Inhibition von ramifizierter Mikroglia und Stimulation von amöboiden Makrophagen – von großem physiologischem Interesse. Obwohl in der späten Embryonalentwicklung und der frühen Reaktion auf Verletzung die große Mehrzahl der proliferierenden Mikroglia ramifiziert ist (Abbildung 23, Seite 90; Ohna et al., 1993; Raivich et al., 1994), tritt nach extensivem Neurotrauma eine substantielle Proliferation von amöboiden Makrophagen auf (Giulian, 1987, 1991; Amat et al., 1996). In dieser Situation könnte die Umwandlung der Mikroglia vom ramifizierten zum phagozytischen Phänotyp die Wirkung von proinflammatorischen Zytokine wie IL2 und IL4 verstärken und die feine Balance zwischen stimulierenden und inhibierenden Molekülen beeinflussen.

Die vorliegende Studie zeigt, daß die meisten Zytokine (IL2, IL4, IL10, $IFN\gamma$ und $TNF\alpha$) die Proliferation der ramifizierten Mikroglia inhibieren. Die große Redundanz der inhibitorischen Zytokine unterstreicht die Bedeutung der Kontrolle Mikroglia-Proliferation *in vivo*, wo diese

Zytokine eine Rolle bei der Balance zwischen nützlichem und schädlichem Einfluß der Mikroglia auf das zentrale Nervensystem spielen könnten (Banati et al., 1993; Mallat und Chamak, 1994). Ein besseres Verständnis der Regulation und Wirkung dieser multifunktionalen Moleküle könnte Licht auf die molekularen Mechanismen werfen, die zur Entzündung und ihrer Auflösung im Gehirnparenchym führen.

Tabelle XIV. Zytokine und Proliferation *in vitro* – Makrophagen und Mikroglia

Zytokin	Ramifizierte Mikroglia	Makrophagen
	Auf Astrozytenrasen	
<i>"klassische" Mitogene</i>		
MCSF	Stimulation	Stimulation
GMCSF	Stimulation	Stimulation
IL3	Stimulation	Stimulation
<i>andere Zytokine</i>		
IL1	Stimulation (indirekt)	Stimulation
IL2	Inhibition	Stimulation
IL4	Inhibition	Stimulation
IL6	Kein Effekt	–
IL10	Inhibition	–
TNF α	Inhibition	kein Effekt / Stimulation
IFN γ	Inhibition	kein Effekt
LIF	kein Effekt	–

Daten für ramifizierte Mikroglia aus dieser Studie, für Makrophagen vgl. Tabelle IV (Seite 28)

4.2.3 Endogene Mitogene in der Kokultur

Die Fähigkeit, die morphologische Differenzierung und die proliferative Kapazität in Kultur aufrechtzuerhalten, ist eine wichtige Voraussetzung für die Erforschung der Biologie der ramifizierten Mikroglia. Da Serum große Mengen an MCSF enthält (Wiktor-Jedrejczak et al., 1990) könnte dieses Serum-Mitogen leicht den Effekt anderer Wachstumsfaktoren

maskieren. Deshalb war für die Proliferationsexperimente der konstitutive Zusatz von Serum zum Kulturmedium unerwünscht. Wie in vorliegender Studie gezeigt wurde, behält die Mikroglia auf einem Astrozytenrasen auch in serumfreien Medium die Fähigkeit zu ramifizieren, und diese Kulturmethode ermöglicht so die Erforschung der spezifischen Wirkung einzelner Zytokine auf die Proliferation. Obwohl Astrozyten MCSF und GMCSF sezernieren können (Giulian und Lachman, 1985; Hao et al., 1990; Ohno et al., 1990; Malipiero et al., 1990; Théry et al., 1992; Aloisi et al., 1992b; Liu et al., 1994; Lee et al., 1994), scheint ihre Konzentration im Kokultursystem gering zu sein. Neutralisation des endogenen MCSF und GMCSF mit spezifischen Antikörpern führte nur zu einer geringen Inhibition der Mikroglia-Proliferation (28% Abnahme für MCSF-Antikörper und 12% für GMCSF-Antikörper). Die vollständige Inhibition der mitogenen Wirkung von IL1 durch diese beiden polyklonalen Antikörper unterstreicht ihre Wirkung. Auf der anderen Seite, verstärkte exogenes MCSF oder GMCSF massiv die Mikroglia-Proliferation (7,2-fach bzw. 3,5-fach), was auf eine niedrige Konzentration dieser Mitogene in den unstimulierten Kokulturen hindeutet. Die Abwesenheit eines signifikanten Effektes des Antikörper gegen IL3 spricht gegen eine funktionell signifikante Expression dieses Wachstumsfaktors in dem in dieser Studie benutzten System (siehe auch Malipiero et al., 1990). Interessanterweise deutet die relativ hohe, residuale Proliferation auch in Gegenwart von neutralisierenden Antikörpern gegen MCSF und GMCSF auf die Wirkung von weiteren, bislang nicht identifizierten Wachstumsfaktoren wie MM1 oder MM2 auf die Mikroglia hin (Giulian et al., 1991).

4.2.4 Zusammenfassung Zytokine und ramifizierte Mikroglia-Kokulturen

Die ramifizierte Mikroglia behält auch bei Kultur die Fähigkeit zur Proliferation bei. Unter diesen Bedingungen stimulieren die gut bekannten Makrophagen-Mitogene MCSF, GMCSF und IL3 die Proliferation. Allerdings hatten die meisten Zytokine wie IL2, IL4, IL10, IFN γ und TNF γ einen hemmenden Effekt. Die große Redundanz der inhibitorischen Zytokine unterstreicht die Bedeutung der Kontrolle Mikroglia-Proliferation *in vivo*, wo diese Zytokine

eine Rolle bei der Balance zwischen nützlichem und schädlichem Effekt der Mikroglia auf das zentrale Nervensystem spielen könnten (Banati et al., 1993; Mallat und Chamak, 1994).

Bezeichnenderweise hatte keines der hier untersuchten Zytokine eine durchschlagende Wirkung auf die Morphologie der ramifizierten Mikroglia. Zwar stellt die Mikroglia-Vermehrung ein sehr wichtiger Bestandteil der ihrer Antwort auf Verletzung dar. Andererseits können die möglicherweise beteiligten Zytokine wie stimulierenden (MCSF, GMCSF, IL3) und hemmenden Zytokine (IL2, IL4, IL10, IFN γ und TNF α) nur ein Teil dieser Antwort, nämlich die Proliferation, nicht aber die morphologischen Veränderungen direkt auslösen. Dies zeigt deutlich, daß andere molekulare Signale für diese morphologischen Veränderungen verantwortlich sein müssen. Im folgenden Teil wird deshalb die Wirkung von Lipopolysaccharid (LPS) untersucht, von dem bekannt ist, daß es das Monozyten-Makrophagen-Systems stark aktiviert.

4.3 Mikroglia-Aktivierung durch Lipopolysaccharide

Aktivierung von Mikroglia tritt aber nicht nur mit der De- und Regeneration von Motoneuronen nach Axotomie auf, sondern läßt sich in stereotyper Weise auch durch eine Vielzahl anderer Noxen auslösen (Raivich et al., 1999). Insbesondere Infektionen sind potente Aktivatoren der Mikroglia. So wird die recht stereotype Reaktion der Mikroglia, Astrozyten und einwandernden Leukozyten zunehmend als eine evolutionäre Anpassung an verschiedene ZNS-Infektionen gesehen (Kreutzberg, 1995a; Raivich et al., 1999). In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb der Effekt von Lipopolysacchariden, einem Bestandteil der Zellwand Gram-negativer Bakterien und Mediator des septischen Schocks, auf das sonst unverletzte zentrale Nervensystem untersucht. Periphere, subkutane Injektion von LPS führte zu einer starken, dosisabhängigen, morphologischen Aktivierung der ramifizierten Mikroglia im Hirnstamm, die bereits nach 12 Stunden auftrat, nach 2 Tagen ein Maximum hatte und dann wieder abnahm. Die Aktivierung der Mikroglia im Hirnstamm ging mit einem starken Anstieg der Integrine $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$ und $\alpha M\beta 2$ einher. Trotz maximaler LPS-Dosen wurde jedoch weder das Phagozytose-assoziierte Integrin $\alpha X\beta 2$ induziert, noch

deramifizierte die aktivierte Mikroglia vollständig und wurden zu runden Makrophagen. Das Integrin-Expressionsmuster der LPS-aktivierten Mikroglia entsprach dem Stadium 3b der Mikroglia-Aktivierung nach Raivich (Umgebungsaktivierung, Tabelle III, Seite 22; Raivich et al., 1999). Interessanterweise beeinflusste die LPS-Stimulation ausschließlich die Mikroglia-Integrine, die $\alpha6\beta1$ -Integrin-Expression der Blutgefäße und die neuronale $\beta1$ -Immunoreaktivität im zentralen Nervensystem blieben unverändert.

Im komplexen Organismus könnten Lipopolysaccharide sowohl direkt als auch indirekt über andere Zellen auf die Mikroglia wirken. Um dieser Frage nachzugehen, wurde die LPS-Wirkung auf ramifizierte Mikroglia in Kokultur auf einem Astrozytenrasen untersucht. Dieses System hat gegenüber dem Gehirn den Vorteil der reduzierten Komplexität und schaltet mögliche indirekte Effekte von LPS über Gefäßendothelien, Neurone oder Blutmakrophagen aus. Wie im Gehirn führte auch in Kultur die LPS-Stimulation zu einer morphologischen Aktivierung der Mikroglia, ohne den phagozytischen Phänotyp zu induzieren. Die Integrin-Expression der ramifizierten Mikroglia in den Kontrollkulturen und nach LPS-Stimulation glich ebenfalls der Regulation *in vivo*, mit dem einzigen Unterschied, daß das $\alpha6$ -Integrin in Kultur abnahm, während es im Gehirn nach LPS-Stimulation anstieg. Nach der Integrin-Expression und Morphologie zu urteilen, sind die ramifizierten Mikrogliazellen in der Kokultur höchstens leicht aktiviert (Stadium 1). Nach LPS-Stimulation induzieren sie – wie ihre Verwandten *in vivo* – die Integrine des Aktivierungsstadiums 3b (Tabelle III, Seite 22).

4.3.1 Mechanismus der Mikroglia-Aktivierung durch LPS

Lipopolysaccharide (LPS, Endotoxin) sind als starke Aktivatoren des Makrophagen-Monozyten-Systems sowie als Mediatoren des Fiebers und des septischen Schocks bekannt (Bowton, 1989; Kang et al., 1995; Rubio et al., 1995; Park und Shin, 1996; Saper, 1998; Luheshi, 1998; Mayer, 1998; Caldwell et al., 1998). Für die experimentelle LPS-Stimulation des zentralen Nervensystems sind verschiedene Wege beschritten worden. Die häufig gewählte, direkte Injektion des Endotoxins in das Parenchym hat das Problem der traumatischen Zerstörung der Blut-Hirn-Schranke (BHS) mit dem nachfolgenden frühen

Einstrom von Blutmakrophagen (Andersson et al., 1992; Montero-Menei et al., 1996), die schwer von der residenten, aktivierten Mikroglia zu unterscheiden sind (Perry und Gordon, 1988; Williams et al., 1992; Lassmann et al., 1994; Toku et al., 1999). Eine Möglichkeit, diese Schwierigkeit zu umgehen, bietet die periphere Applikation von LPS – intravenös, intraperitoneal oder subkutan (Xu und Ling, 1994; Buttini und Boddeke, 1995; Sagar et al., 1995; Liu et al., 1996b; Buttini et al., 1996, 1997; Gourmala et al., 1997; Ng und Ling, 1997; Quan et al., 1998; Caldwell et al., 1998; van Koughnet et al., 1999). Dabei tritt Aktivierung der Mikroglia im gesamten Gehirn auf, sowohl in BHS-defizienten Gehirngebieten wie der Area postrema, als auch in Regionen mit intakter BHS. Weil LPS wegen seiner Größe die BHS nicht leicht passieren kann (Coceani et al., 1988) und trotzdem Effekte auf die parenchymatöse Mikroglia hat, stellt sich die Frage nach seiner Wirkungsweise. Für einige hochmolekulare Substanzen wie Transferrin oder "low density lipoproteins" (LDL) ist ein spezifischer Transport über die intakte Blut-Hirn-Schranke beschrieben worden (Descamps et al., 1996; Dehouck et al., 1997) und auch peripheres Interferon- γ wirkt jenseits der unverletzten BHS (Grau et al., 1997). Ein anderer möglicher Zugangsweg besteht darin, daß LPS zuerst die BHS durchlässiger macht und so den Eintritt für sich selbst und andere Substanzen ins ZNS erleichtert (Tunkel et al., 1991). So ist gezeigt worden, daß LPS – wahrscheinlich über die Wirkung von Tumornekrosefaktor- α (TNF α) auf "tight junctions" – die BHS für große Moleküle wie Meerrettichperoxidase (HRP; Liu et al., 1996b) oder Serumproteine wie Albumin (Bohatschek, unveröffentlichte Studien) durchlässig machen kann. Neben diesem parazellulären Diffusionsweg stimuliert LPS aber auch die spezifische, adsorptive, endotheliale Transzytose für große Glykoproteine wie das HIV-gp120 (Banks et al., 1999). Schließlich gibt es für hochmolekulare Substanzen wie Albumin, IgG, Komplement, Immunglobulin M und HRP extrazelluläre Umgehungswege für die Blut-Hirn-Schranke des Säugetieres (Broadwell und Sofroniew, 1993). Was immer der Mechanismus ist, die vorliegende Studie zeigt, daß 100-fach höhere periphere Gaben von LPS benötigt werden, um bei intakter BHS im lateralen Hirnstamm die gleiche Mikroglia-Aktivierung zu erreichen wie in der BHS-defizienten Area postrema.

4.3.2 Staging der Mikroglia-Aktivierung anhand des Integrin-Musters

Unabhängig vom Eintrittsmechanismus führt das Endotoxin zu einer reproduzierbaren, dosisabhängigen, morphologischen und immunhistochemisch nachweisbaren Aktivierung der Mikroglia im Hirnstamm. Dabei verplumpten die proximalen Fortsätze der Mikroglia, die distale Verästelung wurde reduziert und es zeigte sich ein Anstieg der Integrine $\alpha M\beta 2$, $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$ nicht aber $\alpha X\beta 2$ auf der ramifizierten Mikroglia (Abbildung 22, Seite 88). Der Vergleich dieses Musters mit der örtlich und zeitlich definierten Integrin-Expression im experimentell gut untersuchten Modell nach Fazialisaxotomie (4.1.3; Tabelle XII, Seite 106) erlaubt ein Staging der Mikroglia-Aktivierung nach LPS-Stimulation. Die Integrine $\alpha M\beta 2$, $\alpha 5\beta 1$ und $\alpha 6\beta 1$ sind in fast allen Aktivierungsstadien exprimiert, im Unterschied dazu ist aber die Hochregulation von $\alpha 4\beta 1$ spezifisch für die Umgebungsaktivierung (Stadium 3b). Auch die ebenfalls für das Stadium 3 spezifische, starke Induktion von MHC1, B7.2 und ICAM1 nach peripherer LPS-Gabe (Bohatschek, unveröffentlichte Studien) und die Abwesenheit vom Stadium 3a-spezifischen Integrin $\alpha X\beta 2$ oder phagozytischer Morphologie unterstreichen die Einordnung der LPS-aktivierten Mikroglia in das Stadium 3b.

4.3.3 Signalmoleküle der LPS-induzierten Mikroglia-Aktivierung

Nach Fazialisaxotomie ist der neuronale Zelltod mit dem Auftreten von phagozytischer Mikroglia und der Aktivierung der umgebenden Mikroglia verbunden (Stadium 3). Das Ausbleiben der Bildung dieser Knötchen bei genetischem Fehlen beider Rezeptoren für $TNF\alpha$ deutet darauf hin, daß die Mikroglia-Aktivierung im phagozytischen Stadium 3 nach Fazialisaxotomie Tumornekrosefaktor- α ($TNF\alpha$)-abhängig ist (Raivich et al., 1999). Nach LPS-Stimulation tritt zwar keine Phagozytose und kein neuronaler Zelltod auf, es gibt aber auch andere mögliche, zerebrale Quellen für dieses proinflammatorische Zytokin. So findet sich *in vivo* nach der Endotoxingabe eine Hochregulation von $TNF\alpha$ -Protein und -mRNA in Meningen, Ependym, Kapillaren, Neuronen in BHS-freien Arealen, perivaskulären Zellen und besonders in parenchymatöser Mikroglia, nicht jedoch in Astrozyten (Breder et al., 1994; Liu et al., 1996b; Buttini et al., 1997; Quan et al., 1999). *In vitro* sezernieren LPS-stimulierte

Mikrogliazellen und etwas schwächer Astrozyten dieses Zytokin (Sawada et al., 1989; Chung und Benveniste, 1990; Chiang und McBride, 1991; Lee et al., 1993a; Peterson et al., 1995; Lafortune et al., 1996; Liu et al., 1996a; Du und Li, 1998). Das Ausbleiben einer morphologischen Aktivierung der kultivierten, ramifizierten Mikroglia und die Hemmung der Proliferation nach Gabe des $TNF\alpha$ in dieser Studie (Abbildung 28, Seite 97) sprechen allerdings gegen eine Rolle des $TNF\alpha$ als Mediator der LPS-Wirkung auf die Mikroglia. Inwieweit dieses Zytokin überhaupt an der Mikroglia-Aktivierung nach LPS-Stimulation beteiligt ist, können erst Versuche mit neutralisierenden Antikörpern oder mit genetisch $TNF\alpha$ -defizienten "knock-out" Mäusen zeigen. Auf der anderen Seite könnte LPS die Mikroglia auch direkt über ihren Membran-Rezeptor CD14 aktivieren (Becher et al., 1996; Galea et al., 1996). Versuche mit CD14-Inhibitoren können deshalb zur Aufklärung des exakten Aktivierungsmechanismus beitragen. Von Interesse für die Biologie der Mikroglia ist hier, ob die Aktivierung nach LPS-Stimulation und die den neuronalen Zelltod begleitende $TNF\alpha$ -abhängige Aktivierung nach Fazialis-Durchtrennung zwei getrennte Wege darstellen oder ob sie in einer gemeinsamen Endstrecke münden.

4.3.4 Integrin-Regulation und Mikroglia-Morphologie nach LPS-Stimulation

Unabhängig vom exakten Induktionsmechanismus haben die Integrin-Zelladhäsionsmoleküle eine enge Beziehung zu der Mikroglia-Morphologie. Von den vielen Integrinen, die nach LPS-Stimulation hochreguliert werden, sind der Fibronektin-Rezeptor $\alpha5\beta1$ (CD49e/CD29, VLA-5) und der Laminin-Rezeptor $\alpha6\beta1$ (CD49f/CD29, VLA-6) von besonderem Interesse, da ihre Expression bei der Mikroglia-Aktivierung nach Fazialisaxotomie mit Zielfindung, Zelladhäsion und starker Deramifizierung einhergeht (Tabelle XII, Seite 106). *In vitro* haben Fibronektin und Laminin eine gegensätzliche Wirkung auf die Morphologie der Mikroglia (siehe auch 4.1.3.3). Laminin fördert die Umwandlung von Mikroglia zu Makrophagen, während Fibronektin eine Ramifizierung begünstigt (Chamak und Mallat, 1991; Tanaka und Maeda, 1996). Die neuronale Synthese von Laminin kann nach Axotomie den Verlust der Verästelung der Mikroglia fördern (Le Beau et al., 1995; Kerber et al., 1997). *In vitro* führt die

Gabe des LPS in zu einer vermehrten Synthese von Fibronectin durch kultivierte Astrozyten (Mahler et al., 1997), zur Zunahme des Fibronectin-Rezeptors $\alpha 5\beta 1$ und zu einer gleichzeitigen Abnahme des Laminin-Rezeptors $\alpha 6\beta 1$ auf der Mikroglia (Abbildung 26, Seite 96). Diese Induktion des Ramifizierung-fördernden Integrins $\alpha 5\beta 1$ auf Mikroglia, seines Liganden auf Astrozyten und die gleichzeitige Abnahme des Ramifizierung-hemmenden Integrins $\alpha 6\beta 1$ weist auf die Bedeutung der Ramifizierung für die Aufrechterhaltung des Phänotyps der Mikroglia. Insgesamt unterstreichen diese Befunde den Stellenwert der differentiellen Zell-Zell und Zell-Matrix-Interaktion für die Mikroglia-Differenzierung *in vivo* und *in vitro*.

