

Max-Planck-Institut für Neurobiologie,  
Abteilung Neuromorphologie  
(Direktor: apl. Prof. Dr. Dr. h. c. (MU Szeged) G. W. Kreutzberg)

# **Regulation, zelluläre Lokalisation und Funktion des Neurotrophinrezeptors p75<sup>NTR</sup> bei der Regeneration von Motoneuronen**

Andreas Gschwendtner

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. B. Conrad
3. Univ.-Prof. Dr. J. Dudel, em.,  
Ludwig-Maximilians-Universität München

Die Dissertation wurde am 2. 2. 2004 bei der Technischen Universität  
München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 16. 6. 2004  
angenommen.



Meinen Eltern



# Inhalt

	<b>Abkürzungen</b>	<b>9</b>
<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>13</b>
1.1	Reaktion des Nervensystems auf Verletzung . . . . .	13
1.1.1	Regenerative Vorgänge im ZNS . . . . .	13
1.1.2	Zentrale Entzündungsreaktion . . . . .	15
1.1.3	Neuronale Reaktion im ZNS . . . . .	18
1.1.4	Axonale Regeneration peripherer Nerven . . . . .	19
1.2	Neurotrophine und ihre Rezeptoren . . . . .	21
1.2.1	Funktion im Nervensystem von Wirbeltieren und Mensch . .	21
1.2.2	Die vier Neurotrophine und ihre beiden Rezeptortypen . . .	21
1.2.3	Spleißvarianten von p75 <sup>NTR</sup> . . . . .	23
1.3	Ziel der Arbeit und experimenteller Ansatz . . . . .	25
1.3.1	Frühere Untersuchungen an transgenen Mäusen: Ausschaltung des p75 <sup>NTR</sup> -Gens durch Mutation in Exon 3 . .	25
1.3.2	Transgene Deletion von p75 <sup>NTR</sup> durch Mutation in Exon 4 . .	25
1.3.3	Kontrolle des genetischen Hintergrundes von Versuchstieren	26
1.3.4	Fragestellung . . . . .	26
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>29</b>
2.1	Versuchstiere . . . . .	29
2.2	Herstellung eines Antikörpers gegen p75 <sup>NTR</sup> . . . . .	30
2.3	Axotomie des Nervus facialis . . . . .	31
2.3.1	Vorteile des Modells . . . . .	31
2.3.2	Durchführung der Operation . . . . .	33
2.4	Aufarbeitung des Gewebes und Immunhistochemie . . . . .	34
2.4.1	Perfusion der Tiere und Fixierung des Gewebes . . . . .	34
2.4.2	Anfertigung von Gefrierschnitten . . . . .	34

2.4.3	Immunhistochemie in ABC/DAB-Technik . . . . .	35
2.4.4	Fluoreszenz-Immunhistochemie . . . . .	36
2.5	Konfokale Lasermikroskopie . . . . .	37
2.6	Lichtmikroskopie und Quantifizierung von Färbeintensität .	39
2.6.1	Aufnahme digitaler Bilder am Lichtmikroskop . . . . .	39
2.6.2	Digitale Messung der Lichtextinktion . . . . .	39
2.6.3	Quantifizierung nach dem »Mean–SD«-Algorithmus . . . .	41
2.7	Quantifizierung von Zellzahlen . . . . .	42
2.7.1	Quantifizierung überlebender Neurone nach Fazialisaxotomie	42
2.7.2	Zählung von T-Lymphozyten im Fazialiskern . . . . .	44
2.7.3	Färbung und Zählung von Granulozyten im Nerv . . . . .	44
2.7.4	Quantifizierung von Makrophagen im Nervus facialis . . . .	44
2.8	Untersuchung der axonalen Regeneration . . . . .	45
2.9	Statistische Analyse der erhobenen Daten . . . . .	45
2.10	Liste der verwendeten Materialien . . . . .	47
2.10.1	Antikörper und Seren . . . . .	47
2.10.2	Lösungen . . . . .	48
2.10.3	Kommerzielle Kits und Chemikalien . . . . .	49
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>51</b>
3.1	Expression von p75 <sup>NTR</sup> im Nervensystem . . . . .	51
3.1.1	Konstitutive Expression . . . . .	51
3.1.2	Regulation nach Axotomie . . . . .	53
3.1.3	Effekt der transgenen Ausschaltung . . . . .	54
3.1.4	Zelluläre Lokalisation . . . . .	54
3.2	Neuronale Antwort auf Verletzung . . . . .	56
3.2.1	Axonale Regeneration . . . . .	56
3.2.2	Expression von Neuropeptiden im verletzten Fazialiskern . .	58
3.2.3	Neuronaler Zelltod nach Axotomie . . . . .	58
3.3	Antwort von Glia und Immunsystem . . . . .	62
3.3.1	Mikroglia . . . . .	62
3.3.2	Einwanderung von T-Lymphozyten in das ZNS . . . . .	67
3.3.3	Astroglia . . . . .	69

<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>71</b>
4.1	Effekte des genetischen Hintergrundes . . . . .	71
4.2	Inflammatorische Signale und p75 <sup>NTR</sup> . . . . .	75
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>79</b>
	<b>Literatur</b>	<b>81</b>
	<b>Publikationen</b>	<b>97</b>
	<b>Index</b>	<b>99</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>105</b>
	<b>Lebenslauf</b>	<b>107</b>





# Abkürzungen

ABC	Avidin-Biotin-Complex
ARMS	»Ankyrin repeat-rich membrane spanning protein«
bp	»base pair(s)« (Basenpaar(e))
BDNF	»Brain-derived neurotrophic factor« (aus dem Gehirn stammender neurotropher Faktor)
BSA	»Bovine serum albumine« (Rinder-Serum-Albumin)
CD	»Cluster of differentiation« (Differenzierungsantigen)
cDNA	»complementary DNA« (komplementäre Desoxyribonucleinsäure)
CGRP	»Calcitonin gene related peptide«
Cy3	Indokarbocyanin 3
Cy5	Indokarbocyanin 5
DAB	3'-3'-Diaminobenzidin
DNA	»Desoxyribonucleic acid« (Desoxyribonucleinsäure)
EAE	Experimentell allergische Enzephalomyelitis
EDTA	»Ethylene diamine tetraacetic acid« (Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure)
EP	Endogene Peroxidase
FA	Formaldehyd
FI	Färbeintensität
FITC	Fluorescein-5-Isothiocyanat
FL-p75 <sup>NTR</sup>	Vollängen(»full length«)-Isoform von p75 <sup>NTR</sup>
GFAP	»Gial fibrillary acidic protein« (saures Gliafaserprotein)
Iba-1	»ionized calcium binding adapter molecule 1« (ionisiertes-Kalzium-bindendes Adpaptermolekül 1)
ICAM-1	»Intercellular adhesion molecule 1« (interzelluäres Adhäsionsmolekül 1)

## Abkürzungen

---

IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
IPTG	Isopropyl-Thiogalaktosid
kDa	Kilo-Dalton
KO	Knockout
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
MAG	Myelin-assoziiertes Glykoprotein
MBP	»Myelin basic protein« (basisches Myelinprotein)
MCSF	»Macrophage colony stimulating factor« (Makrophagen koloniestimulierender Faktor)
MHC	»Major histocompatibility complex« (Haupthistokompatibilitätskomplex)
mRNA	»messenger« (Boten)-RNA
NGF	»Nerve growth factor« (Nervenwachstumsfaktor)
NT3	Neurotrophin 3
NT4	Neurotrophin 4
OD	Optische Dichte
OLV	»Optic luminosity value« (Optischer Lichtwert bei Lichtmikroskopie von immun- histochemisch gefärbten histologischen Schnitten)
p75 <sup>NTR</sup>	Neurotrophinrezeptor p75 (Protein von 75 kDa Molekulargewicht)
p75e3 <sup>-/-</sup>	Tiere, die homozygot für das Allel des p75 <sup>NTR</sup> -Gens mit Mutation in Exon 3 sind.
p75e3 <sup>+/+</sup>	Tiere, die homozygot für das Wildtyp-Allel des p75 <sup>NTR</sup> -Gens sind, als Kontrolle für p75e3 <sup>-/-</sup> .
p75e4 <sup>-/-</sup>	Tiere, die homozygot für das Allel des p75 <sup>NTR</sup> -Gens mit Mutation in Exon 4 sind.
p75e4 <sup>+/+</sup>	Tiere, die homozygot für das Wildtyp-Allel des p75 <sup>NTR</sup> -Gens sind, als Kontrolle für p75e4 <sup>-/-</sup> .
p75 <sup>NTR</sup> ICD	p75 <sup>NTR</sup> , intrazelluläre Domäne (»intracellular domain«)
PB	»Phosphate buffer « (0,1 molarer Phosphat-Puffer)
PB/BSA	PB mit 0,1 % BSA

PBS	»Phosphate buffered saline« (phosphat-gepufferte Kochsalzlösung)
PFA	Paraformaldehyd
PNS	Peripheres Nervensystem
RNA	»Ribonucleic acid« (Ribonucleinsäure)
ROI	»Region of interest« (definierter Messbereich innerhalb eines Bildausschnittes)
s-p75 <sup>NTR</sup>	Verkürzte (»short«) Isoform von p75 <sup>NTR</sup>
SD	»Standard deviation« (Standardabweichung)
SDS	»Sodium dodecyl sulfate« (Natrium-Laurylsulfat)
SEM	»Standard error of mean« (Standardfehler des Mittelwertes)
TGF	»Tumor growth factor« (Tumorstromungsfaktor)
TNF	»Tumor necrosis factor« (Tumornekrosefaktor)
TNFR	TNF-Rezeptor
TR	Texas-Red
WT	Wildtyp
ZNS	Zentralnervensystem



# 1 Einleitung

## 1.1 Reaktion des Nervensystems auf Verletzung

Die Fähigkeit des Nervensystems zur Regeneration nach unterschiedlichen Schädigungen, wie z. B. Trauma, Ischämie oder Entzündung, ist im Vergleich zu anderen Organen (Beispiel Leber: »Prometheus-Effekt«) nur gering ausgeprägt. Neurone von Säugetieren und Mensch sind – mit wenigen, erst in den letzten Jahren bekannt gewordenen Ausnahmen – postmitotisch fixierte Zellen, das heißt, sie haben die Fähigkeit zur Zellteilung und damit die Möglichkeit, untergegangene Zellen gewebsspezifisch zu ersetzen, verloren. Auch die Fähigkeit des einzelnen Neurons, nach einer nicht letalen Schädigung zu regenerieren und die ursprüngliche Funktion wiederzugewinnen ist begrenzt. Gerade hierbei bestehen allerdings wesentliche Unterschiede zwischen dem peripheren (PNS) und zentralen Nervensystem (ZNS), was einer der Gründe für diese klassische Einteilung ist: Während eine erfolgreiche Regeneration peripherer Nerven durchaus möglich ist, findet sie im ZNS so gut wie nie statt.

In dieser Arbeit wurde die Regeneration von Motoneuronen der Maus nach peripherer Axotomie des Nervus facialis untersucht. Diese Zellen gehören beiden Anteilen des Nervensystems an, denn ihre Zellkörper liegen zentral in Hirnstamm oder Rückenmark, die Axone verlaufen jedoch in peripheren Nerven bis zu ihrem Zielorgan, z. B. der Skelettmuskulatur. Ein wesentlicher Vorteil dieses Tiermodells ist daher, dass hier die Reaktionen des zentralen und peripheren Nervensystems auf Verletzung gleichermaßen gut erforscht werden können.

### 1.1.1 Regenerative Vorgänge im ZNS

Betrachtet man nicht einzelne Zellen, sondern das Nervensystem als Ganzes, so ist es entscheidend, die *funktionelle* Regeneration von der *strukturellen* zu unterscheiden: Während bei der ersteren die durch die Schädigung

beeinträchtigte Funktion durch kompensatorische Leistungen gesunder Bereiche wiedergewonnen wird, geschieht dies bei letzterer durch die tatsächliche Wiederherstellung der anatomischen Struktur. Wird in dieser Arbeit der Begriff »Regeneration« verwendet, so ist die anatomisch fassbare und morphologisch sichtbare Wiederherstellung gemeint.