4.3.5 LPS-Stimulation von ramifizierter Mikroglia in Kokultur

Die Zellkultur bietet durch die Reduktion der Komplexität des Zellverbandes unter Ausschluß von Neuronen, Oligodendrozyten, Endothelien, Meningen, perivaskulären Zellen und Plexusmakrophagen und ihrem indirekten Einfluß die Möglichkeit, den direkten Effekt von LPS auf die Mikroglia zu untersuchen. Ein prinzipielles Problem der meisten bisherigen Studien an Kulturen von reiner Mikroglia ist aber, daß sie bereits in den Kontrollkulturen runden, amöboiden, aktivierten Makrophagen ähnelt. Zwischen ramifizierter Mikroglia und Makrophagen bestehen aber viele physiologische Unterschiede (siehe 4.2.1). In vorliegender Arbeit wurde gezeigt, daß in Zellkultur die Mikroglia gut ramifiziert, wenn man sie auf einem Astrozytenrasen aussät. Sie ähnelt dann Mikroglia im normalen Gehirn sowohl in Morphologie als auch in Integrin-Expression. Damit eignen sich diese Kulturen besonders gut zum Studium der LPS-Aktivierung normaler, ramifizierter Mikroglia. Bei der Stimulation der ramifizierten Mikrogliazellkulturen mit steigenden Konzentrationen von LPS fand sich eine progressive Hypertrophie des Zellkörpers und der proximalen Fortsätze verbunden mit einer Reduktion der distalen Ramifizierung, die der Reaktion der Mikroglia *in vivo* auf das Endotoxin stark ähnelte (Tabelle XV, Seite 123).

Tabelle XV. Mikroglia-Reaktion auf LPS-Stimulation *in vivo* und *in vitro*

	Hirnstamm-Mikroglia nach peripherer LPS-Injektion	Kokultivierte Mikroglia nach LPS-Inkubation
Morphologie		
Zellkern	Hypertrophie	Hypertrophie
proximale Fortsätze	Verplumpung	Verplumpung
distale Fortsätze	Reduktion der Ramifikation	Reduktion der Ramifikation
Immunoreaktivität		
$\alpha M\beta 2$	Zunahme	Zunahme
$\alpha 4\beta 1$	Zunahme	Zunahme
$\alpha 5\beta 1$	Zunahme	Zunahme
$\alpha 6\beta 1$	Zunahme	Abnahme
Aktivierungsstadium	Stadium 3b (Umgebungsaktivierung)	Stadium 3b (Umgebungsaktivierung)

Interessanterweise fand sich in der Zellkultur aber auch noch ein zweites Reaktionsmuster. Bereits bei minimalen Dosen wurden ca. 5% der Mikrogliazellen zu großen, flachen, runden Zellen, die an Spiegeleier erinnerten. Dieser Effekt war nicht dosisabhängig und der Anteil der Spiegelei-Zellen an der gesamten Mikroglia vergrößerte sich nicht mit steigender LPS-Konzentration. Neben ihrer Morphologie zeichnen sich diese Spiegelei-Zellen durch besondere Motilität und Zytoskelettorganisation aus, die eine Umordnung der Aktinfilamente und Mikrotubuli, das Auftreten von zwei Ringen kondensierter Intermediärfilamente und eine Abnahme von MHC2 einschließt (Abd-el-Basset und Fedoroff, 1995). Diese Reduktion und eine im Vergleich zu der ramifizierten Mikroglia geringere Expression der Phagozytose-assoziierten Integrine sprechen dagegen, daß es sich bei den Spiegelei-Zellen um aktive Makrophagen handelt. Ihr Vorkommen und ihre Bedeutung *in vivo* bleiben unbekannt (Abd-el-Basset und Fedoroff, 1995).

Wie ihre dosisabhängige, morphologische Aktivierung ähnelte auch die Integrin-Regulation der ramifizierten Mikroglia in Kultur der LPS-stimulierten Mikroglia *in vivo* mit einer Hochregulation der Integrine $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$ und $\alpha M\beta 2$ (vgl. Abbildung 22, Seite 88 und

Abbildung 25, Seite 94). Reine Kulturen von Makrophagen-ähnlicher Mikroglia reagieren nur zum Teil in der gleichen Weise. Diese Makrophagen-ähnliche Zellen zeigen zwar bei LPS-Exposition eine Hochregulation der $\beta 1$ -Untereinheit, die Expression von $\alpha M\beta 2$ -Expression bleibt dagegen unbeeinflusst (Zuckerman et al., 1998).

Diese Unterschiede haben vermutlich mit dem jeweiligen Aktivierungsstadium der Mikroglia zu tun. Das Integrin $\alpha M\beta 2$ ist einer der frühesten Aktivierungsmarker und steigt bei Stimulation der Mikroglia *in vivo* am schnellsten und am stärksten an (Tabelle III, Seite 22; Abbildung 19, Seite 83; Raivich et al., 1999). Makrophagen-ähnliche Mikroglia (Stadium 3a), die $\alpha M\beta 2$ wahrscheinlich bereits maximal exprimiert, kann deshalb bei LPS-Stimulation keine weitere Induktion zeigen. Dagegen kann die ramifizierte Mikroglia (Stadium 0) sehr wohl auf LPS mit einer $\alpha M\beta 2$ -Induktion reagieren, wie in vorliegender Studie gezeigt wurde (Abbildung 26, Seite 96). Dieser Unterschied unterstreicht die Bedeutung des ramifizierten Phänotyps für die Untersuchung der frühen Aktivierung in Zellkultur.

4.3.6 LPS und phagozytische Mikroglia

Phagozytische Mikroglia zeigt eine starke Expression vieler verschiedener Integrine und das Integrin $\alpha X\beta 2$ (CD11c/CD18, p150,95) findet sich ausschließlich auf Mikroglia-Phagozyten (Tabelle XII, Seite 106; Abbildung 16, Seite 78; Akiyama und McGeer, 1990; Möller et al., 1996; Raivich et al., 1998a). In vorliegender Arbeit konnte nach LPS-Stimulation weder *in vitro* noch *in vivo* die runde, Makrophagen-ähnliche Morphologie oder eine Phagozytose-assoziierte $\alpha X\beta 2$ -Expression auf der Mikroglia beobachtet werden. Für das Fehlen einer Umwandlung von Mikroglia zu aktiven Phagozyten *in vivo* spricht auch das Ausbleiben von Gewebsschäden nach peripherer LPS-Injektion im sonst unverletzten Gehirn (Buttini und Boddeke, 1995; Buttini et al., 1996). Interessanterweise scheinen diese Befunde im Gegensatz zu Zellkulturexperimenten zu stehen, die eine LPS-induzierte Verstärkung der phagozytischen Aktivität in reinen Kulturen von Mikroglia zeigten (Zielasek und Hartung, 1996; Smith et al., 1998). In diesen Studien fand sich aber bereits in den unstimulierten Ausgangskulturen der runden, amöboiden, von Mikroglia abstammenden Makrophagen

phagozytische Aktivität. Die unterschiedliche Wirkung von LPS könnte sich also durch die Diversität der Ausgangskulturen erklären, dort Makrophagen hier Mikroglia. Obwohl LPS offenbar Makrophagen noch stärker aktivieren kann, vermag es nicht die ramifizierte Mikroglia zu Makrophagen umzuwandeln. Die Steuerung dieser Umwandlung ist aber von großem physiologischen und pathologischen Interesse, denn bis heute ist nicht geklärt, ob die Mikroglia einen günstigen oder schädlichen Einfluß auf die Neuroregeneration hat (Banati und Graeber, 1994; Streit et al., 1999).

Welche Stimuli sind für diese Umwandlung notwendig? Einen Hinweis kann die vorliegende Arbeit geben. Nach Fazialisaxotomie tritt *in vivo* die Umwandlung zu Makrophagen ein, nach peripherer Gabe hoher Dosen von LPS oder Stimulation mit einer ganzen Reihe von Zytokinen wie IL1, IL2, IL3, IL4, IL6, IL10, MCSF, GMCSF, $TNF\alpha$ und $IFN\gamma$ bleibt sie *in vitro* aber aus. Ein wichtiger Unterschied dieser beiden Aktivierungsmodelle ist das Auftreten von neuronalem Zelltod in verletztem Gehirn und das damit verbundene Vorhandensein von phagozytierbaren, zellulären Debris. In diesem Sinne zeigen erste Experimente in Kokulturen von ramifizierter Mikroglia, daß Stimulation mit neuronalem Debris eine schnelle und vollständige Umwandlung zu Makrophagen bewirken kann (Bohatschek, Kloss et al., Veröffentlichung in Vorbereitung). Es scheint also, daß nur phagozytierbares Material ein adäquater Reiz für die Umwandlung von ramifizierter Mikroglia zu Makrophagen ist, wobei noch zu klären ist, über welche Botenstoffe dieser Effekt vermittelt wird.

5 Zusammenfassung

Verletzungen des zentralen Nervensystems lösen zelluläre Veränderungen der traumatisierten Neuronen, der benachbarten Gliazellen und der lokalen Umgebung aus. Diese Reaktion führt in mehreren Stadien zu einer Umorganisation des Gehirngewebes, die letztlich darauf zielt, die Integrität des zentralen Nervensystems zu wahren und im günstigsten Falle zu einer funktionellen Regeneration führt. Eine wichtige Rolle bei der Reorganisation des Gehirnparenchyms nach Verletzung spielen die Veränderung der adhäsiven Eigenschaften und die Vermehrung von Zellen. Das Wissen um die molekularen Mechanismen dieser Reaktion ist aber noch lückenhaft. Die vorliegende Arbeit untersucht im verletzten Nervensystem und *in vitro* die zelluläre Regulation der Integrin-Zelladhäsionsmoleküle sowie die Steuerung der Proliferation der viele Integrine exprimierenden Mikroglia in der Zellkultur.

Nach peripherer Durchtrennung des Fazialis-Nerven fand sich im Kerngebiet deutliche Veränderungen der Integrin-Immunoreaktivität. Die Verletzung führte zu einem starken Anstieg verschiedener Integrine auf den axotomierten Neuronen, der Mikroglia, den Gefäßendothelien und den Lymphozyten mit jeweils charakteristischem Zeitverlauf. Die verletzten Neurone regulierten die bereits konstitutiv exprimierte $\beta 1$ -Integrin-Untereinheit hoch und das $\beta 1$ -Integrin fand sich auf axonalen Wachstumskegeln regenerierender Nervenzellen. Aktivierte Mikroglia zeigte einen Anstieg von $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$, $\alpha M\beta 2$ und $\alpha X\beta 2$ mit je nach Aktivierungsstadium deutlich unterschiedlichen Mustern. Zum Zeitpunkt des neuronalen Zelltodes fand sich auch eine Einwanderung von $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 4\beta 7$ und $\alpha L\beta 2$ -positiven Lymphozyten und ein Anstieg des mikrovaskulären Integrins $\alpha 5\beta 1$. Das endotheliale $\alpha 6\beta 1$ -Integrin und $\alpha 4\beta 1$ auf Astrozyten der weißen Substanz zeigten keine Veränderung.

In Zellkulturen entsprach die ramifizierte Mikroglia in Morphologie und Integrin-Muster der Mikroglia im normalen Gehirn. Sie eignet sich daher für das Studium der Steuerung der frühen Aktivierungsphänomene der Mikroglia wie der Proliferation. Hier waren nur die klassischen Makrophagen-Mitogene MCSF, GMCSF und IL3 in der Lage, die Proliferation

der ramifizierten Mikroglia zu stimulieren. Die meisten anderen Zytokine (IL2, IL4, IL10, IFN γ und TNF α) hatten dagegen eine hemmende Wirkung. Einige dieser Zytokine zeigten eine gegensätzliche Wirkung auf die kultivierte, ramifizierte Mikroglia und die von Mikroglia abstammenden Makrophagen. Diese Unterschiede unterstreichen die Bedeutung der Einordnung des Aktivitätszustandes der Mikroglia für die adäquate Beurteilung der Wirkung von Botenstoffen auf die Mikroglia-Aktivierung. Die Integrin-Immunoreaktivität bietet hierfür ein einfaches Werkzeug.

Die Mikroglia wies nach Fazialisaxotomie einen besonders starken Anstieg vieler Integrin-Untereinheiten auf. Diese intrinsische, immunkompetente Zelle des zentralen Nervensystems (ZNS) reagiert auf viele verschiedene Noxen mit einer stereotypen Aktivierung, die besonders auf die Abwehr von Infektionen und die Phagozytose von neuralem Debris ausgelegt ist. So konnte in vorliegender Studie gezeigt werden, daß die periphere Injektion von Lipopolysacchariden (LPS), einem Zellwandbestandteil Gram-negativer Bakterien, zu einer Aktivierung der Mikroglia *in vivo* führt. Von der Morphologie und dem Integrin-Expressionsmuster gleicht sie der späten Mikroglia-Aktivierung in der Umgebung von phagozytischen Mikroglia-Knötchen um die untergehenden Neurone. Das Modell der LPS-Stimulation läßt sich besonders leicht in die Zellkultur übertragen. Auch hier bewirkt LPS analoge, morphologische Veränderungen und eine weitgehend übereinstimmende, immunhistochemische Integrin-Regulation der kultivierten, ramifizierten Mikrogliazellen. Wie die untersuchten Zytokine war auch LPS weder *in vivo* noch *in vitro* in der Lage, die ramifizierte Mikrogliazellen zu runden Makrophagen umzuwandeln oder die Phagozytose-assoziierten Integrine zu induzieren. Das unterstreicht die spezifische Wirkung des neuralen Zelldebris auf die Mikroglia und die Stabilität des ramifizierten Phänotyps der Mikroglia.

6 Zitierte Literatur

1. Abd-el-Basset EM und Fedoroff S (1995) Effect of bacterial wall polysaccharide (LPS) on morphology, motility, and cytoskeletal organization of microglia in cultures. *Journal of Neuroscience Research* 41:222-237.
2. Abumiya T, Lucero J, Heo JH, Tagaya M, Koziol JA, Copeland BR, del und Zoppo GJ (1999) Activated microvessels express vascular endothelial growth factor and integrin alpha(v)beta3 during focal cerebral ischemia. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 19:1038-1050.
3. Adams JC (1992) Biotin amplification of biotin and horseradish peroxidase signals in histochemical stains. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 40:1457-1463.
4. Agius E, Sagot Y, Duprat AM und Cochard P (1996) Antibodies directed against the beta 1-integrin subunit and peptides containing the IKVAV sequence of laminin perturb neurite outgrowth of peripheral neurons on immature spinal cord substrata. *Neuroscience* 71:773-786.
5. Akiyama H, Kawamata T, Dedhar S und McGeer PL (1991) Immunohistochemical localization of vitronectin, its receptor and beta-3 integrin in Alzheimer brain tissue. *Journal of Neuroimmunology* 32:19-28.
6. Akiyama H, Kawamata T, Yamada T, Tooyama I, Ishii T und McGeer PL (1993) Expression of intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 by a subset of astrocytes in Alzheimer disease and some other degenerative neurological disorders. *Acta Neuropathologica* 85:628-634.
7. Akiyama H und McGeer PL (1990) Brain microglia constitutively express beta-2 integrins. *Journal of Neuroimmunology* 30:81-93.
8. Akiyama SK (1996) Integrins in cell adhesion and signaling. *Human Cell* 9:181-186.
9. Akiyama SK, Olden K und Yamada KM (1995) Fibronectin and integrins in invasion and metastasis. *Cancer & Metastasis Reviews* 14:173-189.
10. Albeda SM und Buck CA (1994) Integrins and other cell adhesion molecules. *FASEB Journal* 4:2868-2880.
11. Aloisi F, Borsellino G, Samoggia P, Testa U, Chelucci C, Russo G, Peschle C und Levi G (1992a) Astrocyte cultures from human embryonic brain: characterization and modulation of surface molecules by inflammatory cytokines. *Journal of Neuroscience Research* 32:494-506.
12. Aloisi F, Care A, Borsellino G, Gallo P, Bassani A, Cabibo A, Testa U, Levi G und Peschle C (1992b) Production of hemalymphopoietic cytokines (IL-6, IL-8, colony-stimulating factors) by normal human astrocytes in response to IL-1(and tumor necrosis factor. *Journal of Immunology* 149:2358-2366.
13. Amat JA, Ishiguro H, Nakamura K und Norton WT (1996) Phenotypic diversity and kinetics of proliferating microglia and astrocytes following cortical stab wounds. *Glia* 16:368-382.
14. Andersson EC, Christensen JP, Scheynius A, Marker O und Thomsen AR (1995) Lymphocytic choriomeningitis virus infection is associated with long-standing perturbation of LFA-1 expression on CD8+ T cells. *Scandinavian Journal of Immunology* 42:110-118.
15. Andersson PB, Perry VH und Gordon S (1992) The acute inflammatory response to lipopolysaccharide in CNS parenchyma differs from that in other body tissues. *Neuroscience* 48:169-186.
16. Angelov DN, Gunkel A, Stennert E und Neiss WF (1995) Phagocytotic microglia during delayed neuronal loss in the facial nucleus of the rat - time course of the neuronofugal migration of brain macrophages. *Glia* 13:113-129.
17. Angelov DN, Walther M, Streppel M, Guntinas-Lichius O, Neiss WF, Probstmeier R und Pesheva P (1998) Tenascin-R is antiadhesive for activated microglia that induce downregulation of the protein after peripheral nerve injury: a new role in neuronal protection. *Journal of Neuroscience* 18:6218-6229.
18. Aplin A, Howe A, Alahari S und Juliano R (1998) Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. *Pharmacological Reviews* 50:197-263.
19. Archelos JJ, Previtali SC und Hartung HP (1999) The role of integrins in immune-mediated diseases of the nervous system. *Trends in Neurosciences* 22:30-38.
20. Banati RB, Gehrmann J, Schubert P und Kreutzberg GW (1993) Cytotoxicity of microglia. *Glia* 7:111-118.
21. Banati RB und Graeber MB (1994) Surveillance, intervention and cytotoxicity: is there a protective role of microglia? *Developmental Neuroscience* 16:114-127.
22. Banati RB und Kreutzberg GW (1993) Flow cytometry: measurement of proteolytic and cytotoxic activity of microglia. *Clinical Neuropathology* 12:285-288.

23. Banks WA, Kastin AJ, Brennan JM und Vallance KL (1999) Adsorptive endocytosis of HIV-1gp120 by blood-brain barrier is enhanced by lipopolysaccharide. *Experimental Neurology* 156:165-171.
24. Baron JL, Madri JA, Ruddle NH, Hashim G und Janeway CA, Jr. (1993) Surface expression of alpha 4 integrin by CD4 T cells is required for their entry into brain parenchyma. *Journal of Experimental Medicine* 177:57-68.
25. Barron KD (1983) Comparative observations on the cytologic reactions of central and peripheral nerve cells to axotomy. In Kao CC, Bunge RP und Reier PJ (eds): *Spinal Cord Reconstruction*. New York: Raven Press, pp. 7-40.
26. Bashir R, Coakham H und Hochberg F (1992) Expression of LFA-1/ICAM-1 in CNS lymphomas: possible mechanism for lymphoma homing into the brain. *Journal of Neuro-oncology* 12:103-110.
27. Baumgartner BJ und Shine HD (1998) Permanent rescue of lesioned neonatal motoneurons and enhanced axonal regeneration by adenovirus-mediated expression of glial cell-line-derived neurotrophic factor. *Journal of Neuroscience Research* 54:766-777.
28. Becher B, Fedorowicz V und Antel JP (1996) Regulation of CD14 expression on human adult central nervous system-derived microglia. *Journal of Neuroscience Research* 45:375-381.
29. Benowitz LI und Perrone-Bizzozero (1989) The relationship of GAP-43 to the development and plasticity of synaptic connections. *Annals of the New York Academy of Sciences* 667:58-73.
30. Berlin C, Bargatze RF, Campbell JJ, von Andrian UH, Szabo MC, Hasslen SR, Nelson RD, Berg EL, Erlandsen SL und Butcher EC (1995) Alpha 4 integrins mediate lymphocyte attachment and rolling under physiologic flow. *Cell* 80:413-422.
31. Bignami A, Eng LF, Dahl D und Uyeda CT (1972) Localization of the glial fibrillary acidic protein in astrocytes by immunofluorescence. *Brain Research* 43:429-435.
32. Bisby MA (1988) Dependence of GAP43 (B50, F1) transport on axonal regeneration in rat dorsal root ganglion neurons. *Brain Research* 458:157-161.
33. Bisby MA und Tetzlaff W (1992) Changes in cytoskeletal protein synthesis following axon injury and during axon regeneration. *Molecular Neurobiology* 6:107-123.
34. Blinzinger KH und Kreutzberg GW (1968) Displacement of synaptic terminals from regenerating motoneurons by microglial cells. *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie* 85:145-157.
35. Bo L, Peterson JW, Mork S, Hoffman PA, Gallatin WM, Ransohoff RM und Trapp BD (1996) Distribution of immunoglobulin superfamily members ICAM-1, -2, -3, and the beta 2 integrin LFA-1 in multiple sclerosis lesions. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 55:1060-1072.
36. Bobrow MN, Harris TD, Shaughnessy KJ und Litt GJ (1989) Catalyzed reporter deposition, a novel method of signal amplification. Application to immunoassays. *Journal of Immunological Methods* 125:279-285.
37. Bobrow MN, Litt GJ, Shaughnessy KJ, Mayer PC und Conlon J (1992) The use of catalyzed reporter deposition as a means of signal amplification in a variety of formats. *Journal of Immunological Methods* 150:145-149.
38. Bobrow MN, Shaughnessy KJ und Litt GJ (1991) Catalyzed reporter deposition, a novel method of signal amplification. II. Application to membrane immunoassays. *Journal of Immunological Methods* 137:103-112.
39. Bohatschek M, Jones LL, Kreutzberg GW und Raivich G (1998) Expression of immunoregulatory molecules MHC I, MHC II and B7-2 in the axotomized mouse facial nucleus. *Clinical Neuropathology* 17:286 (Abstract).
40. Bowton DL (1989) CNS effects of sepsis. *Critical Care Clinics* 5:785-792.
41. Bozzo C, Defilippi P, Silengo L und Tarone G (1994) Role of tyrosine phosphorylation in matrix-induced neurite outgrowth in human neuroblastoma cells. *Experimental Cell Research* 214:313-322.
42. Breder CD, Hazuka C, Ghayur T, Klug C, Huginin M, Yasuda K, Teng M und Saper CB (1994) Regional induction of tumor necrosis factor alpha expression in the mouse brain after systemic lipopolysaccharide administration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91:11393-11397.
43. Broadwell RD und Sofroniew MV (1993) Serum proteins bypass the blood-brain fluid barriers for extracellular entry to the central nervous system. *Experimental Neurology* 120:245-263.
44. Brodie C und Goldreich N (1994) Interleukin-4 modulates the proliferation and differentiation of glial cells. *Journal of Neuroimmunology* 55:91-97.
45. Brodkey JA, Gates MA, Laywell E und Steindler DA (1993) The complex nature of interactive neuroregeneration-related molecules. *Experimental Neurology* 123:251-270.

46. Bronner-Fraser M (1987) Perturbation of cranial neural crest migration by the HNK-1 antibody. *Developmental Biology* 123:321-331.
47. Buttini M und Boddeke H (1995) Peripheral lipopolysaccharide stimulation induces interleukin-1 beta messenger RNA in rat brain microglial cells. *Neuroscience* 65:523-530.
48. Buttini M, Limonta S und Boddeke HW (1996) Peripheral administration of lipopolysaccharide induces activation of microglial cells in rat brain. *Neurochemistry International* 29:25-35.
49. Buttini M, Mir A, Appel K, Wiederhold KH, Limonta S, Gebicke-Haerter PJ und Boddeke HW (1997) Lipopolysaccharide induces expression of tumour necrosis factor alpha in rat brain: inhibition by methylprednisolone and by rolipram. *British Journal of Pharmacology* 122:1483-1489.
50. Caldwell FT, Graves DB und Wallace BH (1998) Studies on the mechanism of fever after intravenous administration of endotoxin. *Journal of Trauma-Injury Infection & Critical Care* 44:304-312.
51. Cammer W und Tansey FA (1988) Carbonic anhydrase immunostaining in astrocytes in the rat cerebral cortex. *Journal of Neurochemistry* 50:319-322.
52. Carbonetto S (1984) The extracellular matrix of the nervous system. *Trends in Neurosciences* 7:382-387.
53. Carlsson LE, Santoso S, Spitzer C, Kessler C und Greinacher A (1999) The alpha2 gene coding sequence T807/A873 of the platelet collagen receptor integrin alpha2beta1 might be a genetic risk factor for the development of stroke in younger patients. *Blood* 93:3583-3586.
54. Carmeliet G, Himpens B und Cassiman JJ (1994) Selective increase in the binding of the alpha 1 beta 1 integrin for collagen type IV during neurite outgrowth of human neuroblastoma TR 14 cells. *Journal of Cell Science* 107:3379-3392.
55. Chamak B und Mallat M (1991) Fibronectin and laminin regulate the in vitro differentiation of microglial cells. *Neuroscience* 45:513-527.
56. Chen DH (1978) Qualitative and quantitative study of synaptic displacement in chromatolyzed spinal motoneurons of the cat. *Journal of Comparative Neurology* 177:635-664.
57. Chen H, Chopp M, Zhang RL, Bodzin G, Chen Q, Rusche JR und Todd RF (1994) Anti-CD11b monoclonal antibody reduces ischemic cell damage after transient focal cerebral ischemia in rat. *Annals of Neurology* 35:458-463.
58. Chiang CS und McBride WH (1991) Radiation enhances tumor necrosis factor alpha production by murine brain cells. *Brain Research* 566:265-269.
59. Chopp M, Li Y, Jiang N, Zhang RL und Probstak J (1996) Antibodies against adhesion molecules reduce apoptosis after transient middle cerebral artery occlusion in rat brain. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 16:578-584.
60. Chopp M, Zhang RL, Chen H, Li Y, Jiang N und Rusche JR (1994) Postischemic administration of an anti-Mac-1 antibody reduces ischemic cell damage after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke* 25:869-875.
61. Choudhri TF, Hoh BL, Zerwes HG, Prestigiacomo CJ, Kim SC, Connolly ES, Jr, Kottirsch G und Pinsky DJ (1998) Reduced microvascular thrombosis and improved outcome in acute murine stroke by inhibiting GP IIb/IIIa receptor-mediated platelet aggregation. *Journal of Clinical Investigation* 102:1301-1310.
62. Christensen JP, Andersson EC, Scheynius A, Marker O und Thomsen AR (1995) Alpha 4 integrin directs virus-activated CD8+ T cells to sites of infection. *Journal of Immunology* 154:5293-5301.
63. Chung IY und Benveniste EN (1990) Tumor necrosis factor-alpha production by astrocytes. Induction by lipopolysaccharide, IFN-gamma, and IL-1 beta. *Journal of Immunology* 144:2999-3007.
64. Clark WM, Madden KP, Rothlein R und Zivin JA (1991) Reduction of central nervous system ischemic injury in rabbits using leukocyte adhesion antibody treatment. *Stroke* 22:877-883.
65. Coceani F, Lees J und Dinarello C (1988) Occurrence of interleukin-1 in the cerebrospinal fluid of conscious cat. *Brain Research* 446:245-250.
66. Collier BS, Anderson K und Weisman HF (1995) New antiplatelet agents: platelet GPIIb/IIIa antagonists. *Thrombosis & Haemostasis* 74:302-308.
67. Compston A, Zajicek J, Sussman J, Webb A, Hall G, Muir D, Shaw C, Wood A und Scolding N (1997) Glial lineages and myelination in the central nervous system. *Journal of Anatomy* 190:161-200.
68. Conforti G, Dominguez-Jimenez C, Zanetti A, Gimbrone MAJ, Cremona O, Marchisio PC und Dejana E (1992) Human endothelial cells express integrin receptors on the luminal aspect of their membrane. *Blood* 80:437-446.
69. Cotman CW, Hailer NP, Pfister KK, Soltesz I und Schachner M (1998) Cell adhesion molecules in neural plasticity and pathology: similar mechanisms, distinct organizations? *Progress in Neurobiology* 55:659-669.

70. Cousin B, Leloup C, Penicaud L und Price J (1997) Developmental changes in integrin beta-subunits in rat cerebral cortex. *Neuroscience Letters* 234:161-165.
71. Crossin KL (1996) Tenascin : a multifunctional extracellular matrix protein with a restricted distribution in development. *Journal of Cellular Biochemistry* 61:592-598.
72. Damsky CH und Werb Z (1992) Signal transduction by integrin receptors for extracellular matrix: cooperative processing of extracellular information. *Current Opinion in Cell Biology* 4:772-781.
73. Davis EJ, Foster TD und Thomas WE (1994) Cellular forms and functions of brain microglia. *Brain Research Bulletin* 34:73-78.
74. Deckert-Schlüter M, Bluethmann H, Kaefer N, Rang A und Schlüter D (1999) Interferon-gamma receptor-mediated but not tumor necrosis factor receptor type 1- or type 2-mediated signaling is crucial for the activation of cerebral blood vessel endothelial cells and microglia in murine Toxoplasma encephalitis. *American Journal of Pathology* 154:1549-1561.
75. Deckert-Schlüter M, Schlüter D, Hof H, Wiestler OD und Lassmann H (1994) Differential expression of ICAM-1, VCAM-1 and their ligands LFA-1, Mac-1, CD43, VLA-4, and MHC class II antigens in murine Toxoplasma encephalitis: a light microscopic and ultrastructural immunohistochemical study. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 53:457-468.
76. DeFreitas MF, Yoshida CK, Frazier WA, Mendrick DL, Kypta RM und Reichardt LF (1995) Identification of integrin alpha 3 beta 1 as a neuronal thrombospondin receptor mediating neurite outgrowth. *Neuron* 15:333-343.
77. Dehouck B, Fenart L, Dehouck MP, Pierce A, Torpier G und Cecchelli R (1997) A new function for the LDL receptor: transcytosis of LDL across the blood-brain barrier. *Journal of Cell Biology* 138:877-889.
78. del Rio-Hortega P (1919) El 'tercer elemento' de los centros nerviosos. Poder fagocitario y movilidad de la microglia. *Bol.Soc.Esp.Biol.Ano ix*:154-166.
79. del Rio-Hortega P (1932) Microglia. In Penfield W (ed): *Cytology and Cellular Pathology of the Nervous System*. New York: Paul B. Hoeber, pp. 481
80. Descamps L, Dehouck MP, Torpier G und Cecchelli R (1996) Receptor-mediated transcytosis of transferrin through blood-brain barrier endothelial cells. *American Journal of Physiology* 270:H1149-H1158
81. Dickson DW, Lee SC, Mattiace LA und Yen S-H (1993) Microglia and cytokines in neurological disease, with special reference to AIDS and Alzheimer's disease. *Glia* 7:75
82. Didier M, Harandi M, Aguera M, Bancel B, Tardy M, Fages C, Calas A, Stagaard M, Mollgard K und Belin MF (2000) Differential immunocytochemical staining for glial fibrillary acidic (GFA) protein, S-100 protein and glutamine synthetase in the rat subcommissural organ, nonspecialized ventricular ependyma and adjacent neuropil. *Cell and Tissue Research* 245:343-351.
83. Dipucchio T, Ennas MG, Presta M und Lauro GM (1996) Basic fibroblast growth factor modulates in vitro differentiation of human fetal microglia. *NeuroReport* 7:2813-2817.
84. Du ZY und Li XY (1998) Cytokine and nitric oxide production by rat microglia stimulated with lipopolysaccharides in vitro. *Chung-Kuo Yao Li Hsueh Pao - Acta Pharmacologica Sinica* 19:257-260.
85. Dumoulin FL, Raivich G, Haas CA, Lazar P, Reddington M, Streit WJ und Kreutzberg GW (1992) Calcitonin gene-related peptide and peripheral nerve regeneration. *Annals of the New York Academy of Sciences* 657:351-360.
86. Eble JA (1997) Integrins - A Versatile and Old Family of Cell Adhesion Molecules. In Eble JA und Kühn K (eds): *Integrin-Ligand Interaction*. Heidelberg: Springer-Verlag, pp. 1-39.
87. Eddleston M und Mucke L (1993) Molecular profile of reactive astrocytes - implications for their role in neurologic disease. *Neuroscience* 54:15-36.
88. Eder C, Schilling T, Heinemann U, Haas D, Hailer NP und Nitsch R (2000) Morphological, immunophenotypical and electrophysiological properties of resting microglia in vitro. *European Journal of Neuroscience* 11:4251-4261.
89. Egan RA und Vijayan VK (1991) Fibronectin immunoreactivity in neural trauma. *Brain Research* 568:330-334.
90. Eglitis MA und Mezey E (1997) Hematopoietic cells differentiate into both microglia and macroglia in the brains of adult mice. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 94:4080-4085.
91. Eikelenboom P, Zhan SS, Kamphorst W, van d, V und Rozemuller JM (1994) Cellular and substrate adhesion molecules (integrins) and their ligands in cerebral amyloid plaques in Alzheimer's disease. *Virchows Archiv* 424:421-427.

92. Einheber S, Schnapp LM, Salzer JL, Cappiello ZB und Milner TA (1996) The regional and ultrastructural distribution of the alpha 8 integrin subunit in developing an adult rat brain suggests a role in synaptic function. *Journal of Comparative Neurology* 370:105-134.
93. Elkabes S, DiCicco-Bloom EM und Black IB (1996) Brain microglia macrophages express neurotrophins that selectively regulate microglial proliferation and function. *Journal of Neuroscience* 16:2508-2521.
94. Ellison JA, Velier JJ, Spera P, Jonak ZL, Wang X, Barone FC und Feuerstein GZ (1998) Osteopontin and its integrin receptor alpha(v)beta(3) are upregulated during formation of the glial scar after focal stroke. *Stroke* 29:1698-1706.
95. Engelhardt B, Conley FK, Kilshaw PJ und Butcher EC (1995) Lymphocytes infiltrating the CNS during inflammation display a distinctive phenotype and bind to VCAM-1 but not to MAdCAM-1. *International Immunology* 7:481-491.
96. Engelhardt B, Laschinger M, Schulz M, Samulowitz U, Vestweber D und Hoch (1998) The development of experimental autoimmune encephalomyelitis in the mouse requires alpha4-integrin but not alpha4beta7-integrin. *Journal of Clinical Investigation* 102:2096-2105.
97. Erickson HP und Bourdon MA (1989) Tenascin: An extracellular matrix protein prominent in specialized embryonic tissues and tumors. *Annual Review of Cell Biology* 5:71-89.
98. Eriksson NP, Persson JK, Svensson M, Arvidsson J, Molander C und Aldskogius H (1993) A quantitative analysis of the microglial cell reaction in central primary sensory projection territories following peripheral nerve injury in the adult rat. *Experimental Brain Research* 96:19-27.
99. Etzioni A (1994) Adhesion molecule deficiencies and their clinical significance. *Cell Adhesion & Communication* 2:257-260.
100. Fawcett JP, Bamji SX, Causing CG, Aloyz R, Ase AR, Reader TA, McLean, JH und Miller FD (1998) Functional evidence that BDNF is an anterograde neuronal trophic factor in the CNS. *Journal of Neuroscience* 18:2808-2821.
101. Fässler R, Georges-Labouesse E und Hirsch E (1996) Genetic analyses of integrin function in mice. *Current Opinion in Cell Biology* 8:641-646.
102. Fässler R und Meyer M (1995) Consequences of lack of beta 1 integrin gene expression in mice. *Genes & Development* 9:1896-1908.
103. Fässler R, Pfaff M, Murphy J, Noegel AA, Johansson S, Timpl R und Albrecht R (1995) Lack of beta 1 integrin gene in embryonic stem cells affects morphology, adhesion, and migration but not integration into the inner cell mass of blastocysts. *Journal of Cell Biology* 128:979-988.
104. Ferri CC, Moore FA und Bisby MA (1998) Effects of facial nerve injury on mouse motoneurons lacking the p75 low-affinity neurotrophin receptor. *Journal of Neurobiology* 34:1-9.
105. Figarella-Branger D, Roche PH, Daniel L, Dufour H, Bianco N und Pellissier JF (1997) Cell-adhesion molecules in human meningiomas: correlation with clinical and morphological data. *Neuropathology & Applied Neurobiology* 23:113-122.
106. Fishman PS und Savitt JM (1989) Selective localization by neuroglia of immunoglobulin G in normal mice. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 48:212-220.
107. Frei K, Lins H und Fontana A (1994) Production and function of IL-10 in the central nervous system.
108. Fruttiger M, Schachner M und Martini R (1995) Tenascin-C expression during Wallerian degeneration in C57BL/Wlds mice: possible implications for axonal regeneration. *Journal of Neurocytology* 24:1-14.
109. Fujita H, Tanaka J, Maeda N und Sakanaka M (1998) Adrenergic agonists suppress the proliferation of microglia through beta-2-adrenergic receptor. *Neuroscience Letters* 242:37-40.
110. Gabbott PLA und Bacon SJ (1996) Localisation of NADPH diaphorase activity and NOS immunoreactivity in astroglia in normal adult rat brain. *Brain Research* 714:135-144.
111. Gahmberg CG, Tolvanen M und Kotovuori P (1997) Leukocyte adhesion - structure and function of human leukocyte beta 2-integrins and their cellular ligands. *European Journal of Biochemistry* 245:215-232.
112. Galea E, Reis DJ, Fox ES, Xu H und Feinstein DL (1996) CD14 mediate endotoxin induction of nitric oxide synthase in cultured brain glial cells. *Journal of Neuroimmunology* 64:19-28.
113. Ganter S, Northoff H, Mannel D und Gebicke-Harter PJ (1992) Growth control of cultured microglia. *Journal of Neuroscience Research* 33:218-230.
114. Garcion E, Sindji L, Montero-Menei C, Andre C, Brachet P und Darcy F (1998) Expression of inducible nitric oxide synthase during rat brain inflammation: regulation by 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Glia* 22:282-294.