Die Fähigkeit zur *funktionellen* übersteigt die Möglichkeiten zur *strukturellen* Regeneration im zentralen Nervensystem bei weitem. Durch die enorme Anpassungsfähigkeit und Plastizität des Gehirns, können häufig nicht geschädigte Areale die Aufgaben von zerstörten Regionen übernehmen. Die klinische Erfahrung zeigt, dass mitunter selbst große Schäden, wie sie z. B. im Rahmen von ischämischen Hirninfarkten auftreten, erstaunlich gut (wenn auch selten vollständig) kompensiert werden können. Diese Anpassungsvorgänge erreichen jedoch schnell ihre Grenzen, wenn die Schäden groß sind, oder multipel auftreten. Es scheint daher verwunderlich, dass die Fähigkeit zur strukturellen Regeneration, die bei einfacheren Lebewesen und sogar bis hin zu Fischen (mit Einschränkungen) vorhanden ist, im Laufe der Phylogenese zunehmend aufgegeben wurde und bei Vögeln Säugetieren nahezu vollständig fehlt [7–9, 22, 31, 71, 102, 106, 111]. Vielmehr verhindern bei diesen Organismen aktive Vorgänge, an denen insbesondere gliale Zellen beteiligt sind, dass geschädigte Neurone wieder in das Gesamtsystem integriert werden.

Es gibt zwei Ansätze, um zu erklären, warum sich der scheinbare Selektionsvorteil eines »regenerationsfreudigen« zentralen Nervensystems zu einem Nachteil verkehren und deshalb während der Evolution von Säugetieren und Mensch nicht durchsetzen konnte: Die erste Hypothese besagt, dass sich mit der enormen Zunahme der Komplexität des ZNS auch die Erfolgswahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Wiederherstellung der Struktur drastisch verringerte. Stattdessen stieg die Gefahr der Ausbildung fehlerhafter Verbindungen, welche sogar zu einer funktionelle Verschlechterung führen können. Die zweite Erklärung besteht in der Annahme, dass ein evolutionärer Selektionsvorteil gerade darin bestanden haben könnte, verletzte Neurone *nicht* wieder in das Gesamtsystem zu integrieren, da nur so die Ausbreitung einer möglichen Infektion verhindert werden kann. Das Gehirn ist durch den knöchernen Schädel gut geschützt, und Verletzungen, die zu einem relevanten Funktionsverlust führen, sind in der Regel so schwer, dass sie in »freier Wildbahn« ohnehin nicht überlebt werden kön-

nen. Die Bekämpfung von Infektionen des ZNS mag daher im Laufe der Evolution tatsächlich eine deutlich wichtigere Rolle gespielt haben, als die Wiederherstellung des Organs nach Verletzung.

### **1.1.2 Zentrale Entzündungsreaktion**

Die Infektabwehr und Entzündungsreaktion gehorcht im ZNS den selben Prinzipien wie in jedem anderen Gewebe, dazu gehören unspezifische und spezifische Reaktionen des Immunsystems sowie die Bildung von Narben. Unterschiede bestehen jedoch darin, dass viele dieser Aufgaben von der Glia, also spezialisierten hirneigenen Zellen übernommen werden, die in anderen Organen nicht anzutreffen sind. Mikrogliale Zellen stehen den Makrophagen und dendritischen Zellen aus anderen Geweben nahe und sind wesentlich an der unspezifischen Abwehr beteiligt: Sie können Erreger und Zellschrott phagozytieren und sorgen durch chemotaktische Signale für eine Einwanderung von Lymphozyten aus dem Blut. Antigenpräsentierende Mikroglia löst eine Aktivierung dieser immunkompetenten Zellen aus, denen die Aufgabe der spezifischen Abwehr zukommt. Analog zur bindgewebigen Reaktion mit Aktivierung von Fibroblasten und Bildung von Narbengewebe, wie sie im Rahmen einer Entzündung in anderen Organen abläuft, kommt es im Gehirn zur Aktivierung der Astroglia, welche maßgeblich für die Ausbildung einer »Glianarbe« verantwortlich ist. Diese Vorgänge laufen in relativ stereotyper Weise, nach unterschiedlichen schädigenden Einflüssen ab [77, 84].

#### **1.1.2.1 Mikrogliale Aktivierung**

Mikrogliale Zellen haben im »Ruhezustand« lange, verzweigte Fortsätze (ramifizierte Mikroglia) und reagieren auf eine Schädigung mit typischen Veränderungen ihrer Morphologie, die seit über 100 Jahren bekannt sind [66, 74, 88]: Es kommt zu einer Größenzunahme des Zellkörpers, einem Anschwellen der proximalen Fortsätze und einer Deramifizierung der distalen Anteile. Die Aktivierung läuft in mehreren, unterscheidbaren Stadien ab [77], die sich jedoch bei einer etwas gröberen Betrachtung in zwei Phasen einteilen lassen, die von unterschiedlichen molekularen Stimuli getriggert werden:

*Frühe Aktivierung durch Signale verletzter, aber lebender Neurone.* Schon innerhalb der ersten 24 Stunden findet ein Anstieg von mikroglialen Molekülen mit immunologischer Funktion statt, dazu gehören z. B. membranständiges IgG, Thrombospondin, Iba-1, ICAM-1 und der Rezeptor für das C<sub>3</sub>bi-Fragment des Komplement-Systems, der auch als  $\alpha_M\beta_2$ -Integrin bezeichnet wird [49, 68, 79, 113]. Zu den wichtigsten Signalmolekülen, die diese Phase steuern, gehören IL-6, MCSF und TGF- $\beta_1$ . Wenige Tage nach Verletzung kommt es zu einer Proliferation mikroglialer Zellen, die eine verstärkte Expression von Rezeptoren für mitosefördernde Moleküle wie MCSF zeigen [36, 44, 77, 82, 83]. In diesem Stadium ist bei der Maus auch eine Zunahme der Expression der Integrine  $\alpha_5\beta_1$  und  $\alpha_6\beta_1$  nachweisbar. Geschädigte Neurone verlieren jetzt, vor allem im Bereich des Zellkörpers, einen großen Teil ihrer afferenten synaptischen Verbindungen (»synaptic stripping«, [14]). An diesem Prozess ist die Mikroglia aktiv beteiligt, die beginnt den Neuronen im Bereich der verloren gegangenen synaptischen Verbindungen anzuhaften und ihre Zellkörper zu umschließen. In dieser Arbeit wurde die Frühphase der mikroglialen Aktivierung an Tag 4 durch Immunfärbungen gegen die Integrine  $\alpha_M\beta_2$ ,  $\alpha_5\beta_1$  und  $\alpha_6\beta_1$ , sowie ICAM-1 untersucht.

*Spätphase – Reaktion auf neuronalen Zelltod.* Der weitere Verlauf der Reaktion hängt im Wesentlichen davon ab, ob neuronaler Zelltod auftritt oder nicht. Ist dies nicht der Fall, so kommt es zu einer schrittweisen Rückbildung der Veränderungen. Wenn die Schädigung aber so schwer ist, dass sie zum Untergang von Neuronen führt, findet eine weitere Transformation der Mikroglia zu phagozytischen Zellen statt, deren Aufgabe das Abräumen von Zell-Debris ist. Eine besonders wichtige Rolle spielen in dieser Phase die Signalmoleküle IL-1, TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  [82]. Diese Vorgänge gehen mit einer massiv verstärkten Expression der meisten (wenn auch nicht aller) Moleküle, die eine immunologische Funktion besitzen, einher; die lange Liste enthält neben den bereits für die Frühphase genannten Aktivierungsmarkern z. B. auch B7.2 und MHC Klasse I und II. Um die zu Grunde gehenden Neurone herum formen sich MHC-I-positive »Knötchen«, die aus Aggregaten mikroglialer Zellen bestehen und einen indirekten Hinweis auf das Stattfinden von neuronalem Zelltod geben [77, 82]. Die Zahl sterbender Neurone, sowie das Ausmaß der beschriebenen Reaktion, erreichen ihr Maximum etwa 14 Tage nach Verletzung.



#### 1.1.2.2 Einwanderung von Lymphozyten

Auch wenn keine Störung der Blut-Hirn-Schranke vorliegt, kommt es bereits innerhalb der ersten 24 Stunden nach Verletzung zur Einwanderung einiger Lymphozyten in die geschädigten Bereiche des ZNS; ihre Zahl bleibt von Tag 1 bis 4 in etwa konstant. Wie die mikrogliale Reaktion, läuft auch dieser Vorgang in zwei Phasen ab, da die Mikroglia maßgeblich für die chemotaktischen Signale an die Lymphozyten verantwortlich ist. Daher erreicht auch der Influx CD3-positiver T-Zellen sein Maximum am Tag 14, dem Zeitpunkt an dem die mikrogliale Reaktion am stärksten und der neuronale Zelltod am ausgeprägtesten ist. Phagozytierte Antigene werden den Lymphozyten auf MHC Klasse I und II exprimierender Mikroglia präsentiert.

#### 1.1.2.3 Reaktion der Astroglia

Astrozyten bilden zahlenmäßig den größten Anteil aller Zellen des ZNS und treten in zwei typischen Formen auf, der fibrillären oder der protoplasmatischen. Die erstere findet sich normalerweise überwiegend in der weißen Substanz, diese Zellen tragen lange, schlanke Fortsätze, die sich mit einer Immunfärbung gegen das saure Gliafaserprotein (»glial fibrillary acidic protein«, GFAP) anfärben lassen [11]. Protoplasmatische Astrozyten sind dagegen vorwiegend in der grauen Substanz lokalisiert und haben zahlreiche kurze, breite, aber vielfach verzweigte Fortsätze, die mit immunhistochemischen Standardfärbungen nicht darstellbar sind.

Bereits am ersten Tag nach einer Schädigung zeigen auch die normalerweise GFAP-negativen protoplasmatische Astrozyten eine zunehmende Expression von GFAP und bilden einige feine, GFAP-positive Fortsätze aus. Nach 2 bis 3 Tagen ist eine komplette Transformation von protoplasmatischen Astrozyten in die fibrilläre Form abgeschlossen. Dieser Vorgang wird durch verschiedene Zytokine kontrolliert, von besonderer Bedeutung ist z. B. IL-6 [46]. Die Hauptfunktion der astrozytären Transformation ist die Bildung einer physikalischen Barriere zwischen gesunden und geschädigten Zellen, oder, makroskopisch betrachtet, zwischen gesundem und verletztem Gewebe. Man bezeichnet diesen Vorgang als Bildung einer »Gliararbe«. Das Ausmaß der glialen Vernarbung hängt von Schwere des Traumas bzw. der Läsion ab, sie wird aber auch schon nach einer relativ milden

indirekten Schädigung, wie der peripheren Axotomie, beobachtet. Die Mikroglia, die zunächst (wie oben beschrieben) im Rahmen des »synaptic stripping« den Neuronen anhaftet und ihre Zellkörper umschließt, wird schließlich in zunehmendem Maße durch Astrozyten verdrängt, die dann mit ihren Fortsätzen die Oberfläche des Neurons bedecken und so die Ausbildung synaptischer Verbindungen blockieren. Dieser Vorgang beginnt etwa 14 Tage nach Verletzung und kann dauerhaft sein. In einigen Fällen ist er jedoch reversibel, denn nach erfolgreicher Regeneration eines peripheren Axons können sich die astrozytären Fortsätze von der neuronalen Zelloberfläche zurückziehen und so eine Reintegration des regenerierten Neurons in das Gesamtsystem erlauben.

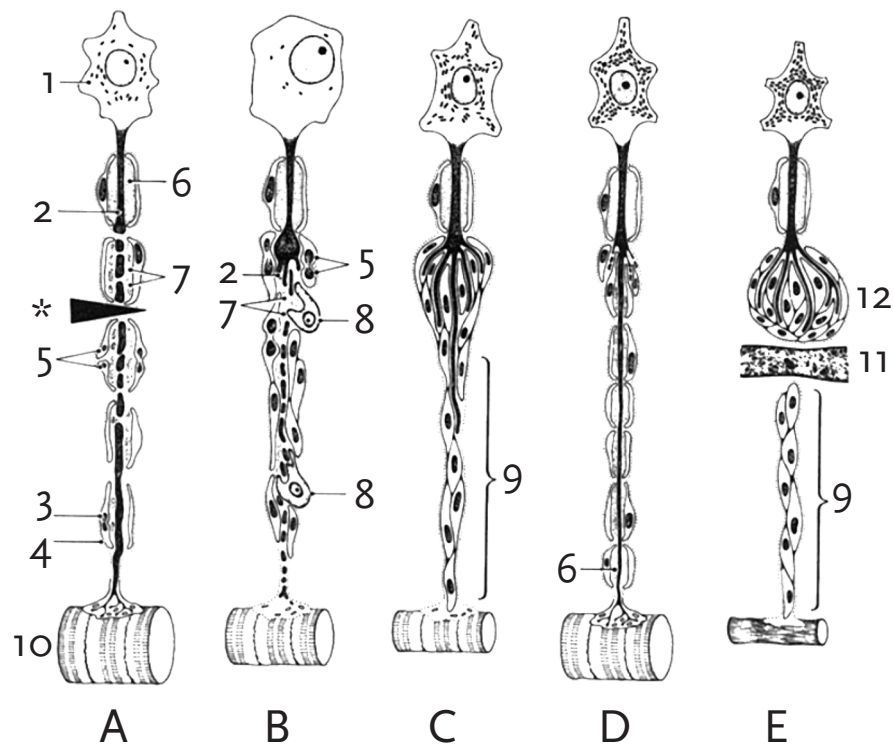
### 1.1.3 Neuronale Reaktion im ZNS

Nach einer peripheren Läsion ihres Axons, reagieren die Zellkörper von Motoneuronen mit einem typischen morphologischen Wandel, zu dem die klassische chromatolytische Reaktion gehört. Es treten vielfältige Veränderungen des Energiemetabolismus, der synaptischen Verbindungen und der elektrophysiologischen Eigenschaften auf. Diese Reaktion hat zwei Funktionen: Erstens wird die in den vorigen Abschnitten beschriebene, immunologische und gliale Reaktion, durch neuronale Signale reguliert. So spielt das von verletzten Neuronen gebildete IL-6 eine zentrale Rolle für die frühe Aktivierung der Mikroglia und die Anlockung von zirkulierenden T-Lymphozyten [36]. Auf der anderen Seite schaffen diese Veränderungen in den verletzten Neuronen die Voraussetzungen für eine erfolgreiche axonale Regeneration. Die vermehrte Expression von Bestandteilen des Zytoskeletts, trägt dem rasch zunehmenden Bedarf an Strukturproteinen in den auswachsenden Nervenfasern Rechnung [13, 56]. Die Synthese von Proteinen, die für die physiologische Funktion der Neurotransmission wichtig sind, wird dagegen gedrosselt. Die Neuropeptide CGRP und Galanin zeigen einen besonders starken reaktiven Anstieg nach Verletzung [69, 84, 105]. Auf Grund ihrer leichten immunhistochemischen Darstellbarkeit werden sie in dieser Arbeit als Marker der regenerierenden Axone und als biochemische Marker der zentralen neuronalen Reaktion verwendet.

#### 1.1.4 Axonale Regeneration peripherer Nerven

Verletzungen peripherer Nerven sind wesentlich häufiger und meist weniger schwerwiegend, als solche des ZNS. Das könnte eine evolutionsbiologische Erklärung dafür sein, dass sich hier die Fähigkeit zu Regeneration eher positiv ausgewirkt hat. Zudem ist die Komplexität der neuronalen Verbindungen in der Peripherie deutlich geringer, was die Chancen für eine erfolgreiche Regeneration erhöht. Die grundlegenden Arbeiten zu diesem Thema stammen von Cajal [18] und besitzen, obwohl über 70 Jahre alt, auch heute noch Gültigkeit; weitere Informationen sind aktuelleren Übersichtsartikeln zu entnehmen [13, 51, 55, 61, 64, 65, 81].

Wenn periphere Axone durch Druck, Kälte oder Durchtrennung eines ganzen Nerven geschädigt und in ihrer Kontinuität unterbrochen werden, kommt es zum Untergang des gesamten, distal der Läsion gelegenen Anteils. Dieser Vorgang ist als »Waller'sche Degeneration« bekannt und beginnt innerhalb von 24 bis 48 Stunden. Nach 72 Stunden ist eine massive Einwanderung von Makrophagen in den distalen Teil des Nerven zu beobachten, die zusammen mit den Schwann-Zellen Myelin und Überreste des Axons phagozytieren. Die Schwann-Zellen haben die Produktion von Myelin eingestellt, beginnen zu proliferieren und formen entlang des ehemaligen Verlaufs des zu Grunde gegangenen Neuriten die so genannten »Büngner'schen Bänder«, die ein wichtiges Substrat für die erfolgreiche spätere Regeneration darstellen und neuen auswachsenden Axonsprossen gleichsam als »Leitschiene« auf dem Weg zum Zielorgan dienen. Bereits 3 Stunden nach Verletzung beginnt sich der proximale Axonstumpf in einen »Wachstumskegel« (engl. »growth cone«) zu verwandeln, aus dem mehrere feine Fortsätze (Filopodien) auswachsen. Ob eine axonale Elongation in Richtung auf das Erfolgsorgan stattfindet, hängt in hohem Maße davon ab, welche Umgebung die aussprossenden Filopodien vorfinden. Je intakter die ursprüngliche Struktur des Nerven, seiner bindegewebigen Umhüllungen (Epi- und Perineurium) und der neurotubulären Basalmembran ist, desto wahrscheinlicher ist eine erfolgreiche Reinnervation. Nach einer Latenz von ein bis zwei Tagen, kann das Axon dann eine Strecke von maximal 4 mm pro Tag voranwachsen. Bei stark dislozierenden Verletzungen, wie sie beim Menschen nach Unfällen leider häufig vorkommen, ist ein »Wiederfinden« des Zielorgans allerdings selten möglich. In diesem Fall



**Abb. 1.1:**

Vorgänge nach Durchtrennung einer peripheren motorischen Nervenfasers. **A:** Die Unterbrechung des Axons (\*) führt zur so genannten »Waller'schen Degeneration« des distalen Anteils, in dem das Axon die Verbindung zum Zellkörper verloren hat. Auch im proximalen Stumpf zerfällt das Axon und seine Myelinscheide im umschriebenen Bereich des geschädigten Segmentes. **B:** Es kommt zur Ausbildung eines Wachstumskegels am proximalen Stumpf. Innerhalb der ersten drei Tage beginnen sich Schwann-Zellen zu teilen, im distal der Läsion gelegenen Teil beginnen Makrophagen und Schwann-Zellen, die ihr Myelin verloren haben, Zell-Debris sowie Axon- und Myelin-Abbauprodukte zu entfernen. **C:** Schwann-Zellen formieren sich zu so genannten »Büngner'schen Bändern« entlang des ehemaligen Verlaufs des degenerierten Axons, die dem auswachsenden Axonsprossen (engl. »axonal sprouts«) als »Leitschiene« zum Zielorgan dienen. **D:** Reinnervation des Zielorgans (hier: Muskelfaser) und Remyelinisierung des Axons führt zur Wiederherstellung der Funktion. **E:** Wird das Auswachsen des Axons durch Hindernisse, wie z. B. eine bindegewebige Narbe verhindert, so kommt es im proximalen Stumpf durch Wucherung von Schwann-Zellen und Fibroblasten zur Ausbildung eines Amputationsneuroms, eine Regeneration ist dann nicht mehr möglich. Das distale Büngner'sche Band kann dennoch über Jahre erhalten bleiben.

**Legende:** 1 Zellkörper 2 Axon 3 Schwann-Zelle 4 Basalmembran der Schwann-Zelle 5 Schwann-Zell-Proliferation 6 Markscheide 7 Myelin-Debris 8 Makrophagen 9 »Büngner'sche Bänder« aus proliferierenden Schwann-Zellen 10 Muskelfaser 11 Bindegewebsnarbe 12 Amputationsneurom

formen die auswachsenden Axonsprossen bei dem frustranen Versuch ihr Ziel zu reinnervieren ein so genanntes Amputationsneurom. Es muss darauf hingewiesen werden, dass selbst im günstigsten Falle und unter kontrollierten experimentellen Bedingungen, keine vollständige Restitutio ad integrum stattfindet. Ein mehr oder weniger großer Teil der Neurone geht stets zu Grunde, nicht alle überlebenden Neurone sind dazu in der Lage, ihr Ziel wieder zu finden, und die neu gebildeten Neuriten haben durch eine schlechtere Myelinisierung und einen kleineren Abstand zwischen den Ranvier'schen Schnürringen einen schlechteren funktionellen Zustand als die ursprünglichen. Abbildung 1.1 auf der gegenüberliegenden Seite veranschaulicht die beschriebenen Vorgänge.

## **1.2 Neurotrophine und ihre Rezeptoren**

### **1.2.1 Funktion im Nervensystem von Wirbeltieren und Mensch**

Die Neurotrophine sind eine kleine Gruppe sekretorischer Proteine, die als Wachstumsfaktoren für neuronale Zellen fungieren und eine Schlüsselrolle während der Entwicklung des Nervensystems von Wirbeltieren und Mensch spielen. Sie können viele Eigenschaften von Neuronen, wie z. B. Zellform und -funktion, beeinflussen und ihr Überleben in Phasen der Entwicklung fördern, in denen natürlicherweise neuronaler Zelltod auftritt [10, 34, 101]. Im adulten Nervensystem kommt ihnen vor allem unter pathologischen Bedingungen eine wichtige Rolle zu: So können Neurotrophine zum Beispiel eine starke neuroprotektive Wirkung auf akut verletzte oder degenerierende Neurone ausüben. Der Erforschung der Wirkungen dieser Moleküle bei der Regeneration im verletzten Nervensystem gilt großes wissenschaftliches Interesse, da ein besseres Verständnis der ablaufenden Vorgänge der Schlüssel zu einem möglichen therapeutischen Eingreifen in das komplizierte System regenerationsfördernder und -hemmender Mechanismen sein könnte.

### **1.2.2 Die vier Neurotrophine und ihre beiden Rezeptortypen**

Die bis heute bekannten Neurotrophine bei Säugetieren und Mensch sind »Nerve growth factor« (NGF), »Brain derived growth factor« (BDNF), Neurotrophin 3 (NT3) und Neurotrophin 4 (NT4). Die Wirkung dieser

Moleküle wird über zwei verschiedene Typen von Zelloberflächen-Rezeptoren vermittelt, was das breite Spektrum ihrer biologischen Effekte erklärt. Die erste Klasse bildet eine Gruppe von Rezeptor-Tyrosin-Kinasen, die sogenannten »Trk«-Rezeptoren (TrkA, TrkB und TrkC), die eine starke (aber keineswegs absolute) Spezifität für einzelne Neurotrophine aufweisen [47, 57, 103]. So ist NGF der Hauptligand für TrkA, BDNF und NT4 sind die bevorzugten Liganden für TrkB, und NT3 bindet vor allem an TrkC [4, 5]. In geringerem Maße ist NT3 aber beispielsweise auch Bindungspartner für TrkA und TrkB.