115. Gebicke-Haerter PJ, Christoffel F, Timmer J, Northoff H, Berger M und Vancalker D (1996) Both adenosine a1- and a2-receptors are required to stimulate microglial proliferation. *Neurochemistry International* 29:37-42.
116. Giese A, Laube B, Zapf S, Mangold U und Westphal M (1998) Glioma cell adhesion and migration on human brain sections. *Anticancer Research* 18:2435-2447.
117. Giese A und Westphal M (1996) Glioma invasion in the central nervous system. *Neurosurgery* 39:235-250.
118. Gingras MC, Roussel E, Bruner JM, Branch CD und Moser RP (1995) Comparison of cell adhesion molecule expression between glioblastoma multiforme and autologous normal brain tissue. *Journal of Neuroimmunology* 57:143-153.
119. Giordana MT, Attanasio A, Cavalla P, Migheli A, Vigliani MC und Schiffer D (1994) Reactive cell proliferation and microglia following injury to the rat brain. *Neuropathology And Applied Neurobiology* 20:163-174.
120. Giulian D (1987) Ameboid microglia as effectors of inflammation in the central nervous system. *Journal of Neuroscience Research* 18:155-171.
121. Giulian D und Baker TJ (1986) Characterization of ameboid microglia isolated from developing mammalian brain. *Journal of Neuroscience* 6:2163-2178.
122. Giulian D und Ingeman JE (1988) Colony-stimulating factors as promoters of ameboid microglia. *Journal of Neuroscience* 8:4707-4717.
123. Giulian D, Johnson B, Krebs JF, George JK und Tapscott M (1991) Microglial mitogens are produced in the developing and injured mammalian brain. *Journal of Cell Biology* 112:323-333.
124. Giulian D und Lachman LB (1985) Interleukin-1 stimulation of astrocyte proliferation after brain injury. *Science* 228:497-499.
125. Giulian D, Li J, Bartel S, Broker J, Li X und Kirkpatrick JB (1995) Cell surface morphology identifies microglia as a distinct class of mononuclear phagocyte. *Journal of Neuroscience* 15:7712-7726.
126. Gladson CL (1996) Expression of integrin alpha v beta 3 in small blood vessels of glioblastoma tumors. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 55:1143-1149.
127. Gladson CL, Hancock S, Arnold MM, Faye-Petersen OM, Castleberry RP und Kelly DR (1996) Stage-specific expression of integrin alphaVbeta3 in neuroblastic tumors. *American Journal of Pathology* 148:1423-1434.
128. Gladson CL, Wilcox JN, Sanders L, Gillespie GY und Cheresch DA (1995) Cerebral microenvironment influences expression of the vitronectin gene in astrocytic tumors. *Journal of Cell Science* 108:947-956.
129. Goldbrunner RH, Bernstein JJ und Tonn JC (1998) ECM-mediated glioma cell invasion. *Microscopy Research & Technique* 43:250-257.
130. Goldbrunner RH, Bernstein JJ und Tonn JC (1999) Cell-extracellular matrix interaction in glioma invasion. *Acta Neurochirurgica* 141:295-305.
131. Gordon EJ, Myers KJ, Dougherty JP, Rosen H und Ron Y (1995) Both anti-CD11a (LFA-1) and anti-CD11b (MAC-1) therapy delay the onset and diminish the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Neuroimmunology* 62:153-160.
132. Gourmala NG, Buttini M, Limonta S, Sauter A und Boddeke HW (1997) Differential and time-dependent expression of monocyte chemoattractant protein-1 mRNA by astrocytes and macrophages in rat brain: effects of ischemia and peripheral lipopolysaccharide administration. *Journal of Neuroimmunology* 74:35-44.
133. Graeber MB und Kreutzberg GW (1986) Astrocytes increase in glial fibrillary acidic protein during retrograde changes of facial motor neurons. *Journal of Neurocytology* 15:363-373.
134. Graeber MB und Kreutzberg GW (1988) Delayed astrocyte reaction following facial nerve axotomy. *Journal of Neurocytology* 17:209-220.
135. Graeber MB, Raivich G und Kreutzberg GW (1989) Increase of transferrin receptors and iron uptake in regenerating motor neurons. *Journal of Neuroscience Research* 23:342-345.
136. Graeber MB, Streit WJ, Kiefer R, Schoen SW und Kreutzberg GW (1990) New expression of myelomonocytic antigens by microglia and perivascular cells following lethal motor neuron injury. *Journal of Neuroimmunology* 27:121-132.
137. Graeber MB, Streit WJ und Kreutzberg GW (1988a) Axotomy of the rat facial nerve leads to increased CR3 complement receptor expression by activated microglial cells. *Journal of Neuroscience Research* 21:18-24.

138. Graeber MB, Streit WJ und Kreutzberg GW (1988b) The microglial cytoskeleton: vimentin is localized within activated cells in situ. *Journal of Neurocytology* 17:573-580.
139. Graeber MB, Tetzlaff W, Streit WJ und Kreutzberg GW (1988c) Microglial cells but not astrocytes undergo mitosis following rat facial nerve axotomy. *Neuroscience Letters* 85:317-321.
140. Graesser D, Mahooti S, Haas T, Davis S, Clark RB und Madri JA (1998) The interrelationship of alpha-4 integrin and matrix metalloproteinase-2 in the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Laboratory Investigation* 78:1445-1458.
141. Grafstein B, und McQuarrie IG (1978) Role of the nerve cell body in axonal regeneration. In Cotman CW (ed): *Neuronal Plasticity*. New York: Raven Pres, pp. 155-195.
142. Graham RC und Karnovsky MJ (1965) The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney: ultrastructural cytochemistry by a new technique. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 14:291
143. Grau V, Herbst B, Vandermeide PH und Steiniger B (1997) Activation of microglial and endothelial cells in the rat brain after treatment with interferon-gamma in vivo. *Glia* 19:181-189.
144. Greene EC (1963) *Anatomy of the rat*. New York: Hafner Publishing Co.
145. Greenwood J, Wang Y und Calder VL (1995) Lymphocyte adhesion and transendothelial migration in the central nervous system: the role of LFA-1, ICAM-1, VLA-4 and VCAM-1. *Immunology* 86:408-415.
146. Grooms SY und Jones LS (1997) RGDs tetrapeptide and hippocampal in vitro kindling in rats - evidence for integrin-mediated physiological stability. *Neuroscience Letters* 231:139-142.
147. Grooms SY, Terracio L und Jones LS (1993) Anatomical localization of beta 1 integrin-like immunoreactivity in rat brain. *Experimental Neurology* 122:253-259.
148. Grosche J, Matyash V, Moller T, Verkhatsky A, Reichenbach A und Kettenmann H (1999) Microdomains for neuron-glia interaction: parallel fiber signaling to Bergmann glial cells. *Nature Neuroscience* 2:139-143.
149. Guntinas-Lichius O, Martinez-Portillo F, Lebek J, Angelov DN, Stennert E und Neiss WF (1997) Nimodipine maintains in vivo the increase in GFAP and enhances the astroglial ensheathment of surviving motoneurons in the rat following permanent target deprivation. *Journal of Neurocytology* 26:241-248.
150. Guntinas-Lichius O, Neiss WF, Schulte E und Stennert E (1996) Quantitative image analysis of the chromatolysis in rat facial and hypoglossal motoneurons following axotomy with and without reinnervation. *Cell & Tissue Research* 286:537-541.
151. Haas CA, Donath C und Kreutzberg GW (1993) Differential expression of immediate early genes after transection of the facial nerve. *Neuroscience* 53:91-99.
152. Haas CA, Streit WJ und Kreutzberg GW (1990) Rat facial motoneurons express increased levels of calcitonin gene-related peptide mRNA in response to axotomy. *Journal of Neuroscience Research* 27:270-275.
153. Hailer NP, Bechmann I, Heizmann S und Nitsch R (1997) Adhesion molecule expression on phagocytic microglial cells following anterograde degeneration of perforant path axons. *Hippocampus* 7:341-349.
154. Hao C, Guilbert LJ und Fedoroff S (1990) Production of colony-stimulating factor-1 (CSF-1) by mouse astroglia in vitro. *Journal of Neuroscience Research* 27:314-323.
155. Heck AF (1990) Permeability of intracranial blood vessels to endogenous serum albumin. *Angiology* 41:233-240.
156. Hemler ME (1990) VLA proteins in the integrin family: structures, functions and their role on leukocytes. *Annual Review Immunology* 8:365-400.
157. Heppner FL, Roth K, Nitsch R und Hailer NP (1998) Vitamin E induces ramification and downregulation of adhesion molecules in cultured microglial cells. *Glia* 22:180-188.
158. Herdegen T, Kummer W, Fiallos CE, Leah J und Bravo R (1991) Expression of c-jun, jun B, jun D proteins in rat nervous system following transection of vagus nerve and cervical sympathetic trunk. *Neuroscience* 45:413-422.
159. Hickey WF, Vass K und Lassmann H (1992) Bone marrow-derived elements in the central nervous system: an immunohistochemical and ultrastructural survey of rat chimeras. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 51:246-256.
160. Hillis GS und Macleod AM (1997) Integrins and disease. *Clinical Science* 91:639-650.
161. Hoffman JR, Dixit VM und O'Shea KS (1994) Expression of thrombospondin in the adult nervous system. *Journal of Comparative Neurology* 340:126-139.
162. Hommel M (1993) Amplification of cytoadherence in cerebral malaria: towards a more rational explanation of disease pathophysiology. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology* 87:627-635.

163. Howard M und O'Garra A (1992) Biological properties of interleukin 10. *Immunology Today* 13:198-200.
164. Hsu S-M und Soban E (1982) Color modification of diaminobenzidine (DAB) precipitation by metallic ions and its application for double immunohistochemistry. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 30:1079-1082.
165. Huitinga I, Damoiseaux JG, Dopp EA und Dijkstra CD (1993) Treatment with anti-CR3 antibodies ED7 and ED8 suppresses experimental allergic encephalomyelitis in Lewis rats. *European Journal of Immunology* 23:709-715.
166. Humphries MJ (1996) Integrin activation: the link between ligand binding and signal transduction. *Current Opinion in Cell Biology* 8:632-640.
167. Hynes RO (1992) Integrins: versatility, modulation and signaling in cell adhesion. *Cell* 69:11-25.
168. Ilschner S und Brandt R (1996) The transition of microglia to a ramified phenotype is associated with the formation of stable acetylated and detyrosinated microtubules. *Glia* 18:129-140.
169. Imai Y, Ibata I, Ito D, Ohsawa K und Kohsaka S (1996) A novel gene IBA1 in the major histocompatibility complex class III region encoding an EF hand protein expressed in a monocytic lineage. *Biochemical & Biophysical Research Communications* 224:855-862.
170. Ito M und Kudo M (1994) Reinnervation by axon collaterals from single facial motoneurons to multiple muscle targets following axotomy in the adult guinea pig. *Acta Anatomica* 151:124-130.
171. Janzer RC und Raff MC (1987) Astrocytes induce blood-brain barrier properties in endothelial cells. *Nature* 325:253-257.
172. Jenkins R und Hunt SP (1991) Long-term increase in the levels of c-jun mRNA and jun protein-like immunoreactivity in motor and sensory neurons following axotomy. *Neuroscience Letters* 79:347-359.
173. Jessell TM (1991) Reactions of Neurons to Injury. In Kandel ER, Schwartz JH und Jessell TM (eds): *Principles of Neural Science*. London: Prentice Hall International (UK) Limited, pp. 258-269.
174. Jiang H, Williams GJ und Dhib-Jalbut S (1997) The effect of interferon beta-1b on cytokine-induced adhesion molecule expression. *Neurochemistry International* 30:449-453.
175. Jones LL, Doetschmann T, Kreutzberg GW und Raivich G (1998) Neuroglial activation in the injured central nervous system: role of transforming growth factor- β 1. *Society of Neuroscience Abstracts* 28:710.2
176. Jones LL, Kreutzberg GW und Raivich G (1997) Regulation of CD44 in the regenerating mouse facial motor nucleus. *European Journal of Neuroscience* 9:1854-1863.
177. Jones LS (1996) Integrins: possible functions in the adult CNS. *Trends in Neurosciences* 19:68-72.
178. Jordan FL und Thomas WE (1988) Brain macrophages: questions of origin and interrelationship. *Brain Research* 472:165-178.
179. Jou I, Pyo H, Chung S, Jung SY, Gwag BJ und Joe EH (1998) Expression of Kv1.5 K⁺ channels in activated microglia in vivo. *Glia* 24:408-414.
180. Kahn MA, Kumar S, Liebl D, Chang R, Parada LF und de Vellis J (1999) Mice lacking NT-3, and its receptor TrkC, exhibit profound deficiencies in CNS glial cells. *Glia* 26:153-165.
181. Kaku S, Umemura K, Mizuno A, Yano S, Suzuki K, Kawasaki T und Nakashima (1998) Evaluation of a GPIIb/IIIa antagonist YM337 in a primate model of middle cerebral artery thrombosis. *European Journal of Pharmacology* 345:185-192.
182. Kang YH, Lee CH, Brummel SE, Newball HH und Forrester J (1995) Effects of endotoxin on expression of VLA integrins by human bronchoalveolar lavage macrophages. *Journal of Leukocyte Biology* 57:624-634.
183. Kato HK, Kogure XH, Liu XH, Araki T und Itoyama Y (1996) Progressive expression of immunomolecules on activated microglia and invading leukocytes following focal cerebral ischemia in the rat. *Brain Research* 734:203-212.
184. Kent SJ, Karlik SJ, Cannon C, Hines DK, Yednock TA, Fritz LC, Horner und HC (1995) A monoclonal antibody to alpha 4 integrin suppresses and reverses active experimental allergic encephalomyelitis. *Journal of Neuroimmunology* 58:1-10.
185. Kerber G, Hager G, Hol E und Kreutzberg GW (1997) The gamma 1-chain of laminin is expressed in neurons and upregulated during regeneration of the CNS. In Elsner W und Wässle H (eds): *From membrane to mind, proceedings of the 25th Göttingen neurobiology conference 1997*. Thieme, pp. 129
186. Kettenmann H, Hoppe D, Gottmann K, Banati R und Kreutzberg GW (1990) Cultured microglial cells have a distinct pattern of membrane channels different from peritoneal macrophages. *Journal of Neuroscience Research* 26:278-287.
187. Kil SH und Bronner-Fraser M (1996) Expression of the avian alpha 7-integrin in developing nervous system and myotome. *International Journal of Developmental Neuroscience* 14:181-190.

188. Kim JS, Chopp M, Chen H, Levine SR, Carey JL und Welch KM (1995) Adhesive glycoproteins CD11a and CD18 are upregulated in the leukocytes from patients with ischemic stroke and transient ischemic attacks. *Journal of the Neurological Sciences* 128:45-50.
189. Kim LT und Yamada KM (1997) The regulation of expression of integrin receptors. *Proceedings of the Society for Experimental Biology & Medicine* 241:123-131.
190. Kishima H, Shimizu K, Tamura K, Miyao Y, Mabuchi E, Tominaga E, Matsuzaki J und Hayakawa T (1999) Monoclonal antibody ONS-M21 recognizes integrin alpha3 in gliomas and medulloblastomas. *British Journal of Cancer* 79:333-339.
191. Klein MA, Möller JC, Jones LL, Bluethmann H, Kreutzberg GW und Raivich G (1997) Impaired neuroglial activation in interleukin-6 deficient mice. *Glia* 19:227-233.
192. Kloss CUA, Kreutzberg GW und Raivich G (1999) Constitutive expression of endothelial NOS and upregulation in the regenerating mouse brain on grey matter astrocytes. *Acta Neuropathologica* 5:533 (Abstract).
193. Kreutzberg GW (1963) Changes of coenzym (TPN) diaphorase and TPN-linked dehydrogenase during axonal reaction of the nerve cell. *Nature* 199:393-394.
194. Kreutzberg GW (1995a) Microglia, the first line of defence in brain pathologies. *Arzneimittel-Forschung/Drug Research* 45-1:357-360.
195. Kreutzberg GW (1995b) Reaction of the neuronal cell body to axonal damage. In Waxman SG, Kocsis JD und Stys PK (eds): *The Axon*. Oxford University Press, pp. 355-374.
196. Kreutzberg GW (1996) Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends in Neurosciences* 19:312-318.
197. Kreutzberg GW, Graeber MB, Raivich G und Streit WJ (1990) Neuron-glia relationship during regeneration of motoneurons. In Giuffrida-Stella A (ed): *Regulation of gene expression in the nervous system*. Wiley-Liss, Inc., pp. 333-341.
198. Kreutzberg GW, und Raivich G (1999) Neurobiology of regeneration and degeneration. In *The Facial Nerve*. pp. 65-77.
199. Kreutzberg GW, Tetzlaff W und Tóth L (1984) Cytochemical changes of cholinesterases in motor neurons during regeneration. In Brzin M, Barnard EA und Sked D (eds): *Cholinesterases - fundamental and applied aspects*. Berlin: Walter de Gruyter, pp. 273-288.
200. Kuecherer-Ehret A, Graeber MB, Edgar D, Thoenen H und Kreutzberg GW (1990) Immunoelectron microscopic localization of laminin in normal and regenerating mouse sciatic nerve. *Journal of Neurocytology* 19:101-109.
201. Kunkel EJ, Ramos CL, Steeber DA, Muller W, Wagner N, Tedder TF und Ley (1998) The roles of L-selectin, beta 7 integrins, and P-selectin in leukocyte rolling and adhesion in high endothelial venules of Peyer's patches. *Journal of Immunology* 161:2449-2456.
202. Kurz H und Christ B (1998) Embryonic CNS macrophages and microglia do not stem from circulating, but from extravascular precursors. *Glia* 22:98-102.
203. Lafortune L, Nalbantoglu J und Antel JP (1996) Expression of tumor necrosis factor alpha (TNF alpha) and interleukin 6 (IL-6) mRNA in adult human astrocytes: comparison with adult microglia and fetal astrocytes. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 55:515-521.
204. Larson RS und Springer TA (1990) Structure and function of leukocyte integrins. *Immunological Reviews* 114:181-217.
205. Lassmann H, Rinner W und Hickey WF (1994) Differential role of hematogenous macrophages, resident microglia and astrocytes in antigen presentation and tissue damage during autoimmune encephalomyelitis. *Neuropathology And Applied Neurobiology* 20:195-196.
206. Lawson LJ, Perry VH und Gordon S (1992) Turnover of resident microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience* 48:405-415.
207. Le Beau JM, Liuzzi FJ, Depto AS und Vinik AI (1995) Up-regulation of laminin B2 gene expression in dorsal root ganglion neurons and nonneuronal cells during sciatic nerve regeneration. *Experimental Neurology* 134:150-155.
208. Lee SC, Liu W, Brosnan CF und Dickson DW (1994) GM-CSF promotes proliferation of human fetal and adult microglia in primary cultures. *Glia* 12:309-318.
209. Lee SC, Liu W, Dickson DW, Brosnan CF und Berman JW (1993a) Cytokine production by human fetal microglia and astrocytes. Differential induction by lipopolysaccharide and IL-1 beta. *Journal of Immunology* 150:2659-2667.