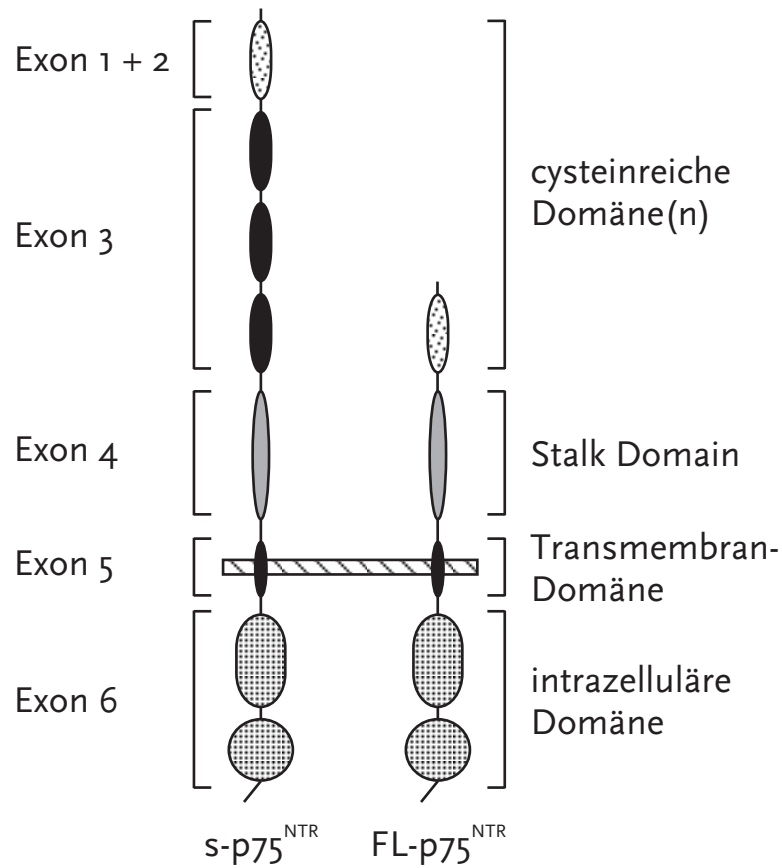
Der zweite Rezeptortyp ist ein 75 kDa schweres Glykoprotein ( $p75^{\text{NTR}}$ ), das als gemeinsamer Rezeptor für NGF, BDNF, NT3 und NT4 fungiert [25, 27, 89] und alle vier Neurotrophine mit vergleichbarer Affinität bindet. Diese liegt allerdings deutlich unter der Affinität der Trk-Rezeptoren zu ihren jeweiligen bevorzugten Liganden. Strukturell und funktionell gehört  $p75^{\text{NTR}}$  zur Superfamilie der Tumornekrosefaktor(TNF)-Rezeptoren [26, 63, 121], welche bis heute etwa 25 Mitglieder zählt. Darunter befinden sich unter anderem die beiden TNF-Rezeptoren (TNFR-1 und TNFR-2), Fas (Apo-1/CD95) und CD40. Es konnte gezeigt werden, dass  $p75^{\text{NTR}}$  auf Motoneuronen nicht nur während der Entwicklung des Nervensystems, sondern auch bei adulten Tieren unter pathologischen Bedingungen, wie Verletzung oder Neurodegeneration [45, 94], exprimiert wird. Über die funktionelle Bedeutung dieser Reexpression nach Zellschädigung herrscht jedoch bislang keine ausreichende Klarheit, und einige der publizierten Ergebnisse werfen sogar Widersprüche auf.

Die Effekte der Neurotrophine werden nicht nur durch voneinander unabhängige Signalwege vermittelt, sondern auch durch Wechselwirkungen ihrer Rezeptoren untereinander: So interagiert  $p75^{\text{NTR}}$  mit allen drei »Trk«-Rezeptoren und erhöht deren Affinität zu ihren Liganden sowie die Spezifität der Ligandenbindung [24]. Das Verständnis der Vorgänge wird zusätzlich durch die Tatsache erschwert, dass  $p75^{\text{NTR}}$  nicht nur förderliche Effekte vermittelt: Es gibt heute klare Evidenz dafür, dass der Rezeptor auch dazu im Stande ist, neuronalen Zelltod auszulösen [6, 20, 21, 35], was auf den ersten Blick paradox erscheint. Neuerdings wurde entdeckt, dass  $p75^{\text{NTR}}$  außerdem potentiell toxische Stoffe, wie Amyloid- $\beta$  oder Prionen-Proteine bindet und auch auf diesem Weg schädliche Effekte vermitteln kann [28, 75, 118].

Eine wichtige Beobachtung, die im Kontext dieser Arbeit besonders bedeutsam ist, besteht darin, dass p75<sup>NTR</sup> das Wachstum von Axonen bei der Regeneration peripherer Nerven reguliert. Bei der axonalen Elongation interagiert p75<sup>NTR</sup> mit dem Nogo-Rezeptor und fungiert als ein Korezeptor für die Moleküle MAG und Nogo, die auf Myelinscheiden im ZNS exprimiert werden und das Wachstum von Neuriten inhibieren [112, 119]. Wie auch andere Mitglieder der TNF-Rezeptor-Superfamilie, wirkt p75<sup>NTR</sup> darüber hinaus als Bindungspartner für Viren: Der Rezeptor kann ein Glykoprotein aus der Hülle des Rabies-Virus binden und dem neurotrophen Virus so den Eintritt in die Zelle ermöglichen [110].

### 1.2.3 Spleißvarianten von p75<sup>NTR</sup>

Bei verschiedenen Spezies, darunter Maus, Ratte, Huhn und Mensch, entstehen zwei Isoformen von p75<sup>NTR</sup> durch alternatives Spleißen auf mRNA-Ebene [91]. Der Volllängen-Rezeptor (FL-p75<sup>NTR</sup>) enthält alle sechs Exons des Gens, hat ein Molekulargewicht von 75 kDa und weist vier extrazelluläre Cystein-reiche Domänen auf. Bei der zweiten, kürzeren Spleißvariante (s-p75<sup>NTR</sup>) wird das Exon 3 aus der transkribierten mRNA herausgeschnitten. Wie Abbildung 1.2 auf der nächsten Seite veranschaulicht, sind sowohl der intrazelluläre Teil, als auch die Transmembrandomäne der beiden Proteine identisch, der kürzeren Variante fehlen jedoch drei der vier extrazellulären Cystein-reichen Domänen. Durch diese Veränderung verliert sie jegliche Affinität zu den Neurotrophinen (interessanterweise reicht die verbleibende, einzelne Cystein-reiche Domäne jedoch aus, um dem Rabies-Virus die Bindung und so den Eintritt in die Zelle zu ermöglichen [58]). Die biologische Funktion der verkürzten Spleißvariante ist bislang unklar.



**Abb. 1.2:**

Isoformen von p75<sup>NTR</sup>. Durch alternatives Spleißen entsteht aus dem p75<sup>NTR</sup>-Gen sowohl die Vollängen-Isoform (FL-p75<sup>NTR</sup>, Molekulargewicht 75 kDa), die alle sechs Exons enthält, als auch eine kürzere Isoform (s-p75<sup>NTR</sup>, 62 kDa), der das Exon 3 und somit drei der vier extrazellulären Cystein-reichen Domänen fehlen. Diese Spleißvariante hat keine Bindungsaffinität zu Neurotrophinen, ihre biologische Funktion ist bislang unklar. Da im ersten publizierten Modell p75<sup>NTR</sup>-defizienter Mäuse die Ausschaltung des Gens über eine Neomycin-Insertion in Exon 3 erfolgte (»Exon-3-Knockout«, p75e3<sup>-/-</sup>, [59]), ist bei diesen Tieren die s-p75<sup>NTR</sup>-Form unverändert nachweisbar. Bei den hier vorgestellten transgenen Mäusen zielte die Ausschaltung auf Exon 4, einen essentiellen Bestandteil beider Isoformen (»Exon-4-Knockout«, p75e4<sup>-/-</sup>, [91]).



## 1.3 Ziel der Arbeit und experimenteller Ansatz

### 1.3.1 Frühere Untersuchungen an transgenen Mäusen:

#### Ausschaltung des p75<sup>NTR</sup>-Gens durch Mutation in Exon 3

Die im letzten Abschnitt beschriebenen, relativ neuen Erkenntnisse über die Existenz einer Spleißvariante von p75<sup>NTR</sup>, haben Konsequenzen für die Interpretation früherer Daten aus Experimenten an so genannten »Knock-out-Mäusen«, also transgenen, p75<sup>NTR</sup>-defizienten Tieren: Im ersten publizierten Modell erfolgte die Ausschaltung des Gens durch eine Neomycin-Insertion in Exon 3, die zu einer Leseraster-Verschiebung führt [59]. Da das Exon 3 jedoch durch alternatives Spleißen aus dem Transkript entfernt werden kann, womit natürlich auch die künstlich eingeführte Mutation noch vor der Translation wieder aus der mRNA entfernt wird, fehlt diesen Tieren nur die Vollängen-Isoform (FL-p75<sup>NTR</sup>) des Rezeptors, nicht jedoch die kürzere Variante (s-p75<sup>NTR</sup>). Zentrale und periphere Neurone, die den NGF-Rezeptor exprimieren, scheinen bei diesen »Exon-3-Knock-outs« (p75e3-/-) in ihrer Funktion und in ihrem Überleben während der Entwicklung im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen beeinträchtigt zu sein. Dazu gehören vor allem Neurone des sympathischen Nervensystems, thermo- und nozizeptive Neurone, sowie cholinerge Neurone im basalen Vorderhirn [3, 59, 72]. Die Funktion von p75<sup>NTR</sup> in TrkA-negativen Neuronen, wie z. B. embryonalen und adulten Motoneuronen [29, 85, 93, 120], ist dagegen weniger offensichtlich und immernoch Gegenstand von Kontroversen [16, 32, 40, 116]. Alle bisher veröffentlichten Studien zeigen jedoch einheitlich einen starken Anstieg der Expression von p75<sup>NTR</sup> auf verletzten Motoneuronen nach Axotomie in Wildtyp-Mäusen [30, 41, 50, 53, 86, 117].

### 1.3.2 Transgene Deletion von p75<sup>NTR</sup> durch Mutation in Exon 4

Wegen der im vorhergehenden Abschnitt beschriebenen Probleme, wurde in der Abteilung Neurobiochemie eine neue Linie von transgener Mäusen geschaffen. Durch Insertion einer Neomycin-Kassette in das Exon 4, welches einen essentiellen Bestandteil *beider* Genprodukte darstellt (siehe Abbildung 1.2 auf der gegenüberliegenden Seite), wurde eine völlige Ausschaltung des p75<sup>NTR</sup>-Gens erreicht [91]. Diese im Folgenden als p75e4-/- oder »Exon-4-Knockouts« bezeichneten Tiere wurden für alle in dieser Arbeit beschriebenen Experimente verwendet.

### 1.3.3 Kontrolle des genetischen Hintergrundes von Versuchstieren

Der Auswahl geeigneter Kontrollen kommt bei Experimenten mit transgenen Tieren höchste Bedeutung zu, da der ungünstige Einfluss eines unterschiedlichen genetischen Hintergrundes eine wesentliche Quelle falsch-positiver Ergebnisse darstellt, welche nur durch sorgfältige Abstimmung (»Matching«) der zu vergleichenden Tiere ausgeschaltet werden kann (siehe hierzu auch die Artikel von Steward et al. [104], Werner et al. [114] und Threadgill et al. [108]). Da einige der in früheren Arbeiten beobachteten Effekte, bei Untersuchungen zwischen  $p75^{\text{NTR}}$ -defizienten und Wildtyp-Mäusen auf Unterschiede im genetischen Hintergrund der Tiere zurückzuführen sein könnten [32], wurde in dieser Arbeit große Sorgfalt bei der Auswahl der Wildtyp-Kontrolltiere angewendet: Zu jeder Gruppe von transgenen Tieren wurden Kontrollen in Wildtyp-Mäusen durchgeführt, die in Alter, Geschlecht und vor allem dem genetischen Hintergrund so genau wie möglich auf diese abgestimmt waren. Dies wurde dadurch sichergestellt, dass sowohl die homozygot  $p75^{\text{NTR}}$ -defizienten Tiere ( $-/-$ ), als auch ihre jeweiligen Wildtyp-Kontrollen F<sub>1</sub>-Nachkommen aus Verpaarungen heterozygoter ( $+/-$ ) Mäuse waren.

### 1.3.4 Fragestellung

Ziel dieser Arbeit war es, die zelluläre Lokalisation des Neurotrophinrezeptors  $p75^{\text{NTR}}$  zu bestimmen und seine Regulation und Funktion unter pathologischen Bedingungen, das heißt während der Regeneration im verletzten Nervensystem, zu untersuchen. Im Mittelpunkt des Interesses standen Einflüsse auf die Fähigkeit zur axonalen Regeneration, den neuronalen Zelltod nach Axotomie, sowie auf neurogliale Aktivierungsvorgänge und Lymphozyteneinwanderung in das ZNS nach Verletzung. Als Modell diente die periphere Axotomie des Nervus facialis bei der Maus, die Funktion des Rezeptors wurde an »Knockout«-Mäusen, die sich durch eine transgene Ausschaltung des Gens für  $p75^{\text{NTR}}$  auszeichnen, untersucht. Durch Verwendung beider verfügbaren Linien  $p75^{\text{NTR}}$ -defizienter Tiere und eine sorgfältige Abstimmung des genetischen Hintergrundes zwischen transgenen Mäusen und ihren Wildtyp-Kontrollen wurde die Erhebung verlässlicher experimenteller Daten sichergestellt. Dies trägt den Schwierigkeiten mit der Interpretation widersprüchlicher Daten aus früheren Experimenten Rechnung,

die auf Unterschiede im genetischen Hintergrund der Versuchstiere zurückzuführen sein könnten.