210. Lee SC, Liu W, Roth P, Dickson DW, Berman JW und Brosnan CF (1993b) Macrophage colony-stimulating factor in human fetal astrocytes and microglia. Differential regulation by cytokines and lipopolysaccharide, and modulation of class II MHC on microglia. *Journal of Immunology* 150:594-604.
211. Lefcort F, Venstrom K, McDonald J und Reichardt T (1992) Regulation of expression of fibronectin and its receptor alpha5beta1, during development and regeneration of peripheral nerve. *Development* 116:767-782.
212. Letourneau PC, Condic ML und Snow DM (1992) Extracellular matrix and neurite outgrowth. *Current Opinion in Genetics & Development* 2:625-634.
213. Ling EA (1981) The origin and nature of microglia. In Fedoroff S und Hertz L (eds): *Advances in Cellular Neurobiology*. New York: Academic Press,
214. Ling EA und Wong WC (1993) The origin and nature of ramified and amoeboid microglia: A historical review and current concepts. *Glia* 7:9-18.
215. Liu J, Zhao ML, Brosnan CF und Lee SC (1996a) Expression of type II nitric oxide synthase in primary human astrocytes and microglia: role of IL-1beta and IL-1 receptor antagonist. *Journal of Immunology* 157:3569-3576.
216. Liu L, Kita T, Tanaka N und Kinoshita Y (1996b) The expression of tumour necrosis factor in the hypothalamus after treatment with lipopolysaccharide. *International Journal of Experimental Pathology* 77:37-44.
217. Liu W, Brosnan CF, Dickson DW und Lee SC (1994) Macrophage colony-stimulating factor mediates astrocyte-induced microglial ramification in human fetal central nervous system culture. *American Journal of Pathology* 145:48-53.
218. Lodge PA und Sriram S (1996) Regulation of microglial activation by TGF-beta, IL-10, and CSF-1. *Journal of Leukocyte Biology* 60:502-508.
219. Lou J, Chofflon M, Juillard C, Donati Y, Mili N, Siegrist CA, Grau und GE (1997) Brain microvascular endothelial cells and leukocytes derived from patients with multiple sclerosis exhibit increased adhesion capacity. *NeuroReport* 8:629-633.
220. Luckenbill-Edds L (1997) Laminin and the mechanism of neuronal outgrowth. *Brain Research - Brain Research Reviews* 23:1-27.
221. Luheshi GN (1998) Cytokines and fever. Mechanisms and sites of action. *Annals of the New York Academy of Sciences* 856:83-89.
222. Lusinskas FW und Lawler J (1994) Integrins as dynamic regulators of vascular function. *FASEB Journal* 8:929-938.
223. Mahler M, Ben-Ari Y und Represa A (1997) Differential expression of fibronectin, tenascin-C and NCAMs in cultured hippocampal astrocytes activated by kainate, bacterial lipopolysaccharide or basic fibroblast growth factor. *Brain Research* 775:63-73.
224. Malipiero UV, Frei K und Fontana A (1990) Production of hemopoietic colony-stimulating factors by astrocytes. *Journal of Immunology* 144:3816-3821.
225. Mallat M und Chamak B (1994) Brain macrophages: neurotoxic or neurotrophic effector cells. *Journal of Leukocyte Biology* 56:416-422.
226. Mander LH und Morris JF (1996) Development of microglia and macrophages in the postnatal rat pituitary. *Cell and Tissue Research* 286:347-355.
227. Martin PT und Sanes JR (1997) Integrins mediate adhesion to agrin and modulate agrin signaling. *Society of Neuroscience Abstracts* 23:557
228. Martini R (1994) Expression and functional roles of neural cell surface molecules and extracellular matrix components during development and regeneration of peripheral nerves. *Journal of Neurocytology* 23:1-28.
229. Mayer AMS (1998) Therapeutic implications of microglia activation by lipopolysaccharide and reactive oxygen species generation in septic shock and central nervous system pathologies: a review. *Medicina* 58:377-385.
230. Mazzone A und Ricevuti G (1995) Leukocyte CD11/CD18 integrins - biological and clinical relevance. *Haematologica* 80:161-175.
231. McCarthy KD und de Vellis J (1980) Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue. *Journal of Cell Biology* 85:890-902.
232. McGeer PL, Kawamata T, Walker DG, Akiyama H, Tooyama I und McGeer EG (1993) Microglia in degenerative neurological disease. *Glia* 7:84-92.

233. McKerracher L, Chamoux M und Arregui CO (1996) Role of laminin and integrin interactions in growth cone guidance. *Molecular Neurobiology* 12:95-116.
234. Merrill JE (1991) Effects of interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha on astrocytes, microglia, oligodendrocytes, and glial precursors in vitro. *Developmental Neuroscience* 13:130-137.
235. Merzbacher L (1909) *Untersuchungen über die Morphologie und Biologie der Abraumzellen im Zentralnervensystem*. Fisher Verlag.
236. Miller FD, Tetzlaff W, Bisby MA, Fawcett JW und Milner RJ (1989) Rapid induction of the major embryonic alpha-tubulin mRNA, T alpha 1, during nerve regeneration in adult rats. *Journal of Neuroscience* 9:1452-1463.
237. Moneta ME, Gehrmann J, Topper R, Banati RB und Kreutzberg GW (1993) Cell adhesion molecule expression in the regenerating rat facial nucleus. *Journal of Neuroimmunology* 45:203-206.
238. Montero-Menei CN, Sindji L, Garcion E, Mege M, Couez D, Gamelin E und Darcy F (1996) Early events of the inflammatory reaction induced in rat brain by lipopolysaccharide intracerebral injection: relative contribution of peripheral monocytes and activated microglia. *Brain Research* 724:55-66.
239. Moore R (1989) Cranial motor neurons contain either galanin- or calcitonin gene-related peptide-like immunoreactivity. *Journal of Comparative Neurology* 282:512-522.
240. Mori Y, und Lennert K (1969) *Electron Microscopic Atlas of Lymph Node Cytology and Pathology*.
241. Mousa SA (1999) Anti-integrins as a potential therapeutic target in angiogenesis. *Expert Opinion on Therapeutic Patents* 9:1237-1248.
242. Mousa SA, Mu DX und Lucchesi BR (1997) Prevention of carotid artery thrombosis by oral platelet GPIIb/IIIa antagonist in dogs. *Stroke* 28:830-835.
243. Möller JC, Klein MA, Haas S, Jones LL, Kreutzberg GW und Raivich G (1996) Regulation of thrombospondin in the regenerating mouse facial motor nucleus. *Glia* 17:121-132.
244. Murase SI und Hayashi Y (1998a) Concomitant expression of genes encoding integrin alpha V beta 5 heterodimer and vitronectin in growing parallel fibers of postnatal rat cerebellum: a possible role as mediators of parallel fiber elongation. *Journal of Comparative Neurology* 397:199-212.
245. Murase SI und Hayashi Y (1998b) Integrin alpha 1 localization in murine central and peripheral nervous system. *Journal of Comparative Neurology* 395:161-176.
246. Nakayama M, Miyake T, Gahara Y, Ohara O und Kitamura T (1995) A novel RING-H2 motif protein downregulated by axotomy: its characteristic localization at the postsynaptic density of axosomatic synapse. *Journal of Neuroscience* 15:5238-5248.
247. Navratil E, Couvelard A, Rey A, Henin D und Scoazec JY (1997) Expression of cell adhesion molecules by microvascular endothelial cells in the cortical and subcortical regions of the normal brain: an immunohistochemical analysis. *Neuropathology & Applied Neurobiology* 23:68-80.
248. Newton RA, Thiel M und Hogg N (1997) Signaling Mechanisms and the activation of leukocyte integrins. *Journal of Leukocyte Biology* 61:422-426.
249. Ng YK und Ling EA (1997) Induction of major histocompatibility class II antigen on microglial cells in postnatal and adult rats following intraperitoneal injections of lipopolysaccharide. *Neuroscience Research* 28:111-118.
250. Nissl F (1894) Über eine neue Untersuchungsmethode des Centralorgans speziell zur Feststellung der Lokalisation der Nervenzellen. *Zentralblatt für Nervenheilkunde und Psychiatrie* 17:337-344.
251. Norenberg MD (1994) Astrocyte responses to CNS injury. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 53:213-220.
252. Norton WT (1999) Cell reactions following acute brain injury: A review. *Neurochemical Research* 24:213-218.
253. O'Toole TE, Katagiri Z, Faull RJ, Peter K, Tamura R, Quaranta V, Loftus JC, Shattil SJ und Ginsberg MH (1994) Integrin cytoplasmic domains mediate inside-out signal transduction. *Journal of Cell Biology* 124:1047-1059.
254. Ohna M, Komiyama A, Martin PM und Suzuki K (1993) Proliferation of microglia/macrophages in the demyelinating CNS and PNS of twitcher mouse. *Brain Research* 602:268-274.
255. Ohno K, Suzumura A, Sawada M und Marunouchi T (1990) Production of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor by cultured astrocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 169:719-724.
256. Okada Y, Copeland BR, Hamann GF, Koziol JA, Cheresch DA und del Zoppo GJ (1996) Integrin alphaV beta3 is expressed in selected microvessels after focal cerebral ischemia. *American Journal of Pathology* 149:37-44.

257. Oswald IP, Gazzinelli RT, Sher A und James SL (1992) IL-10 synergizes with IL-4 and transforming growth factor-beta to inhibit macrophage cytotoxic activity. *Journal of Immunology* 148:3578-3582.
258. Palacios G, Mengod G, Sarasa M, Baudier J und Palacios JM (1994) De novo synthesis of GAP-43: in situ hybridization histochemistry and light and electron microscopy immunocytochemical studies in regenerating motor neurons of cranial nerve nuclei in the rat brain. *Brain Research Molecular Brain Research*. 24:107-117.
259. Parent C und Eichacker PQ (1900) Neutrophil and endothelial cell interactions in sepsis. The role of adhesion molecules. *Infectious Disease Clinics of North America* 13:427-447.
260. Park JH und Shin SH (1996) Induction of IL-12 gene expression in the brain in septic shock. *Biochemical & Biophysical Research Communications* 224:391-396.
261. Pasinetti GM, Nichols NR, Tocco G, Morgan T, Laping N und Finch CE (1993) Transforming growth factor beta 1 and fibronectin messenger RNA in rat brain: responses to injury and cell-type localization. *Neuroscience* 54:893-907.
262. Paulus W, Baur I, Schuppan D und Roggendorf W (1993) Characterization of integrin receptors in normal and neoplastic human brain. *American Journal of Pathology* 143:154-163.
263. Paulus W und Jellinger K (1993) Comparison of integrin adhesion molecules expressed by primary brain lymphomas and nodal lymphomas. *Acta Neuropathologica* 86:360-364.
264. Pearlman AL und Sheppard AM (1996) Extracellular matrix in early cortical development. *Progress in Brain Research* 108:117-134.
265. Pedersen EB, McNulty JA, Castro AJ, Fox LM, Zimmer J und Finsen B (1997) Enriched immune-environment of blood-brain barrier deficient areas of normal adult rats. *Journal of Neuroimmunology* 76:117-131.
266. Peress NS, Fleit HB, Perillo E, Kuljis R und Pezzullo C (1993) Identification of FC gamma RI, II and III on normal human brainramified microglia and on microglia insenile plaques in Alzheimer's disease. *Journal of Neuroimmunology* 48:71-79.
267. Perry VH, Andersson P-B und Gordon S (1991) Macrophages and the nervous system. *Int Rev Cytol* 125:203-244.
268. Perry VH, Bell MD, Brown HC und Matyszak MK (1995) Inflammation in the nervous system. *Current Opinion in Neurobiology* 5:636-641.
269. Perry VH und Gordon S (1988) Macrophages and microglia in the nervous system. *Trends in Neurosciences* 11:273-277.
270. Perry VH, Hume DA und Gordon S (1985) Immunohistochemical localization of macrophages and microglia in the adult and developing mouse brain. *Neuroscience* 15:313-326.
271. Peterson PK, Hu S, Sheng WS, Kravitz FH, Molitor TW, Chatterjee D und Chao CC (1995) Thalidomide inhibits tumor necrosis factor-alpha production by lipopolysaccharide- and lipoarabinomannan-stimulated human microglial cells. *Journal of Infectious Diseases* 172:1137-1140.
272. Pinkstaff JK, Lynch G und Gall CM (1998) Localization and seizure-regulation of integrin beta-1 mRNA in adult rat brain. *Molecular Brain Research* 55:265-276.
273. Powell SK und Kleinman HK (1997) Neuronal laminins and their cellular receptors. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 29:401-414.
274. Previtali S, Quattrini A, Nemni R, Truci G, Ducati A, Wrabetz L und Canal N (1996) Alpha6 beta4 and alpha6 beta1 integrins in astrocytomas and other CNS tumors. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 55:456-465.
275. Previtali SC, Archelos JJ und Hartung HP (1997) Modulation of the expression of integrins on glial cells during experimental autoimmune encephalomyelitis. A central role for TNF-alpha. *American Journal of Pathology* 151:1425-1435.
276. Previtali SC, Archelos JJ und Hartung HP (1998) Expression of integrins in experimental autoimmune neuritis and Guillain-Barre syndrome. *Annals of Neurology* 44:611-621.
277. Previtali SC, Quattrini A, Pardini CL, Nemni R, Feltri ML, Boncinelli, Canal N und Wrabetz L (1999) Laminin receptor alpha 6 beta 4 integrin is highly expressed in ENU-induced glioma in rat. *Glia* 26:55-63.
278. Prieto J, Eklund A und Patarroyo M (1994) Regulated expression of integrins and other adhesion molecules during differentiation of monocytes into macrophages. *Cellular Immunology* 156:191
279. Quan N, Stern EL, Whiteside MB und Herkenham M (1999) Induction of pro-inflammatory cytokine mRNAs in the brain after peripheral injection of subseptic doses of lipopolysaccharide in the rat. *Journal of Neuroimmunology* 93:72-80.

280. Quan N, Whiteside M und Herkenham M (1998) Time course and localization patterns of interleukin-1beta messenger RNA expression in brain and pituitary after peripheral administration of lipopolysaccharide. *Neuroscience* 83:281-293.
281. Raivich G (1997) Aufklärung der molekularen Signale im verletzten Nervensystem. Habilitationsschrift an der medizinischen Fakultät der LMU München.
282. Raivich G, Bluethmann H und Kreutzberg GW (1996) Signaling molecules and neuroglial activation in the injured central nervous system. *Keio Journal of Medicine* 45:239-247.
283. Raivich G, Bohatschek M, Kloss CUA, Werner A, Jones LL und Kreutzberg GW (1999) Neuroglial activation repertoire in the injured brain: graded response, molecular mechanisms and cues to physiological function. *Brain Research Reviews* 30:77-105.
284. Raivich G, Gehrmann J, Graeber MB und Kreutzberg GW (1993) Quantitative immunohistochemistry in the rat facial nucleus with [125I]-iodinated secondary antibodies and in situ autoradiography: non-linear binding characteristics of primary monoclonal and polyclonal antibodies. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 41:579-592.
285. Raivich G, Gehrmann J und Kreutzberg GW (1991) Increase of macrophage colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptors in the regenerating rat facial nucleus. *Journal of Neuroscience Research* 30:682-686.
286. Raivich G, Haas S, Werner A, Klein MA, Kloss CUA und Kreutzberg GW (1998a) Regulation of MCSF receptors on microglia in the normal and injured mouse central nervous system: a quantitative immunofluorescence study using confocal laser microscopy. *Journal of Comparative Neurology* 395:342-358.
287. Raivich G, Jones LL, Kloss CUA, Werner A, Neumann H und Kreutzberg GW (1998b) Immune surveillance in the injured nervous system: T-lymphocytes invade the axotomized mouse facial motor nucleus and aggregate around sites of neuronal degeneration. *Journal of Neuroscience* 18:5804-5816.
288. Raivich G, Moreno-Flores MT, Möller JC und Kreutzberg GW (1994) Inhibition of posttraumatic microglial proliferation in a genetic model of macrophage colony-stimulating factor deficiency in the mouse. *European Journal of Neuroscience* 6:1615-1618.
289. Raivich G, Reddington M, Haas CA und Kreutzberg GW (1995) Peptides in motoneurons. *Progress in Brain Research* 104:3-20.
290. Reichardt LF und Tomaselli KJ (1991) Extracellular matrix molecules and their receptors: functions in neural development. *Annual Review of Neuroscience* 14:531-570.
291. Reid DM, Perry VH, Andersson PB und Gordon S (1993) Mitosis and apoptosis of microglia in vivo induced by an anti-CR3 antibody which crosses the blood-brain barrier. *Neuroscience* 56:529-533.
292. Rieske E, Graeber MB, Tetzlaff W, Czlonkowska A, Streit WJ und Kreutzberg GW (1989) Microglia and microglia-derived brain macrophages in culture: generation from axotomized rat facial nuclei, identification and characterization in vitro. *Brain Research* 492:1-14.
293. Rinaman L, Card JP und Enquist LW (1993) Spatiotemporal responses of astrocytes, ramified microglia, and brain macrophages to central neuronal infection with pseudorabies virus. *Journal of Neuroscience* 13:685-702.
294. Ringheim GE (1995) Mitogenic effects of interleukin-5 on microglia. *Neuroscience Letters* 201:131-134.
295. Rosen H und Gordon S (1990) The role of the type 3 complement receptor in the induced recruitment of myelomonocytic cells to inflammatory sites in the mouse. *American Journal of Respiratory Cell & Molecular Biology* 3:3-10.
296. Rossino P, Defilippi P, Silengo L und Tarone G (1991) Up-regulation of the integrin alpha 1/beta 1 in human neuroblastoma cells differentiated by retinoic acid: correlation with increased neurite outgrowth response to laminin. *Cell Regulation* 2:1021-1033.
297. Rozdzinski E und Tuomanen E (1995) Adhesion of microbial pathogens to leukocyte integrins: methods to study ligand mimicry. *Methods in Enzymology* 253:3-12.
298. Rubio MA, Sotillos M, Jochems G, Alvarez V und Corbi AL (1995) Monocyte activation: rapid induction of alpha 1/beta 1 (VLA-1) integrin expression by lipopolysaccharide and interferon-gamma. *European Journal of Immunology* 25:2701-2705.
299. Ruoslahti E (1991) Integrins. *Journal of Clinical Investigation* 87:1-5.
300. Ruoslahti E (1996a) Integrin signaling and matrix assembly. *Tumour Biology* 17:117-124.
301. Ruoslahti E (1996b) RGD and other recognition sequences for integrins. *Annual Review of Cell & Developmental Biology* 12:697-715.
302. Sagar SM, Price KJ, Kasting NW und Sharp FR (1995) Anatomic patterns of Fos immunostaining in rat brain following systemic endotoxin administration. *Brain Research Bulletin* 36:381-392.

303. Saika T, Kiyama H, Tohyama M und Matsunaga T (1993) GAP-43 mRNA expression in facial motoneurons during regeneration: in situ hybridization histochemistry study using an alkaline phosphatase-labelled probe. *Acta Oto-Laryngologica - Supplement* 501:80-84.
304. Sakaguchi DS und Radke K (1996) beta 1 integrins regulate axon outgrowth and glial cell spreading on a glial-derived extracellular matrix during development and regeneration. *Developmental Brain Research* 97:235-250.
305. Saper CB (1998) Neurobiological basis of fever. *Annals of the New York Academy of Sciences* 856:90-94.
306. Sasseville VG, Newman W, Brodie SJ, Hesterberg P, Pauley D, Ringler und DJ (1994) Monocyte adhesion to endothelium in simian immunodeficiency virus-induced AIDS encephalitis is mediated by vascular cell adhesion molecule-1/alpha 4 beta 1 integrin interactions. *American Journal of Pathology* 144:27-40.
307. Sawada M, Itoh Y, Suzumura A und Marunouchi T (1993) Expression of cytokine receptors in cultured neuronal and glial cells. *Neuroscience Letters* 160:131-134.
308. Sawada M, Kondo N, Suzumura A und Marunouchi T (1989) Production of tumor necrosis factor-alpha by microglia and astrocytes in culture. *Brain Research* 491:394-397.
309. Sawada M, Suzumura A und Marunouchi T (1995) Induction of functional interleukin-2 receptor in mouse microglia. *Journal of Neurochemistry* 64:1973-1979.
310. Sawada M, Suzumura A, Yamamoto H und Marunouchi T (1990) Activation and proliferation of the isolated microglia by colony stimulating factor-1 and possible involvement of protein kinase C. *Brain Research* 509:119-124.
311. Schlüter D, Bertsch D, Frei K, Hubers SB, Wiestler OD, Hof H, Fontana A und Deckert-Schlüter M (1998) Interferon-gamma antagonizes transforming growth factor-beta2-mediated immunosuppression in murine *Toxoplasma* encephalitis. *Journal of Neuroimmunology* 81:38-48.
312. Schmidt CE, Dai J, Lauffenburger D, Sheetz MP und Horwith AF (1995) Integrin-cytoskeletal interactions in neuronal growth cones. *Journal of Neuroscience* 15:3400-3407.
313. Schmidtmayer J, Jacobsen C, Miksch G und Sievers J (1994) Blood monocytes and spleen macrophages differentiate into microglia-like cells on monolayers of astrocytes: membrane currents. *Glia* 12:259-267.
314. Schwartz MA, Schaller MD und Ginsberg MH. Integrins - emerging paradigms of signal transduction. 11. 1995.
315. Sheppard AM, Onken MD, Rosen GD, Noakes PG und Dean DC (1994) Expanding roles for alpha 4 integrin and its ligands in development. *Cell Adhesion & Communication* 2:27-43.
316. Si QS, Nakamura Y, Ogata T, Kataoka K und Schubert P (1998) Differential regulation of microglial activation by propentofylline via camp signaling. *Brain Research* 812:97-104.
317. Sievers J, Parwaresch R und Wottge HU (1994a) Blood monocytes and spleen macrophages differentiate into microglia-like cells on monolayers of astrocytes: morphology. *Glia* 12:245-258.
318. Sievers J, Schmidtmayer J und Parwaresch R (1994b) Blood monocytes and spleen macrophages differentiate into microglia-like cells when cultured on astrocytes. *Annals of Anatomy* 176:45-51.
319. Sinatra RS und Ford DH (1979) The effects of acute and chronic morphine treatment on the process of facial nerve regeneration. *Brain Research* 175:315-325.
320. Singer P und Mehler S (1986) Glucose, leucine uptake in the hypoglossal nucleus after hypoglossal nerve transection with and without prevented regeneration in the Spague-Dawley rat. *Neuroscience Letters* 67:73-77.
321. Skene JHP (1989) Axonal growth-associated proteins. *Annual Review of Neuroscience* 12:127-156.
322. Smith ME, van der Maesen K und Somera FP (1998) Macrophage and microglial responses to cytokines in vitro: phagocytic activity, proteolytic enzyme release, and free radical production. *Journal of Neuroscience Research* 54:68-78.
323. Sobel RA, Chen M, Maeda A und Hinojoza JR (1995) Vitronectin and integrin vitronectin receptor localization in multiple sclerosis lesions. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 54:202-213.
324. Sobel RA, Hinojoza JR, Maeda A und Chen M (1998) Endothelial cell integrin laminin receptor expression in multiple sclerosis lesions. *American Journal of Pathology* 153:405-415.
325. Soilu-Hanninen M, Roytta M, Salmi A und Salonen R (1997) Therapy with antibody against leukocyte integrin VLA-4 (CD49d) is effective and safe in virus-facilitated experimental allergic encephalomyelitis. *Journal of Neuroimmunology* 72:95-105.
326. Soreide AJ (1981a) Variations in the axon reaction after different types of nerve lesion. Light and electron microscopic studies on the facial nucleus of the rat. *Acta Anatomica* 110:173-188.

327. Soreide AJ (1981b) Variations in the axon reaction in animals of different ages. A light microscopic study on the facial nucleus of the rat. *Acta Anatomica* 110:40-47.
328. Soriano SG, Coxon A, Wang YF, Frosch MP, Lipton SA, Hickey PR und Mayadas TN (1999) Mice deficient in Mac-1 (CD11b/CD18) are less susceptible to cerebral ischemia/reperfusion injury. *Stroke* 30:134-139.
329. Springer TA (1995) Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. *Annual Review of Physiology* 57:827-872.
330. Sternberger LA (1986) *Immunocytochemistry*. New York: John Wiley & Sons.
331. Stewart M und Hogg N (1996) Regulation of leukocyte integrin function: Affinity vs. avidity. *Journal of Cellular Biochemistry* 61:554-561.
332. Streit WJ, Dumoulin FL, Raivich G und Kreutzberg GW (1989a) Calcitonin gene-related peptide increases in rat facial motoneurons after peripheral nerve transection. *Neuroscience Letters* 101:143-148.
333. Streit WJ, Graeber MB und Kreutzberg GW (1988) Functional plasticity of microglia: a review. *Glia* 1:301-307.
334. Streit WJ, Graeber MB und Kreutzberg GW (1989b) Expression of Ia antigen on perivascular and microglial cells after sublethal and lethal motor neuron injury. *Experimental Neurology* 105:115-126.
335. Streit WJ, Graeber MB und Kreutzberg GW (1989c) Peripheral nerve lesion produces increased levels of major histocompatibility complex antigens in the central nervous system. *Journal of Neuroimmunology* 21:117-123.
336. Streit WJ und Kreutzberg GW (1988) Response of endogenous glial cells to motor neuron degeneration induced by toxic ricin. *Journal of Comparative Neurology* 268:248-263.
337. Streit WJ, Walter SA und Pennell NA (1999) Reactive microgliosis. *Progress in Neurobiology* 57:563-581.
338. Suzumura A, Marunouchi T und Yamamoto H (1991) Morphological transformation of microglia in vitro. *Brain Research* 545:301-306.
339. Suzumura A, Sawada M, Marunouchi T und Yamamoto H (1993a) Proliferation of microglia with IL-4. *Neuroimmunology* 1:122-123.
340. Suzumura A, Sawada M, Yamamoto H und Marunouchi T (1990) Effects of colony stimulating factors on isolated microglia in vitro. *Journal of Neuroimmunology* 30:111-120.
341. Suzumura A, Sawada M, Yamamoto H und Marunouchi T (1993b) Transforming growth factor-beta suppresses activation and proliferation of microglia in vitro. *Journal of Immunology* 151:2150-2158.
342. Svenningsson A, Hansson GK, Andersen O, Andersson R, Patarroyo M und Stemme S (1993) Adhesion molecule expression on cerebrospinal fluid T lymphocytes: evidence for common recruitment mechanisms in multiple sclerosis, aseptic meningitis, and normal controls. *Annals of Neurology* 34:155-161.
343. Swerlick RA, Garcia-Gonzalez E, Kubota Y, Xu YL und Lawley TJ (1991) Studies of the modulation of MHC antigen and cell adhesion molecule expression on human dermal microvascular endothelial cells. *Journal of Investigative Dermatology* 97:190-196.
344. Tamkun JW, DeSimone DW, Fonda D, Patel RS, Buck C, Horwitz AF und Hynes RO (1986) Structure of integrin, a glycoprotein involved in the transmembrane linkage between fibronectin and actin. *Cell* 46:271-282.
345. Tanaka J und Maeda N (1996) Microglial ramification requires nondiffusible factors derived from astrocytes. *Experimental Neurology* 137:367-375.
346. Tanaka J, Toku K, Sakanaka M und Maeda N (1999) Morphological differentiation of microglial cells in culture: involvement of insoluble factors derived from astrocytes. *Neuroscience Research* 34:207-215.
347. Taskinen HS, Heino J und Roytta M (1995) The dynamics of beta-1 integrin expression during peripheral nerve regeneration. *Acta Neuropathologica* 89:144-151.
348. Tawil NJ, Wilson P und Carbonetto S (1994) Expression and distribution of functional integrins in rat CNS glia. *Journal of Neuroscience Research* 39:436-447.
349. Terpe HJ, Stark H, Ruiz P und Imhof BA (1994) Alpha 6 integrin distribution in human embryonic and adult tissues. *Histochemistry* 101:41-49.
350. Tetzlaff W, Alexander SW, Miller FD und Bisby MA (1991) Response of facial and rubrospinal neurons to axotomy: changes in mRNA expression for cytoskeletal proteins and GAP-43. *Journal of Neuroscience* 11:2528-2544.
351. Tetzlaff W, Bisby MA und Kreutzberg GW (1988a) Changes in cytoskeletal proteins in the rat facial nucleus following axotomy. *Journal of Neuroscience* 8:3181-3189.
352. Tetzlaff W, Graeber MB, Bisby MA und Kreutzberg GW (1988b) Increased glial fibrillary acidic protein synthesis in astrocytes during retrograde reaction of the rat facial nucleus. *Glia* 1:90-95.

353. Tetzlaff W, Zwiers H, Lederis K, Cassar L und Bisby MA (1989) Axonal transport and localization of B-50/GAP-43-like immunoreactivity in regenerating sciatic and facial nerves of the rat. *Journal of Neuroscience* 9:1303-1313.
354. Théry C und Mallat M (1993) Influence of interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha on the growth of microglial cells in primary cultures of mouse cerebral cortex: involvement of colony-stimulating factor 1. *Neuroscience Letters* 150:195-199.
355. Théry C, Stanley ER und Mallat M (1992) Interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha stimulate the production of colony stimulating factor 1 by murine astrocytes. *Journal of Neurochemistry* 59:1183-1186.
356. Tian M, Jacobson C, Gee SH, Campbell KP, Carbonetto S und Jucker M (1996) Dystroglycan in the cerebellum is a laminin alpha 2-chain binding protein at the glial-vascular interface and is expressed in Purkinje cells. *European Journal of Neuroscience* 8:2739-2747.
357. Toku K, Tanaka J, Fujikata S, Hamamoto Y, Horikawa Y, Miyoshi K, Tateishi N, Suzuki Y und Maeda N (1999) Distinctions between microglial cells and peripheral macrophages with regard to adhesive activities and morphology. *Journal of Neuroscience Research* 57:855-865.
358. Tomaselli KJ, Doherty P, Emmett CJ, Damsky CH, Walsh FS und Reichardt LF (1993) Expression of beta 1 integrins in sensory neurons of the dorsal root ganglion and their functions in neurite outgrowth on two laminin isoforms. *Journal of Neuroscience* 13:4880-4888.
359. Tonn JC, Wunderlich S, Kerkau S, Klein CE und Roosen K (1998) Invasive behaviour of human gliomas is mediated by interindividually different integrin patterns. *Anticancer Research* 18:2599-2605.
360. Tornquist E, Liu L, Mattsson P und Svensson M (1997) Response of glial cells and activation of complement following motorneuron degeneration induced by toxic ricin. *Neuroscience Research* 28:167-175.
361. Torvik A und Skjörten F (1971) Electron microscopic observations on nerve cell regeneration and degeneration after axon lesions. I. Changes in the nerve cell cytoplasm. *Acta Neuropathologica* 17:248-264.
362. Torvik A und Soreide AJ (1975) The perineuronal glial reaction after axotomy. *Brain Research* 95:519-529.
363. Tsacopoulos M und Magistretti PJ (1996) Metabolic coupling between glia and neurons. *Journal of Neuroscience* 16:877-885.
364. Tunkel AR, Rossen SW, Hansen EJ und Scheld WM (1991) Blood-brain barrier alterations in bacterial meningitis: development of an in vitro model and observations on the effects of lipopolysaccharide. *In Vitro Cellular & Developmental Biology* 27A:113-120.
365. van Dam AP, Bauer J, Tilders FJH und Berkenbosch F (1995) Endotoxin-induced appearance of immunoreactive interleukin-1 beta in ramified microglia in rat brain - a light and electron microscopic study. *Neuroscience* 65:815-826.
366. van Gool D, Carmeliet G, Triaux E, Cassiman JJ und Dom R (1994) Appearance of localized immunoreactivity for the alpha 4 integrin subunit and for fibronectin in brains from Alzheimer's, Lewy body dementia patients and aged controls. *Neuroscience Letters* 170:71-73.
367. van Koughnet K, Smirnova O, Hyman SE und Borsook D (1999) Proenkephalin transgene regulation in the paraventricular nucleus of the hypothalamus by lipopolysaccharide and interleukin-1 beta. *Journal of Comparative Neurology* 405:199-215.
368. Varner JA, Emerson DA und Juliano RL (1995) Integrin alpha 5 beta 1 expression negatively regulates cell growth: Reversal by attachment to fibronectin. *Molecular Biology of the Cell* 6:725-740.
369. Vaughan DW (1990) Effects of advancing age on the central response of rat facial neurons to axotomy: light microscope morphometry. *Anatomical Record* 228:211-219.
370. Vedeler C, Ulvestad E, Grundt I, Conti G, Nyland H, Matre R und Pleasure D (1994) Fc receptor for IgG (FcR) on rat microglia. *Journal of Neuroimmunology* 49:19-24.
371. Velling T, Collo G, Sorokin L, Durbeek M, Zhang H und Gullberg D (1996) Distinct alpha 7A beta 1 and alpha 7B beta 1 integrin expression patterns during mouse development: alpha 7A is restricted to skeletal muscle but alpha 7B is expressed in striated muscle, vasculature, and nervous system. *Developmental Dynamics* 207:355-371.
372. Vora AJ, Perkin GD, McCoy T, Dumonde DC und Brown KA (1996) Enhanced binding of lymphocytes from patients with multiple sclerosis to tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha)-treated endothelial monolayers: associations with clinical relapse and adhesion molecule expression. *Clinical & Experimental Immunology* 105:155-162.
373. Wagner N und Müller W (1998) Functions of alpha 4- and beta 7-integrins in hematopoiesis, lymphocyte trafficking and organ development. *Current Topics in Microbiology & Immunology* 231:23-32.

374. Wagner S, Tagaya M, Koziol JA, Quaranta V und del Zoppo GJ (1997) Rapid disruption of an astrocyte interaction with the extracellular matrix mediated by integrin alpha 6 beta 4 during focal cerebral ischemia/reperfusion. *Stroke* 28:858-865.
375. Wang YG, Hirai KI, Shimada H, Taji S und Zhong SZ (1992) Behavior of axons, Schwann cells and perineurial cells in nerve regeneration within transplanted nerve grafts: effects of anti-laminin an anti-fibronectin antisera. *Brain Research* 583:216-226.
376. Webersinke G, Bauer H, Amberger A, Zach O und Bauer HC (1992) Comparison of gene expression of extracellular matrix molecules in brain microvascular endothelial cells and astrocytes. *Source Biochemical & Biophysical Research Communications* 189:877-884.
377. Weeks BS (1998) The role of HIV-1 activated leukocyte adhesion mechanisms and matrix metalloproteinase secretion in AIDS pathogenesis (Review). *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 1:361-366.
378. Wei JY, Shaw LM und Mercurio AM (1997) Integrins signaling in leukocytes - lessons from the alpha6 beta1 integrin. *Journal of Leukocyte Biology* 61:397-407.
379. Werner A, Kloss CUA, Walter J, Kreutzberg GW und Raivich G (1998) Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in the mouse facial motor nucleus after axonal injury and during regeneration. *Journal of Neurocytology* 27:219-232.
380. Werner A, Willem M, Jones LL, Kreutzberg GW, Mayer U und Raivich G (2000) Impaired Axonal Regeneration in $\alpha 7$ Integrin-Deficient Mice. *Journal of Neuroscience* 20:1822-1830.
381. Westerfield M (1987) Substrate interactions affecting motor growth cone guidance during development and regeneration. *Journal of Experimental Biology* 132:161-175.
382. Wiktor-Jedrejczak W, Bartocci A, Ferrante AW, Ahmed-Ansari A, Sell KW, Pollard JW und Stanlay ER (1990) Total absence of colony-stimulating factor 1 in the macrophage-deficient osteopetrotic (op/op) mouse. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 87:4828-4832.
383. Williams K, Bar-Or A, Ulvestad E, Olivier A, Antel JP und Yong VW (1992) Biology of adult human microglia in culture: comparisons with peripheral blood monocytes and astrocytes. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 51:538-549.
384. Wilms H, Hartmann D und Sievers J (1997) Ramification of microglia, monocytes and macrophages in vitro: influences of various epithelial and mesenchymal cells and their conditioned media. *Cell & Tissue Research* 287:447-458.
385. Wilms H, Wollmer MA und Sievers J (1999) In vitro-staining specificity of the antibody 5-D-4 for microglia but not for monocytes and macrophages indicates that microglia are a unique subgroup of the myelomonocytic lineage. *Journal of Neuroimmunology* 98:89-95.
386. Xiao BG, Zhang GX, Ma CG und Link H (1996) Transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta-1)-mediated inhibition of glial cell proliferation and down-regulation of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) are interrupted by interferon-gamma (IFN-gamma). *Clinical & Experimental Immunology* 103:475-481.
387. Xu J und Ling EA (1994) Upregulation and induction of surface antigens with special reference to MHC class II expression in microglia in postnatal rat brain following intravenous or intraperitoneal injections of lipopolysaccharide. *Journal of Anatomy* 184:285-296.
388. Yamazaki T, Koo EH und Selkoe DJ (1997) Cell surface amyloid beta-protein precursor colocalizes with beta 1 integrins at substrate contact sites in neural cells. *Journal of Neuroscience* 17:1004-1010.
389. Yang Y, Cardarelli PM, Lehnert K, Rowland S und Krissansen GW (1998) LPAM-1 (integrin alpha 4 beta 7)-ligand binding: overlapping binding sites recognizing VCAM-1, MAdCAM-1 and CS-1 are blocked by fibrinogen, a fibronectin-like polymer and RGD-like cyclic peptides. *European Journal of Immunology* 28:995-1004.
390. Yednock TA, Cannon C, Fritz LC, Sanchez-Madrid F, Steinman L und Karin (1992) Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against alpha 4 beta 1 integrin. *Nature* 356:63-66.
391. Yenari MA, Kunis D, Sun GH, Onley D, Watson L, Turner S, Whitaker S und Steinberg GK (1998) Hu23F2G, an antibody recognizing the leukocyte CD11/CD18 integrin, reduces injury in a rabbit model of transient focal cerebral ischemia. *Experimental Neurology* 153:223-233.
392. Yoshimoto T, Houkin K und Abe H (1996) Intracellular adhesion molecule-1 and lymphocyte function-associated antigen-1 expression in a rat forebrain reperfusion model. *Neurologia Medico-Chirurgica* 36:67-71.
393. Yu WH (1989) Survival of motoneurons following axotomy is enhanced by lactation or by progesterone treatment. *Brain Research* 491:379-382.