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Versuchstiere

Die in dieser Arbeit verwendeten transgenen Mäuse mit einer Neomycin-Insertion in Exon 4 des  $p75^{\text{NTR}}$ -Gens wurden in der Abteilung Neurobiochemie in einem gemischten C57Bl/6 und 129Sv/J Hintergrund generiert [91]. Das mutierte Allel wurde anschließend über 7 Generationen in einen C57Bl/6 Hintergrund zurückgekreuzt. Heterozygote ( $p75e4+/-$ ) Tiere aus dieser Generation wurden schließlich verpaart und ihre homozygoten  $p75e4-/-$  und  $+/+$  Nachkommen für die Versuche verwendet. Homozygote  $p75^{\text{NTR}}$ -defiziente Tiere mit einer Neomycin-Insertion in Exon 3 ( $p75e3-/-$ , [59]) in C57Bl/6-Hintergrund wurden von JACKSON Laboratories (Bar Harbor, ME, USA) erworben und mit Wildtyp C57Bl/6-Mäusen gekreuzt, um eine Kolonie heterozygoter  $p75e3+/-$  Tiere zu etablieren. Sämtliche homozygoten  $p75e3-/-$  Tiere und ihre  $+/+$  Kontrollen, die zu Versuchszwecken verwendet wurden, stammten aus Verpaarungen dieser Tiere.

Zur Genotypisierung wurde eine Biopsie aus der Schwanzspitze der 2 Wochen alten Mäuse entnommen und bei 56 °C in Proteinase-K-Lysispuffer (100 µg/ml, BOEHRINGER, Mannheim) über Nacht inkubiert. Das Lysat wurde mit einem Phenol/Chloroform-Gemisch behandelt und die genomische DNA mit Isopropanol gefällt, gewaschen und in 200 µl bidestilliertem Wasser gelöst. Die eingefügte Neomycin-Kassette wurde über eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) nachgewiesen, wobei 0,5 µl der gewonnenen DNA eingesetzt wurden. Dem PCR-Mix auf Basis von 1× PCR-Puffer (EUROBIO, Raunheim) wurden 2,0 mmol/l  $\text{MgCl}_2$ , 200 µmol/l dNTPs (Pharmacia, Freiburg) und 1,0 Einheiten Taq-Polymerase zugesetzt. Die Amplifikation begann bei 94 °C für 4 min, daran schlossen sich 30 Zyklen von jeweils 30 s bei 94 °C, 30 s bei 61 °C, und 30 s bei 72 °C an. Bei der Exon-4-Mutation erfolgte der Nachweis des unterbrochenen Exon 4 mit

den Primern 5'-AAG GGG CCA CCA AAG AAC GG-3' (pGK2-Primer, korrespondierend zu einer Sequenz aus der Neomycin-Kassette) und 5'-TGT TGG AGG ATG AAT TTA GGG-3' (Primer 2590, 101 bp im Intron lokalisiert); das intakte Exon 4 wurde mit 5'-GAT GGA TCA CAA GGT CTA CGC-3' (stromaufwärts der Insertionsstelle) und 5'-TGT TGG AGG ATG AAT TTA GGG-3' (Primer 2590) amplifiziert. Bei p75e3 wurde das veränderte Exon 3 mit den Primern 5'-CAA GCC GTG CAC CGA GTG C-3' und 5'-CGT CCT GCA CGA CGC GAG C-3', das intakte Exon 3 mit den Primern 5'-CAA GCC GTG CAC CGA GTG C-3' und 5'-GTA GGC ACG GGT CCA CGT G-3' nachgewiesen.

### 2.2 Herstellung eines Antikörpers gegen p75<sup>NTR</sup>

Die Herstellung eines polyklonalen Antiserums gegen die intrazelluläre Domäne von p75<sup>NTR</sup> erfolgte in der Abteilung für Neurobiochemie, das affinitätsgereinigte Serum wurde uns freundlicherweise für immunhistochemische Färbungen zur Verfügung gestellt. Zunächst wurde die entsprechende DNA-Sequenz der intrazellulären Domäne von p75<sup>NTR</sup> (aus der Ratte) in einen geeigneten Vektor zur Proteinexpression (pQE-31, QIAGEN) in *E. coli* inkloniert, wodurch gleichzeitig sechs Histidin-Reste (»His-Tag«) an den N-Terminus des zu exprimierenden Proteins angefügt wurden (»His6p75<sup>NTR</sup>ICD«). Dieses Konstrukt wurde vor kurzem auch dazu verwendet, die Tertiärstruktur der intrazellulären Domäne (»Death Domain«, p75<sup>NTR</sup>ICD) von p75<sup>NTR</sup> aufzuklären [60] und wurde unserem Institut freundlicherweise vom Labor von Leopold Ilag (Karolinska Institut, Stockholm) zur Verfügung gestellt. Mit diesem Vektor transformierte *E. coli*-Kulturen wuchsen in LB-Medium (100 µg/ml Ampicillin, 25 µg/ml Kanamycin) bis zu einer OD<sub>600</sub> (optische Dichte, gemessen bei 600 nm) von 0,8. Die Überexpression des Proteins wurde mit IPTG (1 mmol/l) für 5 Stunden induziert. Anschließend wurden die Bakterien pelletiert (20 min, 2500 g) und in Lysis-Puffer resuspendiert (50 mmol/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 300 mmol/l NaCl, 10 mmol/l Imidazol, pH = 8,0). Die Zellen wurden sonifiziert (5 × 1 min), zentrifugiert (30 min, 20 000 g) und eine zuvor mit Lysis-Puffer äquilibrierte Nickel-Säule (1 ml Nickel-Sepharose-»Beads«) mit dem gewonnenen Überstand beschickt. Nach wiederholtem Waschen (Wasch-Puffer: wie Lysis-Puffer, jedoch 20 mmol/l Imidazol) wurde das Protein von der

Säule eluiert (Elutions-Puffer: wie Lysis-Puffer und Wasch-Puffer, jedoch 250 mmol/l Imidazol).

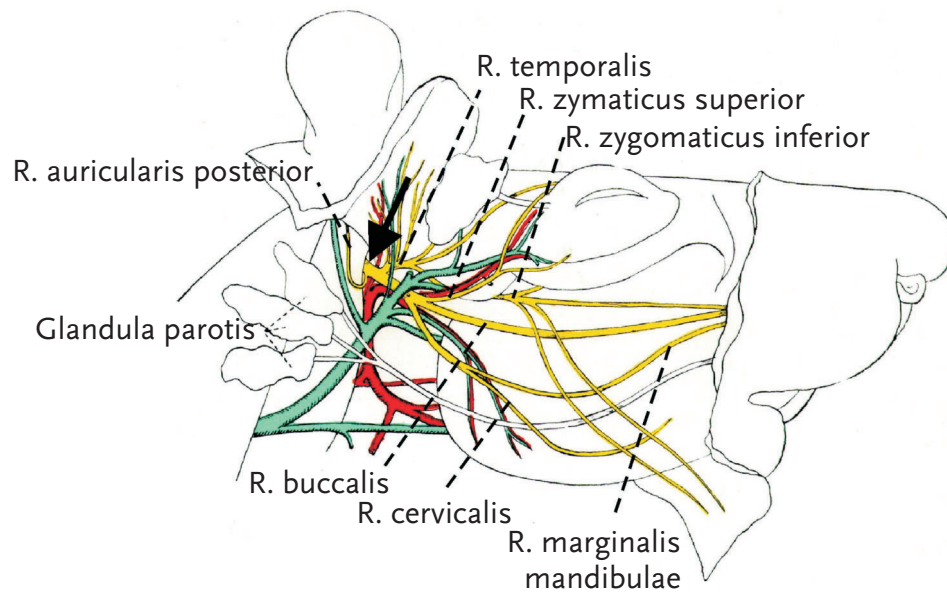
Männliche Chinchilla Mischlings-Kaninchen wurden mit dem auf diese Weise aufgereinigten Protein His6p75<sup>NTR</sup>ICD immunisiert. Wie allgemein üblich, wurde es für die erste Injektion mit komplettem Freund'schem Adjuvans gemischt, wogegen die folgenden Immunisierungen (»Boosts«) mit inkomplettem Freund'schem Adjuvans durchgeführt wurden. Die Kaninchen erhielten »Boosts« mit 250–300 µg His6p75<sup>NTR</sup>ICD in 0,5 ml inkomplettem Freund'schem Adjuvans fünf mal alle 3 Wochen subkutan, verteilt auf 6 Injektionsstellen. Schließlich wurde 12 Tage vor der Entnahme des Blutes nochmals 1 mg Protein injiziert. Das Serum wurde durch Koagulation und Zentrifugation (10 min, 10 000 g) gewonnen und bei –80 °C gelagert.

## 2.3 Axotomie des Nervus facialis

### 2.3.1 Vorteile des Modells

Die Axotomie des Nervus facialis bietet als tierexperimentelles Modell günstige Bedingungen für Untersuchungen am verletzten Nervensystem, sowohl was die praktische Durchführbarkeit, als auch was die Aussagekraft der gewonnenen Ergebnisse betrifft. Auf Grund seines oberflächlichen Verlaufes kann der Nerv nahe seinem Austritt aus dem Schädel am Foramen stylomastoideum leicht aufgesucht und zuverlässig durchtrennt oder gequetscht werden. Die kräftige Quetschung des Nerven mit einer feinen Pinzette führt bei richtiger Arbeitstechnik – genau wie die Durchtrennung – zu einer vollständigen Axotomie aller Fasern. Die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Regeneration ist allerdings im Vergleich zur kompletten Durchtrennung stark erhöht, da proximaler und distaler Teil des Nerven nicht disloziert werden und die Nervenscheide als »Leitbahn« für auswachsende Fasern intakt bleibt. Der Fazialisnerv selbst kann entnommen und z. B. zur Gewinnung histologischer Schnitte verwendet werden, um die *in vivo* abgelaufenen Regenerationsvorgänge morphologisch zu untersuchen.

Im ZNS führt die periphere Verletzung des Nerven zu einer raschen retrograden Reaktion der Somata der betroffenen Neurone und der umgebenden Mikro- und Astroglia. Der Nucleus facialis ist ein großer, gut abgrenzbarer und daher leicht aufzufindender Kern im Hirnstamm, der



**Abb. 2.1:**

Anatomische Verhältnisse bei der Axotomie des Nervus facialis. Die Läsion wird kurz nach Austritt des Nerven aus der Schädelbasis gesetzt (schwarzer Pfeil). Es ist darauf zu achten, auch die Fasern des am weitesten proximal abgehenden Astes (Ramus auricularis posterior) zu erfassen, um eine komplette Axotomie zu erreichen.

ausreichend Material zur Untersuchung bietet; er eignet sich somit insbesondere auch für quantitative Analysen. Das Kerngebiet enthält ausschließlich motorische Neurone, die alle samt durch einen einzigen Schnitt axotomiert werden können. Mit seinem (unversehrten) kontralateralen Pendant steht dem durch die Operation lädierten Kerngebiet eine zuverlässige intraindividuelle Kontrolle gegenüber.

Die meisten anderen Tiermodelle für Hirnverletzung und -entzündung, wie z. B. direktes Trauma, Ischämie, Infektion oder die experimentell-allergische Enzephalomyelitis (EAE) gehen mit einer frühen Störung der Blut-Hirn-Schranke einher, was zum Einstrom von Zellen und Serumproteinen aus dem Blut in das ZNS führt. Die eingewanderten Zellen (wie Makrophagen und Granulozyten) und Proteine, unter denen sich z. B. auch potente entzündungsfördernde Zytokine befinden, führen zu Veränderungen der Entzündungs- und Immunreaktion, was bei der Interpretation der Ergebnisse stets berücksichtigt werden muss. Eingewanderte Makrophagen lassen sich außerdem wegen ihres nahezu identischen Antigenprofils prak-



tisch nicht von mikroglialen Zellen unterscheiden [38, 54, 76]. Je nach verwendetem Modell und Fragestellung können diese Effekte erwünscht sein, oder aber unterschiedlich stark bei der Interpretation der Ergebnisse stören. Für das genaue Studium der mikroglialen Reaktion nach Verletzung ist die Abwesenheit von Blutzellen eine unbedingte Voraussetzung, da nur so die eindeutige Identität mikroglialer Zellen sicher gestellt werden kann. Das Modell des axotomierten Nervus facialis bietet hierfür ideale Voraussetzungen, da es durch die periphere Lage der Läsion zu keiner Störung der Blut-Hirn-Schranke kommt [37, 79]: Weder Zellen noch Serumproteine dringen aus dem Blut in das Hirngewebe ein [80, 87, 100]. Bei der Maus führt der verzögerte neuronale Zelltod allerdings (anders als bei einigen anderen Tieren) zur chemotaktisch gesteuerten Einwanderung von zirkulierenden Lymphozyten aus dem Blut [80], welche Kontakt mit der phagozytierenden und Antigen-präsentierenden Mikroglia aufnehmen.