394. Yu WH (1994) Nitric oxide synthase in motor neurons after axotomy. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 42:451-457.
395. Zhang ZG, Chopp M, Tang WX, Jiang N und Zhang RL (1995) Postischemic treatment (2-4 h) with anti-CD11b and anti-CD18 monoclonal antibodies are neuroprotective after transient (2 h) focal cerebral ischemia in the rat. *Brain Research* 698:79-85.
396. Ziaber J, Pasnik J, Baj Z, Pokoca L, Chmielewski H und Tchorzewski H (1998) The immunoregulatory abilities of polymorphonuclear neutrophils in the course of multiple sclerosis. *Mediators of Inflammation* 7:335-338.
397. Zielasek J und Hartung HP (1996) Molecular mechanisms of microglial activation. *Advances in Neuroimmunology* 6:191-222.
398. Zimmermann H, Vogel M und Laube U (1993) Hippocampal localization of 5'-nucleotidase as revealed by immunocytochemistry. *Neuroscience* 55:105-112.
399. Zuckerman SH, Gustin J und Evans GF (1998) Expression of CD54 (intercellular adhesion molecule-1) and the beta 1 integrin CD29 is modulated by a cyclic AMP dependent pathway in activated primary rat microglial cell cultures. *Inflammation* 22:95-106.

7 Abkürzungen und Fremdwörter

%	Prozent
°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
ABC	Vectorstain® ABC Kit
AF	Autofluoreszenz
AIDS	erworbenes Immunschwächesyndrom (englisch "acquired immuno-deficiency syndrome")
BDNF	Gehirnnervenwachstumsfaktor (englisch "brain derived neurotrophic factor")
BHS	Blut-Hirn-Schranke
bFGF	basischer Fibroblastenwachstumsfaktor (englisch "basic fibroblast growth factor")
bidest.	bidestilliert
BSA	Rinderalbumin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
Ci	Curie
CD	Unterscheidungsmerkmal (englisch "cluster of differentiation")
CGRP	Kalzitoningen-verwandtes Protein (englisch "calcitonin gene related peptide")
CR3	Komplement-Rezeptor 3
DAB	3,3'-Diaminobenzidin (3,3',4,4'-Tetraaminobiphenyl)
dest.	destilliert
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMEM	Dulbeccos Modifiziertes Eagle Medium
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
EAE	experimentelle Autoimmunenzephalitis
EZM	extrazelluläre Matrix
FAK	fokale Adhäsionskinase
FC γ	Fc-Teil der IgG
FC γ R	Rezeptor für den Fc-Teil der IgG
FCS	Fötale Kälberserum
FI	Färbeintensität
FITC	Fluoreszein-5-Isothiozyanat
g	Gramm bzw. Konstante der Erdbeschleunigung (9,81 kg x m ² :s ²)
gp	Glykoprotein
GalC	Galaktozerebroside
GAP	wachstumsassoziierte Protein (englisch "growth associated protein")
GBM	Glioblastoma multiforme
GFAP	sauerer Gliafaserprotein (englisch "glial fibrillary acidic protein")
GMCSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
HEV	hohe, endotheliale Venuolen
HIV	Humanes Immundefizienzvirus (englisch "human immunodeficiency virus")
HRP	Meerrettichperoxidase (englisch "horse radish peroxidase")
ICAM	interzelluläres Adhäsionsmolekül (englisch "intercellular adhesion molecule")
ICC	Immunzytochemie
Ig	Immunglobuline
IgG	Immunglobulin G
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
in vitro	in Kultur
in vivo	im Gewebe
IFN γ	Interferon- γ
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxids-Synthase
IR	Immunoreaktivität
l	Liter

LDL	englisch "low density lipoproteins"
LIF	Leukämie inhibierender Faktor
LPAM1	englisch "leukocyte Peyer's patch HEV adhesion molecule"
LPS	Lipopolysaccharide
MAdCAM	englisch "mucosal addressing cell adhesion molecule"
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MCSF	Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
MCSFR	Rezeptor für MCSF
MHC	Haupthistokompatibilitätsantigen (englisch "major histocompatibility complex")
MS	Multiple Sklerose
μg	Mikrogramm (= 10^{-6} Gramm)
μl	Mikroliter (= 10^{-6} Liter)
ml	Milliliter (= 10^{-3} Liter)
MPI	Max-Planck-Institut
NADPH	reduziertes Nikotinsäureamid-adenin-dinucleotid-phosphat
NO	Stickstoffmonoxid
NT3	Neurotrophin-3
OLV	optischer Lichtwert (englisch "optical luminosity value")
p	Fehler erster Art
PB	Phosphat-Puffer
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PFA	Paraformaldehyd
Pixel	Bildpunkt
RGB	Rot-Grün-Blau (englisch "Red Green Blue")
RISC	relativer Färbefaktor (englisch "relative intensity of staining or contrast factor")
ROI	Auswertungsgebiet (englisch "region of interest")
rpm	Umdrehungen pro Minute (englisch "rounds per minute")
RT	Raumtemperatur
SFM	serumfreies Medium
TGF β	Tumorstromungsfaktor- β (englisch "tumor growth factor β ")
TIFF	englisch "tagged image file format"
TNF α	Tumornekrosefaktor α
TPA	12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Azetat
TR	TexasRed
Tsp	Thrombospondin
U	Einheiten
V	Volt
VCAM	vaskuläres Zelladhäsionsmolekül (englisch "vascular cell adhesion molecule")
Vim	Vimentin
VIP	vasoaktives, intestinales Polypeptid (englisch "vasoactive intestinal polypeptide")
ZNS	zentrales Nervensystem

8 Datenanhang

8.1 Färbeintensität der Integrine $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\beta 1$, αM und $\beta 2$ im gesamten Nucleus facialis

nach Axotomie

$\beta 1$		Färbeintensität					Mittelwert	Standardfehler	t-Test [p]
Tag	Seite	Tier A	Tier B	Tier C	Tier D	Tier E			
0	Kontrolle	7,4	7,4	10,5	11,2		9,13	1,00	0,6377
	Axotomie	10,6	8,4	7,6	12,5		9,79	1,10	
1	Kontrolle	10,3	14,3	13,4	13,7		12,95	0,89	0,0782
	Axotomie	8,9	5,8	8,5	11,6		8,69	1,18	
2	Kontrolle	8,1		8,5	12,3		9,62	1,35	0,0328
	Axotomie	16,9		16,4	16,8		16,70	0,15	
4	Kontrolle	8,1	8,2	10,6	7,7	21,3	11,20	2,57	0,0002
	Axotomie	18,0	16,0	20,3	17,4	33,5	21,04	3,19	
7	Kontrolle	11,6	12,5	10,5	7,7		10,59	1,05	0,0082
	Axotomie	31,9	26,0	38,1	23,7		29,92	3,22	
14	Kontrolle	5,8	9,1	16,2	26,0		14,26	4,47	0,0260
	Axotomie	42,0	23,3	36,3	40,4		35,47	4,22	
21	Kontrolle	12,0	19,5	12,4	14,6		14,62	1,73	0,0266
	Axotomie	21,0	24,0	26,3	20,8		23,03	1,31	
42	Kontrolle	11,5	10,0	12,4		3,3	9,31	2,08	0,1178
	Axotomie	14,5	16,6	11,7		10,6	13,37	1,36	

$\alpha 5$		Färbeintensität					Mittelwert	Standardfehler	t-Test [p]
Tag	Seite	Tier A	Tier B	Tier C	Tier D	Tier E			
0	Kontrolle	2,6	7,8	7,0	8,3		6,44	1,30	0,3394
	Axotomie	4,6	5,0	10,7	13,2		8,36	2,12	
1	Kontrolle	7,4	5,4	15,1	14,7		10,65	2,49	0,4522
	Axotomie	11,5	12,8	11,7	14,7		12,69	0,74	
2	Kontrolle	4,2	3,8	4,4	4,8		4,32	0,21	0,0006
	Axotomie	15,1	14,9	15,9	19,1		16,25	0,98	
4	Kontrolle	8,9	7,5	9,8	12,3	7,7	9,24	0,88	0,0002
	Axotomie	25,9	19,3	22,5	24,4	24,2	23,25	1,13	
7	Kontrolle	2,8	7,5	6,9			5,75	1,48	0,0082
	Axotomie	28,3	27,2	26,4			27,31	0,54	
14	Kontrolle	8,1	5,4	9,6	8,2		7,83	0,88	0,0014
	Axotomie	21,9	24,7	25,0	21,7		23,31	0,87	
21	Kontrolle	3,5	5,7	7,1	2,3		4,65	1,06	0,0046
	Axotomie	12,0	18,1	18,2	9,1		14,34	2,26	
42	Kontrolle	7,6	9,1	6,9	5,3		7,22	0,78	0,0293
	Axotomie	14,3	11,9	10,7	14,3		12,78	0,90	

$\alpha 6$		Färbeintensität					Mittelwert	Standardfehler	t-Test [p]
Tag	Seite	Tier A	Tier B	Tier C	Tier D	Tier E			
0	Kontrolle	13,8	19,2	16,0	9,8		14,70	1,97	0,5898
	Axotomie	16,8	16,1	11,7	24,7		17,34	2,70	
1	Kontrolle	10,1	13,5	15,7	14,9		13,56	1,23	0,0112
	Axotomie	16,6	16,5	19,4	18,9		17,86	0,75	
2	Kontrolle	12,5	16,3		10,4		13,09	1,72	0,0414
	Axotomie	31,2	25,6		30,5		29,11	1,75	
4	Kontrolle	13,1	39,0	12,2	14,1	20,4	19,77	5,01	0,0003
	Axotomie	45,6	63,9	53,7	45,9	50,3	51,88	3,37	
7	Kontrolle	9,3	19,2	13,9	22,5		16,22	2,91	0,0067
	Axotomie	55,9	52,5	41,1	47,2		49,16	3,24	
14	Kontrolle	7,8	17,3	15,2	12,3		13,12	2,06	0,0016
	Axotomie	38,5	43,5	44,3	51,7		44,50	2,71	
21	Kontrolle	15,4	10,3	19,6	25,9		17,82	3,30	0,0067
	Axotomie	27,5	25,6	43,3	41,4		34,43	4,60	
42	Kontrolle	14,5	15,5		10,7	5,1	11,45	2,36	0,2621
	Axotomie	14,4	14,5		17,3	20,6	16,71	1,47	

$\beta 2$		Färbeintensität					Mittelwert	Standardfehler	t-Test [p]
Tag	Seite	Tier A	Tier B	Tier C	Tier D	Tier E			
0	Kontrolle		6,6	9,8	5,7		7,37	1,25	0,8613
	Axotomie		9,7	4,5	9,6		7,95	1,72	
1	Kontrolle	6,7	6,1	9,1	9,3		7,80	0,82	0,2803
	Axotomie	5,0	13,7	15,1	9,3		10,74	2,28	
2	Kontrolle	2,9	7,3	1,3	5,0		4,12	1,29	0,0073
	Axotomie	16,0	16,3	20,7	21,5		18,64	1,43	
4	Kontrolle	5,5	6,1	5,0	8,3	10,2	7,03	0,97	0,0004
	Axotomie	42,0	44,3	32,1	36,3	34,0	37,74	2,34	
7	Kontrolle	2,6	3,4	10,1	10,0		6,51	2,05	0,0009
	Axotomie	41,5	50,2	44,9	44,0		45,14	1,82	
14	Kontrolle	8,5	12,6	8,4	10,4		9,96	0,99	0,0150
	Axotomie	36,8	27,5	42,1	53,9		40,05	5,50	
21	Kontrolle	4,4	9,5	7,9	-2,5		4,82	2,66	0,0136
	Axotomie	20,2	20,4	27,4	25,1		23,26	1,78	
42	Kontrolle	4,4	4,4	8,2		8,5	6,39	1,15	0,0060
	Axotomie	9,0	11,6	15,1		18,0	13,44	1,97	

αM		Färbeintensität					Mittelwert	Standardfehler	t-Test [p]
Tag	Seite	Tier A	Tier B	Tier C	Tier D	Tier E			
0	Kontrolle	-4,3	-2,6	4,9	-0,8		-0,71	1,99	0,9776
	Axotomie	-2,8	-1,3	1,1	0,0		-0,74	0,83	
1	Kontrolle	4,4	4,1	13,5	1,1		5,79	2,69	0,0013
	Axotomie	13,5	16,8	26,5	14,6		17,82	2,97	
2	Kontrolle	7,6	5,1	9,2	4,8		6,69	1,06	0,0003
	Axotomie	41,6	39,0	45,3	33,0		39,73	2,59	
4	Kontrolle	-4,0	-3,9	-0,7	3,2	4,5	-0,19	1,77	0,0000
	Axotomie	68,3	67,6	70,7	77,3	63,4	69,47	2,28	
7	Kontrolle	-1,6	1,2	-4,2	9,1		1,10	2,88	0,0000
	Axotomie	74,1	84,6	74,4	82,5		78,90	2,73	
14	Kontrolle	-0,4	-1,5	2,3	-6,1		-1,43	1,76	0,0002
	Axotomie	70,0	67,4	83,9	74,8		74,03	3,64	
21	Kontrolle	-0,3	3,6	-3,0	1,6		0,49	1,42	0,0018
	Axotomie	47,4	37,7	48,9	54,9		47,24	3,57	
42	Kontrolle	-4,2	-0,5	-1,6	2,0	-4,7	-1,79	1,23	0,0001
	Axotomie	21,7	21,9	24,9	25,3	28,0	24,36	1,17	

8.2 Zahl αL -positiver Zellen nach Fazialisaxotomie

αL		Zellzahl					Mittelwert	Standardfehler	t-Test [p]
Tag	Seite	Tier A	Tier B	Tier C	Tier D	Tier E			
0	Kontrolle	0	0	0	0		0,00	0,00	1,0000
	Axotomie	0	0	0	0		0,00	0,00	
1	Kontrolle	0	0	0	1		0,25	0,25	0,0917
	Axotomie	0	1	1	3		1,25	0,63	
2	Kontrolle	0	0	0	0		0,00	0,00	0,0434
	Axotomie	6	1	9	8		6,00	1,78	
4	Kontrolle	0	0	0	0	0	0,00	0,00	0,0132
	Axotomie	2	4	8	10	6	6,00	1,41	
7	Kontrolle	0	0	0	0		0,00	0,00	0,0798
	Axotomie	26	30	3	9		17,00	6,52	
14	Kontrolle	0	0	0	1		0,25	0,25	0,0120
	Axotomie	78	39	47	40		51,00	9,17	
21	Kontrolle	0	4	0	0		1,00	1,00	0,0052
	Axotomie	21	25	19	33		24,50	3,10	
42	Kontrolle	0	0	0	0	0	0,00	0,00	0,1660
	Axotomie	9	2	0	0	3	2,80	1,66	

8.3 Relativer Färbefaktor (RISC) der Integrine $\alpha 5$, $\alpha 6$ und αM auf IgG-positiven

Mikroglia im Nucleus Facialis nach Axotomie

$\alpha 5$ Tag	RISC _{Kontrolle}				RISC _{Axotomie}				DIFF-RISC				Mittelwert	Standardfehler	t-Test [p]
	Tier A	Tier B	Tier C	Tier D	Tier A	Tier B	Tier C	Tier D	Tier A	Tier B	Tier C	Tier D			
0	0,0662	0,0401	0,0641	0,0397	0,0582	0,0438	0,0584	0,0361	-0,0081	0,0037	-0,0057	-0,0035	-0,0034	0,0025	0,2728
1	0,0277	0,0438	0,0494	0,0405	0,0570	0,0972	0,0828	0,0854	0,0293	0,0534	0,0334	0,0450	0,0403	0,0055	0,0053
2	0,0564	0,0728	0,0912	0,0722	0,1243	0,1438	0,1611	0,1599	0,0679	0,0711	0,0699	0,0878	0,0742	0,0046	0,0005
4	0,0829	0,0887	0,0572		0,1642	0,2054	0,1679	0,5604	0,0813	0,1166	0,1107		0,1029	0,0109	0,0111
7		0,0576	0,0583	0,0427	0,5219	0,1572	0,1327	0,1104		0,0997	0,0744	0,0677	0,0806	0,0097	0,0142
14	0,0497	0,0541	0,0652	0,0782	0,1217	0,1512	0,1441	0,1371	0,0720	0,0971	0,0789	0,0589	0,0767	0,0080	0,0024
21	0,0676	0,0647	0,0725	0,0445	0,1254	0,1021	0,1310	0,0977	0,0578	0,0374	0,0585	0,0531	0,0517	0,0049	0,0018
42	0,0625		0,0563	0,0671	0,1104		0,0896	0,0762	0,0479		0,0333	0,0091	0,0301	0,0113	0,1169
84	0,0465	0,0431	0,0642	0,0424	0,0652	0,0539	0,0836	0,0716	0,0187	0,0109	0,0194	0,0292	0,0195	0,0038	0,0138

$\alpha 6$ Tag	RISC _{Kontrolle}				RISC _{Axotomie}				DIFF-RISC				Mittelwert	Standardfehler	t-Test [p]
	Tier A	Tier B	Tier C	Tier D	Tier A	Tier B	Tier C	Tier D	Tier A	Tier B	Tier C	Tier D			
0	0,1322	0,1057	0,1442	0,1682	0,1575	0,1475	0,1519	0,1464	0,0253	0,0417	0,0077	-0,0217	0,0133	0,0136	0,4001
1	0,1708	0,1855	0,1620	0,1514	0,2465	0,2806	0,2787	0,2218	0,0757	0,0950	0,1167	0,0704	0,0895	0,0105	0,0034
2	0,1353	0,1706	0,1426	0,1049	0,3273	0,3898	0,3037	0,2317	0,1920	0,2192	0,1611	0,1268	0,1748	0,0199	0,0031
4	0,1797	0,1759	0,1485		0,4087	0,3899	0,3918	0,2632	0,2290	0,2140	0,2433		0,2288	0,0085	0,0014
7		0,1676	0,1294	0,1344	0,4009	0,3906	0,2928	0,3001		0,2229	0,1634	0,1657	0,1840	0,0195	0,0110
14	0,1375	0,2236	0,1986	0,1316	0,3062	0,3292	0,3342	0,3147	0,1687	0,1055	0,1356	0,1831	0,1482	0,0174	0,0034
21	0,1241	0,1557	0,1472	0,1443	0,2440	0,2381	0,2688	0,2848	0,1199	0,0824	0,1216	0,1405	0,1161	0,0122	0,0024
42	0,1951	0,1620	0,1935	0,1426	0,2914	0,2201	0,1814	0,1569	0,0964	0,0581	-0,0120	0,0143	0,0392	0,0239	0,2000
84	0,1187	0,0894	0,1169	0,0424	0,1484	0,1249	0,1505	0,0716	0,0297	0,0354	0,0336	0,0292	0,0320	0,0015	0,0002