### 2.3.2 Durchführung der Operation

Alle Tiere wurden unter Anästhesie durch intraperitoneale Injektion von Tribromethanol (Avertin<sup>®</sup>) oder einer Kombination aus Ketamin (Ketanest<sup>®</sup>) und Xylazin (Rompun<sup>®</sup>) operiert. Nach Setzen eines kleinen Hautschnittes hinter dem Ohr, wurde der rechte Nervus facialis unmittelbar nach seinem Austritt aus dem Foramen stylomastoideum freipräpariert und durchtrennt. Für Regenerationsexperimente wurden der Nerv und sein Ramus auricularis posterior, etwa 1 mm distal des Foramen stylomastoideum, mit einer feinen Pinzette gequetscht (Die Quetschung führt ebenfalls zu einer komplette Axotomie aller Fasern des Nerven, siehe dazu auch Abschnitt 2.3.1, Absatz 1, auf Seite 31). Alle zu einer Gruppe gehörenden Tiere (Tag-4-Gruppe, Tag-14-Gruppe, Tag-60-Gruppe, Gruppe für den Zeitverlauf von Tag 0–42) wurden am selben Tag in einem sehr engen Zeitfenster von 1 bis maximal 3 Stunden (Tag-60-Gruppe) unter exakt gleichen Bedingungen operiert, zwischen transgenen Tieren und Wildtyp-Kontrollen wurde stets abgewechselt. Die Durchführung der Tierversuche wurde von der Regierung von Oberbayern genehmigt (Tierversuchsnummern 211-2531-10/93 und -37/97).

## **2.4 Aufarbeitung des Gewebes und Immunhistochemie**

### **2.4.1 Perfusion der Tiere und Fixierung des Gewebes**

Zu definierten Zeitpunkten (1, 2, 4, 7, 14, 21, 42 und 60 Tage) nach Operation wurden die Tiere getötet, sofort für jeweils 5 Minuten mit PBS und 4 % PFA (gelöst in PBS) transkardial mit einer elektrischen Pumpe (40 ml/min) perfundiert. Das Gewebe (Hirn, Trigeminalganglien, Zervikalganglien und innere Organe wie Milz, Leber, Nieren und Herz) wurde entnommen und in 1 % PFA für 2 Stunden bei 4 °C unter ständigem Rotieren nachfixiert. Zum Gefrierschutz wurde das Gewebe anschließend über Nacht in 30%-ige Saccharose-Lösung, ebenfalls bei 4 °C auf einem Rotator, eingelegt, danach auf Trockeneis eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei –80 °C gelagert.

Bei den Mäusen der Tag-4-Gruppe, bei denen nicht nur das Gehirn, sondern auch der Nervus facialis für die Regenerationsexperimente entnommen wurde, schloss sich an die fünfminütige Perfusion mit 4 % PFA eine zusätzliche einstündige Perfusion mit 1 % PFA an, um den Nerven bereits vor seiner Entnahme in situ zu fixieren. Dies geschah auch, um die Präparation zu erleichtern, die unter einem Operationsmikroskop durchgeführt wurde. Der entnommene Nerv wurde dann auf einer absolut glatt gestrichenen Aluminiumfolie ausgebreitet, mit OCT-Einbettmedium überdeckt und auf Trockeneis eingefroren.

### **2.4.2 Anfertigung von Gefrierschnitten**

Zur Gewinnung von histologischen Schnitten wurden die Präparate mit einem Kryotom bei einer Kammertemperatur von –25 °C und einer Objekttemperatur von –15 °C geschnitten. Die Schnittdicke betrug, sofern nicht anders angegeben, 20 µm. So konnten aus einem Hirnstamm mehr als 30 Schnitte, auf denen beide Fazialiskerne beurteilbar waren, gewonnen werden. Hirnschnitte für die Zählung von Neuronen wurden in 25 µm Dicke angefertigt (die größere Schnittdicke wurde gewählt, um den Fehler durch doppelt gezählte Zellen auf benachbarten Schnitten zu reduzieren; siehe hierzu auch Abschnitt 2.7.1 auf den Seiten 42–43). Die Nerven wurden in 10 µm Dicke längs geschnitten, so dass pro Fazialisnerv etwa 20–25 Schnitte von ausreichender Qualität angefertigt werden konnten). Alle

Schnitte wurden auf warmen, mit 0,5 % Gelatine beschichteten Objektträgern aufgenommen, sofort auf Trockeneis eingefroren und bis zur Benutzung bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 2.4.3 Immunhistochemie in ABC/DAB-Technik

Zur Vorbereitung für die Immunhistochemie wurden die Gewebsschnitte aufgetaut, mit destilliertem Wasser rehydriert, mit einem feinen Pinsel auf dem Objektträger ausgebreitet und unter einem sanften Luftstrom für 5 Minuten getrocknet [68]. Nach Kurzfixierung (5 Minuten in 3,7 % FA) wurden die Schnitte für je 2 Minuten mit 50%, 100% und 50% Aceton (verdünnt mit destilliertem Wasser) entfettet (je nach verwendetem Antikörper, siehe Liste der primären Antikörper in Abschnitt 2.10.1.1 auf Seite 47). Anschließend wurden sie zwei mal in PB und in PB mit 0,1 % Rinder-Serum-Albumin (PB/BSA) gewaschen und für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit 5 % Ziegen Serum in PB präinkubiert. Diese Flüssigkeit wurde schließlich mit einer Pipette von den Objektträgern abgesaugt, gegen den in PB/BSA verdünnten primären Antikörper ausgetauscht und über Nacht bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  inkubiert (Verdünnungen der primären Antikörper: siehe ebenfalls Abschnitt 2.10.1.1). Am nächsten Tag wurden die Schnitte in PB/BSA, zwei mal PB und wieder PB/BSA gewaschen und mit den entsprechenden sekundären Antikörpern für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die biotinylierten Sekundär-Antikörper wurden zuvor für 30 Minuten bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  mit der doppelten Menge Mauserum präadsorbiert (um unspezifische Bindungsstellen der Antikörper zu blockieren), *danach* mit PB/BSA auf die gewünschte Konzentration von 1:100 verdünnt und mit 5 % Ziegen Serum versetzt. Nach erneutem Waschen in zwei mal PB/BSA und zwei mal PB wurden die Schnitte für 1 Stunde bei Raumtemperatur mit ABC-Reagenz (VECTOR) inkubiert, das unter Ausnutzung der biotinbindenden Eigenschaft des Avidins an die sekundären Antikörper bindet. Die Schnitte wurden anschließend wieder gewaschen ( $2 \times \text{PB}$ ,  $2 \times \text{PBS}$ ) und für 1 bis 10 Minuten in einem Gemisch aus 3'-3'-Diaminobenzidin (DAB, 0,05 %) und  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0,1 %) in PBS gefärbt. Bei dieser enzymatischen Reaktion wird gelöstes DAB (unter Reduktion von  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) durch die Peroxidase des ABC-Reagenz oxidiert, was zu seiner Polymerisierung und zur Bildung eines rötlich-bräunlichen, unlöslichen Farbstoffes führt. Färbungen gegen die Antigene

MHC-I,  $\alpha_5\beta_1$ -Integrin,  $\alpha_6\beta_1$ -Integrin, ICAM-1 und CD3 wurden durch Zugabe von 0,25 g/l  $\text{CoCl}_2$  und 0,2 g/l  $\text{NiSO}_4$  zur oben beschriebenen Färbelösung aus DAB und  $\text{H}_2\text{O}_2$  verstärkt («Kobalt-Nickel-Verstärkung»). Die Kobalt- und Nickel-Ionen bilden Chelate mit dem polymerisierten DAB, intensivieren dadurch die Färbung und geben ihr einen blau-schwarzen Ton, ohne die unspezifische Hintergrundfärbung nennenswert zu erhöhen. Nach Abstoppen der Reaktion in destilliertem Wasser wurden die Schnitte in einer Alkoholreihe dehydriert ( $2 \times 70\%$ ,  $90\%$ ,  $96\%$ ,  $2 \times 100\%$  Ethanol,  $2 \times$  Isopropanol,  $2 \times$  Xylol) und mit DEPEX Mounting-Medium (BDH, Poole, England) eingebettet. Ersetzung des primären Antikörpers durch nicht spezifische Immunglobuline der selben Spezies (Ratte, Hase oder Hamster) bei gleicher Verdünnung, führte zum völligen Verschwinden des Signals.

#### **2.4.4 Fluoreszenz-Immunhistochemie**

Zwischen der Immunhistochemie in ABC/DAB-Technik (bei der die Färbung durch einen enzymatischen Vorgang erfolgt) und der Fluoreszenz-Immunhistochemie bestehen einige wichtige Unterschiede – letztere bietet unter anderem folgende Vorteile:

- Die Schnitte können durch konfokale Laser-Mikroskopie in definierten Ebenen ausgewertet und aufgenommen werden (siehe Abschnitt 2.5 auf den Seiten 37–38).
- Gleichzeitige Färbungen gegen zwei (oder mehr) Antigene sind möglich. Solche Doppelmarkierungen erlauben bei Auswertung durch konfokale Mikroskopie zuverlässige Aussagen über die Kolo-kalisation der Antigene.
- Semiquantitative Aussagen über die Menge des detektierten Antigens sind möglich, da die Stärke des Signals nur von der Menge der gebundenen (Primär-, Sekundär- und Tertiär-) Antikörper abhängt und keine enzymatischen Vorgänge an der Entstehung der Färbung beteiligt sind.

Nachteilig kann hauptsächlich die nicht unbegrenzte Lebensdauer der fluoreszenzgefärbten Präparate sein, der die dauerhafte Haltbarkeit eines DAB-gefärbten und wasserfrei eingebetteten Schnittes gegenübersteht.

Im folgenden werden nur die Besonderheiten bei der Arbeitstechnik der Fluoreszenz-Immunhistochemie beschrieben. Soweit nicht anders erwähnt, gilt das in Abschnitt 2.4.3 auf den Seiten 35–36 für die IHC in ABC/DAB-Technik beschriebene. Für die Präinkubation der Schnitte wurde Esel- statt Ziegenserum verwendet, die beiden primären Antikörper wurden gleichzeitig in der jeweils optimalen Verdünnung über Nacht zur Inkubation auf die Schnitte gegeben. Für die Doppel-Immunfluoreszenz-Färbungen in dieser Arbeit kam ausschließlich die Kombination eines polyklonalen Antikörpers aus Kaninchen und eines monoklonalen Antikörpers aus Ratte zum Einsatz (Zu Konzentration und Herkunft der verwendeten Antikörper siehe Abschnitt 2.10.1.1 auf Seite 47). Nach dem Waschen wurden die Schnitte (ebenfalls simultan) für 1 Stunde bei Raumtemperatur im Dunklen mit den entsprechenden sekundären Antikörpern inkubiert. Verwendet wurden FITC- bzw. biotinkonjugierte Antikörper aus Ziege, gerichtet gegen Ratten bzw. Kaninchen IgG. Die Färbung des FITC-konjugierten Antikörpers wurde daraufhin durch einen tertiären, ebenfalls FITC-konjugierten Antikörper (in diesem Fall aus Esel, gerichtet gegen Ziegen-IgG verstärkt. An den anderen sekundären, biotinkonjugierten Antikörper wurde Cy3- oder Texas-Red(TR)-markiertes Avidin gebunden (Ausnutzung der biotinbindenden Eigenschaft des Avidins). Die Inkubation fand für 2 Stunden bei Raumtemperatur im Dunklen statt. Die Schnitte wurden mit VectaShield® eingebettet, und bis zur Verwendung bei 4 °C im Dunklen gelagert.