αM Tag	RISC _{Kontrolle}				RISC _{Axotomie}				DIFF-RISC				Mittelwert	Standardfehler	t-Test [p]
	Tier A	Tier B	Tier C	Tier D	Tier A	Tier B	Tier C	Tier D	Tier A	Tier B	Tier C	Tier D			
0		0,2528	0,2951	0,2826	0,0000	0,2702	0,3076	0,2512		0,0174	0,0125	-0,0313	-0,0005	0,0155	0,9772
1	0,2889	0,2890	0,2776		0,4166	0,5074	0,5310	0,4276	0,1277	0,2184	0,2535	0,0000		0,0375	0,0334
2	0,2959	0,2485	0,1698	0,2195	0,4301	0,3924	0,3714	0,3681	0,1342	0,1439	0,2016	0,1487	0,1571	0,0151	0,0019
4	0,3284	0,3102	0,3278		0,4110	0,4099	0,5029	0,4889	0,0827	0,0997	0,1751		0,1192	0,0284	0,0523
7		0,2792	0,3044	0,2867	0,4038	0,3364	0,3667	0,3591		0,0572	0,0623	0,0724	0,0640	0,0045	0,0049
14	0,2201	0,2231	0,2027	0,2283	0,3310	0,3214	0,3298	0,3831	0,1109	0,0983	0,1271	0,1548	0,1228	0,0122	0,0021
21	0,2555	0,2331	0,2435	0,2797	0,4121	0,2675	0,3126	0,4444	0,1566	0,0344	0,0690	0,1647	0,1062	0,0323	0,0461
42	0,2481	0,2081	0,2324	0,2117	0,4119	0,3480	0,3317	0,2950	0,1638	0,1399	0,0992	0,0833	0,1216	0,0184	0,0071
84	0,2825	0,2624	0,3005	0,3352	0,3948	0,2915	0,3788	0,4321	0,1122	0,0291	0,0783	0,0969	0,0791	0,0181	0,0221

8.4 Relativer Färbefaktor (RISC) der Integrine $\alpha 5$, $\alpha 6$ und $\beta 1$ auf Laminin-positiven

Endothelien im Nucleus Facialis nach Axotomie

Integrin	Tag	Seite	RISC			Mittelwert	Standardfehler	t-Test [p]
			Tier A	Tier B	Tier C			
$\alpha 5$	4	Kontrolle	0,0813	0,1311	0,1423	0,1182	0,0188	0,9415
		Axotomie	0,1130	0,0964	0,1501	0,1198	0,0159	
	14	Kontrolle	0,0834	0,1135	0,1211	0,1060	0,0115	0,0030
		Axotomie	0,1476	0,1672	0,1773	0,1640	0,0087	
$\alpha 6$	4	Kontrolle	0,1326	0,1470	0,1410	0,1402	0,0042	0,4150
		Axotomie	0,1495	0,1206	0,0886	0,1196	0,0176	
	14	Kontrolle	0,1526	0,1401	0,1580	0,1502	0,0053	0,3314
		Axotomie	0,1635	0,1439	0,2450	0,1841	0,0310	
αM	4	Kontrolle	0,4851	0,3771	0,4318	0,4313	0,0312	0,8129
		Axotomie	0,4670	0,3955	0,4402	0,4343	0,0209	
	14	Kontrolle	0,3765	0,5013	0,6399	0,5059	0,0761	0,2039
		Axotomie	0,4247	0,6134	0,6482	0,5621	0,0694	

8.5 Proliferation ramifizierter Mikroglia in der Zellkultur

Stimulus	Konzentration [ng/ml]	Proliferationsindex				t-Test
		Kulturzahl	Mittelwert	Standardfehler	vs. Kontrolle	[p]
FCS	0% (Kontrolle)	5	2,4%	0,5%	100%	
	1%	4	3,6%	0,8%	150%	0,0300
	5%	3	5,4%	0,8%	226%	0,0007
	10%	3	6,9%	1,2%	291%	0,0003
	20%	3	4,0%	0,9%	168%	0,0194
GMCSF	0 (Kontrolle)	5	2,4%	0,5%	100%	
	4	4	3,5%	1,8%	146%	0,2310
	40	4	4,9%	1,0%	205%	0,0021
	400	4	7,5%	1,8%	313%	0,0005
IL1 β	0 (Kontrolle)	5	3,9%	0,5%	100%	
	0,5	5	5,5%	2,0%	140%	0,1280
	5	5	5,7%	1,0%	145%	0,0077
	50	5	7,3%	2,3%	185%	0,0141
	500	6	8,7%	2,7%	221%	0,0040
IL2	0 (Kontrolle)	8	5,1%	0,8%	100%	
	0,4	4	4,9%	0,7%	96%	0,6760
	4	3	3,8%	0,6%	76%	0,0482
	40	4	3,7%	1,3%	72%	0,0470
IL3	0 (Kontrolle)	4	9,9%	1,7%	100%	
	0,2	5	10,6%	2,7%	107%	0,6851
	2	5	14,0%	2,1%	141%	0,0175
	20	5	14,5%	2,6%	146%	0,0212
IL4	0 (Kontrolle)	4	7,3%	1,4%	100%	
	0,5	5	7,3%	1,0%	100%	0,9898
	5	5	4,5%	0,5%	62%	0,0052
	50	5	2,3%	0,3%	32%	0,0001
IL6	0 (Kontrolle)	4	9,9%	1,7%	100%	
	0,2	5	12,0%	1,5%	121%	0,0944
	2	4	13,6%	4,4%	137%	0,1721
	20	3	8,7%	4,2%	88%	0,6185
IL10	0 (Kontrolle)	5	2,4%	0,5%	100%	
	0,2	3	2,3%	0,2%	95%	0,7446
	2	4	1,5%	0,1%	62%	0,0125
	20	3	1,3%	0,3%	56%	0,0203
IFN γ	0 (Kontrolle)	5	3,9%	0,5%	100%	
	4	5	3,2%	0,8%	81%	0,1281
	40	5	2,7%	0,8%	70%	0,0252
	400	5	2,1%	0,6%	53%	0,0008
LIF	0 (Kontrolle)	4	7,3%	1,4%	100%	
	0,5	4	7,8%	1,3%	108%	0,5672
	5	4	11,2%	3,6%	154%	0,0906
	50	4	6,4%	1,4%	88%	0,4297
MCSF	0 (Kontrolle)	5	2,4%	0,5%	100%	
	0,2	3	2,6%	0,9%	109%	0,6736
	2	3	2,8%	0,8%	119%	0,3819
	20	4	9,0%	1,1%	376%	0,0000
	200	4	17,3%	3,6%	725%	0,0000
TNF α	0 (Kontrolle)	8	5,1%	0,8%	100%	
	0,2	3	5,2%	0,8%	104%	0,7555
	2	4	6,3%	0,9%	125%	0,0389
	20	5	1,5%	0,9%	30%	0,0000

Stimulus	Antiserum	Proliferationsindex				t-Test
		Kulturzahl	Mittelwert	Standardfehler	vs. Kontrolle	[p]
keiner	keiner (Kontrolle)	6	3,5%	0,8%	100%	
	anti-IL3	4	3,5%	0,7%	99%	0,9499
	anti-GMCSF	5	3,1%	0,6%	88%	0,3476
	anti-MCSF	6	2,6%	0,7%	73%	0,0462
	anti-GMCSF + anti-MCSF	6	2,4%	0,5%	70%	0,0198
IL1	keiner (Kontrolle)	7	6,6%	0,6%	100%	
	anti-IL3	5	6,3%	1,6%	96%	0,6840
	anti-GMCSF	3	3,8%	1,2%	58%	0,0010
	anti-MCSF	5	4,5%	1,5%	68%	0,0072
	anti-GMCSF + anti-MCSF	5	2,9%	1,3%	44%	0,0001
keiner	keiner	5	3,8%	0,4%	58%	0,0000

8.6 Integrin-Färbeintensität von kultivierten Mikroglia nach LPS-Stimulation

Integrin	Stimulation	Färbeintensität						Mittelwert	Standardfehler	t-Test [p]
		Kultur A	Kultur B	Kultur C	Kultur D	Kultur E	Kultur F			
$\alpha 4$	Kontrolle	0,70	0,44	0,14	0,58	0,61	0,25	0,45	0,09	
	5 μ g/ml LPS	0,98	1,07	2,47	1,72	0,65	1,63	1,42	0,27	0,0064
$\alpha 5$	Kontrolle	2,38	1,04	0,98	1,05	1,50	1,59	1,42	0,22	
	5 μ g/ml LPS	7,64	8,49	6,89	8,61	8,59	8,56	8,13	0,29	0,0000
$\alpha 6$	Kontrolle	1,11	1,42	1,19	0,95	0,97	1,52	1,19	0,10	
	5 μ g/ml LPS	0,69	0,64	0,69	0,45	0,70	1,19	0,73	0,10	0,0073
αM	Kontrolle	7,22	6,18	6,91	6,81			6,78	0,22	
	5 μ g/ml LPS	10,27	13,10	9,22	9,07			10,42	0,93	0,0091
$\beta 1$	Kontrolle	1,53	2,70	1,20	1,82			1,81	0,32	
	5 μ g/ml LPS	3,87	4,26	5,31	3,24			4,17	0,44	0,0047
$\beta 2$	Kontrolle	1,52	1,54	1,98	1,49			1,63	0,12	
	5 μ g/ml LPS	1,24	1,80	2,10	1,06			1,55	0,24	0,7784

9 Abbildungen und Tabellen

Abbildungen

Abbildung 1. Struktur und Interaktionen eines idealtypisches Integrins.....	10
Abbildung 2. Heterodimerisierung der Integrin-Untereinheiten.....	12
Abbildung 3. Reaktion im Kerngebiet nach Durchtrennung des Fazialis-Nerven.....	17
Abbildung 4. Anatomie des Nervus facialis.....	34
Abbildung 5. Immunhistochemische Nachweismethoden.....	39
Abbildung 6. Niederschlagsreaktion des 3,3'-Diaminobenzidins (DAB).....	39
Abbildung 7. Kennline der Lichtextinktion in der Lichtmikroskopie.....	41
Abbildung 8. Tyramin-Biotin-Reaktion ("catalyzed reporter deposition").....	47
Abbildung 9. Messung des Relativen Intensitäts- und Kontrastfaktors (RISC).....	53
Abbildung 10. Kultur von ramifizierter Mikroglia.....	60
Abbildung 11. Titration in der Milz.....	71
Abbildung 12. Integrine in der Milz.....	72
Abbildung 13. $\beta 1$ -Integrine im axotomierten Nucleus facialis.....	74
Abbildung 14. $\beta 2$ -Integrine im axotomierten Nucleus facialis.....	1
Abbildung 15. Zeitverlauf der Gesamt-Immunoreaktivität für Integrine im axotomierten Nucleus facialis.....	76
Abbildung 16. Kolokalisation der Integrine $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\beta 1$, αL , αM und $\beta 2$ mit Mikroglia.....	78
Abbildung 17. Kolokalisation der Integrine $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\beta 1$, αM , αL , αX und $\beta 2$ am Tag 14 nach Fazialis-Durchtrennung.....	78
Abbildung 18. Kolokalisation der Integrine $\alpha 5$, $\alpha 6$ und $\beta 1$ mit Endothelien und Astrozyten...	79
Abbildung 19. Ultrastrukturelle Lokalisation der L-Immunoreaktivität.....	81
Abbildung 20. Zeitverlauf der zellulären Integrin-Immunoreaktivität im axotomierten Nucleus facialis.....	83
Abbildung 21. Mikroglia-Aktivierung bei steigender LPS-Dosis.....	86
Abbildung 22. Morphologie normaler und LPS-aktivierter Mikroglia.....	87

Abbildung 23. Lipopolysaccharid-Effekt auf Integrin-Expression im Hirnstamm	88
Abbildung 24. Mikroglia in vivo und in vitro	90
Abbildung 25. Dosisabhängiger Effekt von LPS auf kultivierte, ramifizierte Mikroglia.....	94
Abbildung 26. LPS-Effekt auf Integrin-Immunoreaktivität ramifizierter Mikroglia in Kultur.....	94
Abbildung 27. Messung des LPS-Effektes auf die Integrin-Immunoreaktivität in Mikroglia- Kokulturen.....	96
Abbildung 28. Wirkung klassischer Mitogene auf die Mikroglia-Proliferation	97
Abbildung 29. Wirkung weiterer Zytokine auf die Mikroglia-Proliferation	97
Abbildung 30. Wirkung neutralisierender Antikörper auf die Mikroglia-Proliferation.....	100

Tabellen

Tabelle I. Regulation von Integrinen bei Erkrankungen des ZNS	15
Tabelle II. Marker der Astrozytenaktivierung in der Maus nach Verletzung.....	20
Tabelle III. Marker der Mikroglia-Aktivierung nach Verletzung	22
Tabelle IV. Substanzen mit Einfluß auf die Mikroglia-Proliferation.....	28
Tabelle V. Methoden zur Kultur von ramifizierten Mikrogliazellen.....	29
Tabelle VI. Vorteile der Fazialis-Durchtrennung für das Studium Glia-Aktivierung	33
Tabelle VII. Vorteile des LPS-Injektionsmodells	35
Tabelle VIII. Primäre, monoklonale Antikörper	68
Tabelle IX. Primäre, polyklonale Antikörper	68
Tabelle X. Sekundäre Antikörper	69
Tabelle XI. Lokalisation der Integrin-Immunoreaktivität in der Maus.....	82
Tabelle XII. Integrin-Expression zu den verschiedenen Stadien der Mikroglia-Aktivierung	106
Tabelle XIII. Zusammenfassung der zellulären Lokalisation von β 1- und β 2-Integrinen im normalen und verletzten Nucleus facialis	112
Tabelle XIV. Zytokine und Proliferation <i>in vitro</i> – Makrophagen und Mikroglia.....	115
Tabelle XV. Mikroglia-Reaktion auf LPS-Stimulation <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i>	123

Tabellarischer Lebenslauf

Christian Ulrich Alexander Kloss

geboren am 28. Juli 1971 in Berlin
Sohn von Ulrich und Christiane Kloss geb. Menz
verheiratet mit Julia Inge Kloss geb. Knobloch

Schulbildung

1978-1982	Carl-Orff-Grundschule, Berlin
1982-1987	Gymnasium Steglitz, Berlin
1987-1988	R.C. Mahar Regional High School, Orange, Massachusetts, USA
1988-1991	Gymnasium Steglitz, Berlin
1991	Allgemeine Hochschulreife (1,1)

Medizinstudium

1991-1994	Albert-Ludwigs-Universität Freiburg 1993 Ärztliche Vorprüfung (1,00) 1994 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
1994-1995	Queens University of Belfast, Nordirland 1994 United States Medical Licensing Examination Step 1
1995-1998	Ludwig-Maximilians-Universität München 1997 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
1998	Harvard Medical School 1998 United States Medical Licensing Examination Step 2
1998-1999	Ludwig-Maximilians-Universität München 1999 Ärztlichen Prüfung (1,49)
1999	Teilapprobation als Arzt

Stipendien

1989-1998	Studienstiftung des deutschen Volkes
1994-1995	Deutscher Akademischer Austauschdienst
1998	Harvard Munich Alliance for Medical Education

Wissenschaftlicher Werdegang

1995-1999	Doktorand am Max-Planck-Institut für Neurobiologie (vormals für Psychiatrie), Martinsried in der Abteilung Neuromorphologie, Prof.Dr.Dr.h.c. G.W. Kreutzberg, Arbeitsgruppe PD Dr. G. Raivich
3-9/1999	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am MPI für Neurobiologie
seit 10/1999	Arzt im Praktikum Klinikum Großhadern, Neurologische Klinik, Arbeitsgruppe experimentelle Schlaganfallforschung (PD Dr. G. Hamann)

Eigene Veröffentlichungen

Originalarbeiten

- **Kloss CUA**, Kreutzberg GW und Raivich G (1997) Proliferation of ramified microglia on an astrocyte monolayer: characterization of stimulatory and inhibitory cytokines. *Journal of Neuroscience Research* 49:248-254.
- Raivich G, Haas S, Werner A, Klein MA, **Kloss CUA** und Kreutzberg GW (1998) Regulation of MCSF receptors on microglia in the normal and injured mouse central nervous system: a quantitative immunofluorescence study using confocal laser microscopy. *Journal of Comparative Neurology* 395:342-358.
- Raivich G, Jones LL, **Kloss CUA**, Werner A, Neumann H und Kreutzberg GW (1998) Immune surveillance in the injured nervous system: T-lymphocytes invade the axotomized mouse facial motor nucleus and aggregate around sites of neuronal degeneration. *Journal of Neuroscience* 18:5804-5816.
- Werner A, **Kloss CUA**, Walter J, Kreutzberg GW und Raivich G (1998) Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in the mouse facial motor nucleus after axonal injury and during regeneration. *Journal of Neurocytology* 27:219-232.
- **Kloss CUA**, Werner A, Klein MA, Shen J, Menuz K, Probst C, Kreutzberg GW und Raivich G (1999) Integrin family of cell adhesion molecules in the injured brain: Regulation and cellular localization in the normal and regenerating mouse facial motor nucleus. *Journal of Comparative Neurology* 411:162-178.
- Pfefferkorn T, Wiessner C, Allegrini PR, Stauffer B, Vosko MR, Liebetrau M, Bültemeier G, **Kloss CUA**, Hamann GF (2000) Plasminogen activation in experimental permanent focal cerebral ischemia. *Brain Research* 882:19-25.
- **Kloss CUA**, Bohatschek M, Kreutzberg GW, Raivich G (2001) Effect of lipopolysaccharide on the morphology and integrin immunoreactivity of ramified microglia in the mouse brain and in cell culture. *Experimental Neurology* (in Druck).
- Bohatschek M, **Kloss CUA**, Kalla R, Raivich G (2001) In vitro model of microglial deramification: Ramified microglia transform into ameboid phagocytes following addition of brain cell membranes. *Journal of Neuroscience Research* (in Druck).
- **Kloss CUA**, Kreutzberg GW und Raivich G (2000) Endothelial NOS-like immunoreactivity in grey matter astrocytes is upregulated in the regenerating mouse facial motor nucleus. (*in Vorbereitung*)

Übersichtsarbeiten

- Raivich G., Bohatschek M., **Kloss C.U.A.**, Werner A., Jones L.L., Kreutzberg G.W. (1999) Neuroglial activation repertoire in the injured brain: graded response, molecular mechanisms and cues to physiological function. *Brain Research Reviews* 30:77-105.

Danksagung

Zum Schluß möchte ich gerne Herrn Professor Kreuzberg dafür danken, daß er mir durch seine kontinuierliche Förderung in seiner Abteilung diese Arbeit ermöglicht hat.

Meine besondere Verbundenheit gilt meinem Betreuer, Herrn PD Dr. Gena Raivich, der mir durch die gesamte Arbeit hindurch mit seinem Rat zur Seite gestanden hat. Seine hohe Fachkompetenz gepaart mit wissenschaftlichem Wissensdurst wirkten ungemein ansteckend und stimulierend.

Ich danke auch meinen Mitdoktoranden Herrn Dr. Leonard L. Jones, Alexander Werner, Marion Bohatschek, Matthias Galiano, Roger Kallas und Andreas Gschwendter für die freundschaftlichen Diskussionen und die häufige, praktische Unterstützung.

Ohne die Hilfe der technischen Assistentinnen Frau Helma Tyrlas, Monika Falkenberg, Dietmute Büringer, Karin Brückner, Andrea Koppius und Katrin Pech sowie die Gespräche mit den anderen Mitarbeitern der Abteilung für Neuromorphologie wäre diese Arbeit wohl nicht durchführbar gewesen.

Ich danke der Studienstiftung des deutschen Volkes für die finanzielle und ideelle Unterstützung während meines Studiums.

Besonders bin ich auch meiner Familie für die jahrelange, vorbehaltlose Unterstützung dankbar.

Hervorzuheben ist schließlich das Verständnis meiner Frau, die mich so manch einen späten Abend und Wochenende mit dem Labor teilen mußte.