## 2.5 Konfokale Lasermikroskopie

Digitale Aufnahmen der FITC- und Cy3-Fluoreszenz-gefärbten Präparate wurden an einem konfokalen Lasermikroskop aufgenommen (LEICA TCS 4D, 100× Objektiv). Die FITC-Immunfluoreszenz wurde bei 488 nm angeregt, die Cy3- und Texas-Red(TR)-Immunfluoreszenz bei 568 nm, das FITC-Signal erscheint dabei grün, Cy3 und TR rot. Die beiden Fluoreszenzfarbstoffe, die jeweils für eine Doppelmarkierung verwendet worden waren (FITC + Cy3 oder FITC + TR) wurden gleichzeitig angeregt, die Emissionsspektren durch geeignete Filter aufgetrennt und ihre Intensität durch getrennte Fotodetektoren simultan gemessen. So entstand für jeden »Kanal« ein Bild von 1024 × 1024 Bildpunkten Auflösung und 8 Bit

Tiefe (entsprechend 256 Grau- bzw. Helligkeitsstufen). Es wurde 128-fache Signalmittelung und ein 1–4× Zoom verwendet.

Insbesondere in fixiertem Gewebe führt die Bestrahlung mit Laserlicht zur Emission von unspezifischer Fluoreszenz, so genannter Autofluoreszenz. Um dieses störende Phänomen zu eliminieren, wurden Bilder mit den Einstellungen für die Cy5-Fluoreszenz aufgenommen, einem in diesem Fall nicht zur Färbung verwendeten Farbstoff (Anregung bei 647 nm, Detektion im Infrarot-Bereich). Da sich die Autofluoreszenz sowohl durch Anregbarkeit in einem breiten Frequenzspektrum, als auch durch Emission von Licht in einem großen Wellenlängenbereich auszeichnet, konnten diese, in einem ungenutzten »Kanal« gewonnenen Bilder, zur Extraktion der Autofluoreszenz aus den Cy3 und FITC-Bildern verwendet nach dem von Raivich et al. [79] beschriebenen Prinzip verwendet werden. Dabei wurden die Bilder aus dem Cy5-Kanal, nach Korrektur durch einen so genannten linearen Subtraktionskoeffizienten (LSK), pixelweise von den FITC-, TR- und Cy3-Bildern subtrahiert, um den Beitrag der Autofluoreszenz zur Gesamtfluoreszenz zu eliminieren. Die LSKs ( $LSK_{FITC}$ ,  $LSK_{TR}$ ,  $LSK_{Cy3}$ ) wurden getrennt für die drei zur Färbung verwendeten Farbstoffe nach der folgenden Formel berechnet, die Vorgehensweise wird hier beispielhaft für  $LSK_{FITC}$  gezeigt:

$$LSK_{FITC} = \frac{Mean_{FITC/AFS} - Mean_{FITC}}{Mean_{Cy5/AFS} - Mean_{Cy5}}$$

Zunächst wurden stark autofluoreszente Strukturen im Cy5-Bild in der OPTIMAS 6.2-Software markiert, als Schwellenwert hierfür wurde die Summe aus dem durchschnittlichen Lichtwert (OLV) aller Pixel des Bildes ( $Mean_{Cy5}$ ) und 5 Standardabweichungen festgelegt. Dann wurde der durchschnittliche Lichtwert *innerhalb* dieser Strukturen berechnet ( $Mean_{Cy5/AFS}$ ). Die Profile der im Cy5-Bild abgegrenzten autofluoreszenten Strukturen wurden dann auf das FITC-Bild übertragen, und die durchschnittlichen Lichtwerte wurden für das gesamte Bild ( $Mean_{FITC}$ ) und für den Bereich dieser Profile ( $Mean_{FITC/AFS}$ ) berechnet. Das korrigierte Bild ( $COR_{FITC}$ ) entstand schließlich durch pixelweise Subtraktion der um  $LSK_{FITC}$  korrigierten Lichtwerte des Cy5-Bildes ( $OR_{Cy5}$ ) vom ursprünglichen FITC-Bild ( $OR_{FITC}$ ):

$$COR_{FITC} = OR_{FITC} - LSK_{FITC} \times OR_{Cy5}$$

## 2.6 Lichtmikroskopie und Quantifizierung von Färbeintensität

### 2.6.1 Aufnahme digitaler Bilder am Lichtmikroskop

Die Aufnahme der digitalen Fotografien von immunhistochemisch gefärbten Schnitten, für die Abbildungen in dieser Arbeit und für die quantitative Auswertung von Färbeintensitäten, erfolgte an einem Lichtmikroskop (ZEISS AXIOPHOT) mit Hilfe einer SONY 3 CCD-Videokamera (AVT-HORN, Aachen), es wurden stets digitale Bilder in einer Auflösung von  $720 \times 576$  Bildpunkten (Pixel) und 24 Bit Farbtiefe, bei unterschiedlicher Vergrößerung angefertigt. Es wurde jeweils nur *einer* der drei 8-Bit-Farbkanäle (rot/grün/blau, »RGB«) des 24-Bit-RGB-Bildes zur Gewinnung eines 8-Bit-Graustufen-Bildes verwendet, die Information der anderen beiden Farbkanäle wurde verworfen. Für DAB-Färbungen ohne Kobalt-Nickel-Verstärkung wurde nur der blaue, für solche mit Kobalt-Nickel-Verstärkung nur der grüne Kanal herangezogen.

### 2.6.2 Digitale Messung der Lichtextinktion

Zur Quantifizierung von Färbeintensitäten wurde das, wie im vorigen Abschnitt beschrieben gewonnene, 8-Bit-Graustufen-Bild ausgewertet, jedem der  $720 \times 576$  Bildpunkte ist dabei ein optischer Lichtwert (Optical luminosity value, OLV) im Bereich von 0 bis 255 zugeordnet – höhere Werte bedeuten dabei mehr durchtretendes Licht, also weniger Färbung. Diese digital gemessenen Lichtwerte können nur dann als ein Maß für die Färbeintensität verwendet werden, wenn sichergestellt ist, dass innerhalb eines bestimmten Bereiches eine mathematische Beziehung zwischen der tatsächlichen Stärke des durchtretenden Lichtstrahls und dem digital gemessenen OLV herrscht. Dieser Zusammenhang wurde durch das folgende, von Kloss [48] beschriebene Prinzip ermittelt. Da die OLVs durch einen 8-Bit-Wert repräsentiert werden und daher nur in einem Bereich von 0 bis 255 liegen können, ist es wichtig, den Bereich zu kennen, in dem sinnvolle Messergebnisse zu erwarten sind: Oberhalb und unterhalb dieses Bereiches sind fehlerhafte Messungen durch Überbelichtung (bzw. Überstrahlung) und Unterbelichtung zu erwarten, in der Regel wird dann durch eine Abnahme des Kontrastes die Stärke der Färbung unterschätzt. Ein valides Ergebnis ist

dann anzunehmen, wenn möglichst alle Lichtwerte der Pixel, welche in die Messung eingehen, innerhalb des zuvor bestimmten Bereichs liegen – die Beleuchtungsspannung ist jeweils für eine Serie von Schnitten so zu wählen, dass dies der Fall ist.

In einem Vorexperiment wurde ein leerer Glasobjektträger teilweise mit einer Folie, die als modellhafter Filter zur Abschwächung des Lichtstrahls diente, bezogen, dann wurden die OLVs im Bereich des Filters und im Bereich des Glases, bei unterschiedlicher Beleuchtungsspannung gemessen. Das Verhältnis von  $OLV_{Filter}$  zu  $OLV_{leer}$  wird als Extinktionskoeffizient  $\varepsilon$  bezeichnet. Wie dieser Versuch zeigte, ist  $\varepsilon$  über einen weiten Bereich ( $OLV_{leer} = 48\text{--}250$ ) relativ konstant, werden OLVs in diesem Bereich gemessen, so gilt:

$$\varepsilon = \frac{OLV_{Filter}}{OLV_{leer}} = konst. \quad (1)$$

Wegen der Konstanz von  $\varepsilon$  im Messbereich kann der Lichtwert nach  $f$  Filtern, die den Lichtstrahl nacheinander abschwächen, als Funktion  $OLV(f)$  ausgedrückt werden:

$$OLV(f) = \varepsilon OLV(f - 1), \quad (2)$$

bezogen auf den ursprünglichen Fall gilt:

$$OLV(1) = \varepsilon OLV(0) \quad (3)$$

$$\text{mit } OLV(1) = OLV_{Filter} \quad \text{und} \quad OLV(0) = OLV_{leer}.$$

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

$$OLV(f) = \varepsilon^f OLV(0). \quad (4)$$

Im Experiment wird  $f$  gesucht und OLV gemessen. Auflösung der Gleichung ergibt:

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



Auf Grund seiner physikalisch-chemischen Eigenschaften ist die Filterwirkung des Farbstoffes proportional zu seiner Konzentration (Färbestärke). Wenn  $OLV(0)$  der Lichtwert für die Referenz (z. B. leeres Glas) und  $OLV(f)$  der Lichtwert der zu messenden Färbung ist, so gilt für die Färbeintensität  $FI$ :

$$FI \sim \ln \frac{OLV(0)}{OLV(f)}. \quad (6)$$

Ist der Unterschied zwischen  $OLV(0)$  und  $OLV(f)$  gering, so ist die Differenz der Werte näherungsweise dem natürlichen Logarithmus aus ihrem Quotienten proportional, und  $FI$  kann vereinfachend als

$$FI \sim OLV(0) - OLV(f) \quad (7)$$

beschrieben werden. Die beiden Formeln (6) und (7) zeigen also, dass sich die Intensität zweier Färbungen durch Messung der Lichtwerte (OLV) auf Verhältnisniveau vergleichen lassen. Dies bildet die Grundlage für den Vergleich der DAB-Niederschlagsfärbung, sowohl mit, als auch ohne Kobalt-Nickel-Verstärkung, in dieser Arbeit.

### 2.6.3 Quantifizierung nach dem »Mean–SD«-Algorithmus

Für die Quantifizierung von lichtmikroskopischer Immunreaktivität wurden die Bildausschnitte so gewählt, dass der zu messende Bereich das Gesichtsfeld jeweils voll ausfüllte, dadurch konnte auf die Definition eines zu messenden Bereiches innerhalb eines Bildes (»Region of interest«, ROI) verzichtet werden. Grundsätzlich gingen also alle  $720 \times 576$  Pixel einer Aufnahme in die Messung ein. Es wurden jeweils Bilder vom Nucleus facialis auf der verletzten und unversehrten Seite angefertigt und zusätzlich entweder zusätzlich entweder Aufnahmen vom gewebefreien Glas des Objektträgers, oder vom Hirnstamm in der Mittellinie des Schnittes. Je nach Stärke der Hintergrundfärbung für einen bestimmten Antikörper, wurde eine der beiden letzteren Aufnahmen zur Extraktion des unspezifischen Anteils der Färbung verwendet: Bei (vor allem polyklonalen) Antikörpern, die eine starke unspezifische Hintergrundfärbung erzeugten, wurde die Aufnahme aus der Mitte des Hirnstammes verwendet, bei (vor allem monoklonalen)

Antikörpern, die eine hochspezifische, hintergrundarme Färbung erzeugen, die Aufnahme des leeren Objektträgerglases.

Den einfachsten Ansatz zum Vergleich von Färbeintensitäten stellt im Prinzip die Berechnung des OLV-Mittelwertes von allen Pixeln eines Bildes dar. In der Praxis ist dieser Ansatz jedoch nur eingeschränkt brauchbar: Zum einen sind die mit dieser Methode gemessenen Unterschiede meist sehr gering, selbst wenn für einen menschlichen Betrachter eine deutliche Differenz augenfällig ist; zum anderen geht die Höhe der Standardabweichung nicht in die Berechnung ein. Eine starke *Änderung* der optischen Lichtwerte über einer relativ kleinen Fläche führt zu einem nur gering ausgeprägten Anstieg des Mittelwertes (*Mean*), jedoch zu starken Veränderungen der Standardabweichung (*SD*). Da dies jedoch auch einer starken Immunfärbung entspricht, macht es Sinn, diese Größe in die Berechnung mit einzubeziehen. Als besonders stabiles Maß für die Färbeintensität hat sich der so genannte »Mean–SD«-Algorithmus erwiesen [68], nachdem sich die Färbeintensität *FI* wie folgt berechnet:

$$FI = 255 - (Mean - SD).$$

Der Ausdruck (*Mean – SD*) ist ein umgekehrtes Maß für die Intensität der Färbung (denn sowohl ein *niedriger* Wert für »*Mean*«, als auch ein *hoher* Wert für »*SD*« korreliert mit einer starken Färbung), dessen Wert theoretisch zwischen 0 und 255 schwanken kann. Die Subtraktion dieses Wertes von 255 führt dazu, dass hohen Werten in der Färbeintensität auch eine starke Färbung entspricht (und nicht, wie bei den optischen Lichtwerten, umgekehrt).

## 2.7 Quantifizierung von Zellzahlen

### 2.7.1 Quantifizierung überlebender Neurone nach Fazialisaxotomie

Die neuronale Zellzahl im Nucleus facialis wurde 60 Tage nach Durchtrennung des Fazialisnerven, sowohl auf der operierten rechten, als auch auf der als Kontrolle dienenden linken Seite bestimmt. Hierzu wurde aus dem Hirnstamm der Tiere ein Satz von 45 transversalen Schnitten mit einer Dicke von je 25 µm angefertigt, so dass beide Fazialiskerne in ihrer gesam-

ten rostro-kaudalen Ausdehnung erfasst wurden. Sämtliche Schnitte wurden mit Toluidin-Blau gefärbt und alle neuronalen Zellprofile im Gebiet des Nucleus facialis auf den Schnitten ausgezählt. Die so ermittelte neuronale Gesamtzellzahl eines Nucleus facialis wurde mit der von Abercombie beschriebenen Formel

$$N = \frac{n \times D}{D + d}$$

korrigiert [1] («Abercombie-Correction»), wobei  $N$  für die korrigierte neuronale Gesamtzellzahl,  $n$  für die gezählten neuronalen Zellprofile,  $D$  für die Schnittdicke (25  $\mu\text{m}$ ) und  $d$  für den durchschnittlichen neuronalen Zelldurchmesser (der, wie im Folgenden beschrieben, aus der Zellfläche berechnet wurde) steht. Zur Bestimmung der durchschnittlichen Zellfläche wurden auf je 3 Schnitten, die einen Abstand von 100  $\mu\text{m}$  voneinander hatten, insgesamt 210–370 Neurone auf der operierten und 160–380 Neurone auf der gesunden Seite herangezogen. Von den gefärbten Schnitten wurden digitale Aufnahmen mit einer Sony 3 CCD-Videokamera angefertigt (AVT-Horn, Aachen). Neuronale Zellprofile wurden mit der OPTIMAS 6.2-Software detektiert, wobei als Schwellenwert die durchschnittliche Farbeintensität (OLV) minus 1,5-facher Standardabweichung («Mean-SD«-Algorithmus) im roten Kanal des 24-Bit-RGB-Bildes festgelegt wurde. Der durchschnittliche Durchmesser  $d$  wurde aus der durchschnittlichen Fläche  $A$  nach der Formel

$$d = \sqrt{\frac{4A}{\pi}}$$

errechnet. Dieser Wert betrug 17,24 ( $\pm 0,23$ )  $\mu\text{m}$  und 18,50 ( $\pm 0,24$ )  $\mu\text{m}$  für p75e3+/+ Tiere ( $n = 5$ ), 18,07 ( $\pm 0,09$ )  $\mu\text{m}$  und 18,04 ( $\pm 0,61$ )  $\mu\text{m}$  für p75e3-/- ( $n = 4$ ), 17,43 ( $\pm 0,28$ )  $\mu\text{m}$  und 18,11 ( $\pm 0,28$ )  $\mu\text{m}$  für p75e4+/+ ( $n = 6$ ) und 17,43 ( $\pm 0,28$ )  $\mu\text{m}$  gegenüber 18,11 ( $\pm 0,28$ )  $\mu\text{m}$  für die p75e4-/- Mäuse ( $n = 5$ ). Damit bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den vier Gruppen. Der Effekt der Abercombie-Correction auf die *relative* neuronale Zellzahl (der operierten im Vergleich mit der unoperierten Seite) war eine 2,5 %-ige Verringerung in der p75e3-/- Gruppe und ein Anstieg von jeweils 0,3 % für p75e3+/+, 0,6 % für p75e4-/- und von 0,6 % bei den p75e4+/+ Tieren. Keiner dieser Unterschiede war statistisch signifikant.

### **2.7.2 Zählung von T-Lymphozyten im Fazialiskern**

Die Zahl der Lymphozyten im Nucleus facialis wurde am Tag 4 und Tag 14 nach Axotomie bestimmt, auch hier wurde die gesunde, nicht-operierte Seite als Kontrolle herangezogen. Verwendet wurden 20µm dicke Schnitte durch den Hirnstamm, die mit einem monoklonalen Antikörper (28001D) gegen den T-Lymphozytenmarker CD3 gefärbt wurden. Da die Zahl der eingewanderten Lymphozyten am Tag 4 noch relativ gering ist, mussten sieben Schnitte pro Tier (mit einem Abstand von 120 µm untereinander) ausgezählt werden, um statistisch aussagekräftige Zahlen zu erhalten. Auf Grund der weit höheren Zellzahl an Tag 14 genügten hier zwei Schnitte pro Tier (Abstand 340 µm) für eine verlässliche Analyse. Alle CD3-positiven Zellen im operierten und gesunden Fazialiskern wurden auf den verwendeten Schnitten gezählt und Durchschnitt und Standardabweichung für jedes Tier berechnet.

### **2.7.3 Färbung und Zählung von Granulozyten im Nerv**

Zur Färbung von Granulozyten im Nervus facialis wurde die Aktivität der endogenen Peroxidase (EP) ausgenutzt. Die Schnitte wurden zunächst, wie in Abschnitt 2.4.3 auf den Seiten 35–36 beschrieben, vorbereitet und nach der Entfettung durch die Aceton-Reihe mit 1 % biotinyliertem Tyramin und 0,01 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in PB für 10 Minuten inkubiert. Das Tyramin wird dabei durch die EP oxidiert und kovalent an das Gewebe des Schnittes gebunden. Schließlich kann es, genau wie biotinylierte Sekundär-Antikörper, durch eine ABC/DAB-Färbung sichtbar gemacht werden [2].

Die Quantifizierung erfolgte an einem Mikroskop mit Rasterokular; gezählt wurden Granulozyten über die gesamte Breite und jeweils 0,5 mm Länge des Nerven an der Stelle der Quetschung, sowie 2 mm und 4 mm distal von dieser Stelle.

### **2.7.4 Quantifizierung von Makrophagen im Nervus facialis**

Makrophagen wurden durch Immunfärbung gegen das  $\alpha_M\beta_2$ -Integrin nachgewiesen. Ein einfaches Zählen der Zellzahl – wie im letzten Abschnitt für die Granulozyten beschrieben – ist bei Makrophagen auf Grund ihrer amorphen Gestalt schwierig und fehleranfällig, so dass hierfür eine andere

Methode zum Einsatz kommen musste: Unter Verwendung eines Rasterokulars wurden an der Stelle der Quetschung und 2 mm bzw. 4 mm distal davon, eine imaginäre Linie quer durch den Nerven gelegt. Gezählt wurden die Überschneidungen dieser Linie mit  $\alpha_M\beta_2$ -positiven Zellmembranen.

## 2.8 Untersuchung der axonalen Regeneration

Zur Untersuchung der axonalen Regeneration wurden die Tiere 96 Stunden nach Quetschung des Nervus facialis (siehe Abschnitt 2.3.2 auf Seite 33) getötet und mikroskopische Präparate des Fazialisnerven wie oben beschrieben angefertigt. Pro Tier wurden 4 oder 5 der 10  $\mu\text{m}$  dicken Gefrierschnitte (mit einem Abstand von 50  $\mu\text{m}$  untereinander) immunhistochemisch gegen die Neuropeptide Galanin und CGRP gefärbt, die während der Regeneration durch anterograden Transport in die axonalen Wachstumskegel transportiert werden. Für jeden Schnitt wurde an einem Lichtmikroskop (Zeiss Axiophot) die Distanz zwischen der nach morphologischen Kriterien bestimmten Läsionsstelle und dem am weitesten distal liegenden Wachstumskegel ausgemessen. Für alle aus dem selben Nerven stammenden Schnitte wurde jeweils der Mittelwert bestimmt (ein Vergleich der Messwerte der Schnitte *eines* Nerven untereinander diente dabei auch zur Plausibilitätskontrolle – die Streuung der Messwerte war aber in allen Fällen gering).

## 2.9 Statistische Analyse der erhobenen Daten

Die Analyse der Daten zur axonalen Regenerationstrecke, neuronalen Zellzahl, Lymphozyteneinwanderung und immunhistochemischen Färbintensität für verschiedene Antigene wurde mit einem zweiseitigen Student-t-Test durchgeführt. Ergebnisse wurden als statistisch signifikant bezeichnet, wenn  $p$  unter 5 % lag. Im Falle der CD3-positiven Lymphozyten wurde die Analyse an einer semilogarithmischen Funktion  $f$  durchgeführt, wobei  $f$  definiert wurde als:

$$f = \log(x + 1),$$

und  $x$  der Lymphozytenzahl im Fazialiskern eines Tieres entspricht. Die Addition von 1 zu  $x$  war nötig, um einen unendlich negativen Wert der

Funktion zu vermeiden, falls  $x = 0$ , also für den Fall, dass in einem der beiden Fazialiskerne auf einem Schnitt kein Lymphozyt gefunden wurde (was auf der unverletzten Seite häufig der Fall war). Das Verfahren glättet die normalerweise ausgeprägten Schwankungen (Faktor 2–3) der Lymphozytenzahl, besonders an Tag 14.

## 2.10 Liste der verwendeten Materialien

### 2.10.1 Antikörper und Seren

#### 2.10.1.1 primäre Antikörper

<i>Antigen</i>	<i>Antikörper / Wirt</i>	<i>Verd.</i>	<i>Aceton</i>	<i>Herkunft</i>
$\alpha_5\beta_1$ -Integrin	5H10-27, Ratte (monoklonal)	1:2000	+	PHARMINGEN, Hamburg
$\alpha_6\beta_1$ -Integrin	GoH3, Ratte (monoklonal)	1:3000	-	CAMON, Wiesbaden
$\alpha_M\beta_2$ -Integrin	5C6, Ratte (monoklonal)	1:5000	+	SEROTEC, Kidlington, GB
CD3	28001D, Ratte (monoklonal)	1:2000	+	PHARMINGEN, Hamburg
CGRP	$\alpha$ -CGRP, Kanin- chen (polyklonal)	1:400	+	PENINSULA, Bel- mont, CA, USA
Galanin	RGG-7141, Kanin- chen (polyklonal)	1:400	+	PENINSULA, Bel- mont, CA, USA
GFAP	Z334, Kaninchen (polyklonal)	1:5000	+	DAKO, Hamburg
ICAM-1	$\alpha$ -ICAM-1, Ratte (monoklonal)	1:3000	+	CAMON, Wiesbaden
MHC-I	ER-HR52, Ratte (monoklonal)	1:100	+	DIANOVA, Hamburg
p75 <sup>NTR</sup>	$\alpha$ -p75 <sup>NTR</sup> , Kanin- chen (polyklonal)	1:400	+	Abt. Neuro- biochemie, (s. Abschnitt 2.2)

#### 2.10.1.2 sekundäre Antikörper

<i>Spezifität</i>	<i>Wirt</i>	<i>Konjugat</i>	<i>Verd.</i>	<i>Herkunft</i>
Kaninchen-IgG	Ziege	Biotin	1:100	VECTOR; Wiesbaden
Ratten-IgG	Ziege	Biotin	1:100	VECTOR; Wiesbaden

### 2.10.1.3 Seren

<i>Wirt</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Herkunft</i>
Esel	VECTOR	Wiesbaden
Maus	SIGMA	Deisenhofen
Ziege	VECTOR	Wiesbaden

### 2.10.2 Lösungen

#### *Phosphat-Puffer (PB):*

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	100 mmol/l
mit H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	auf pH = 7,4 titriert

#### *Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS):*

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10 mmol/l
NaCl	8,4 g/l
mit H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	auf pH = 7,4 titriert

#### *Phosphat-Puffer mit Rinder-Serum-Albumin (PB/BSA):*

PB	
BSA	1 g/l

#### *Perfusionsfixativ (FA):*

PFA	40 g/l (warm mit etwas NaOH gelöst)
mit H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	auf pH = 7,4 titriert
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10 mmol/l
NaCl	8,4 g/l
grob filtriert	

#### *Gefrierschutz-Saccharose-Lösung:*

Saccharose	30 %
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10 mmol/l
mit H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	auf pH = 7,4 titriert



*Lösung für Kurzfixierung:*

37 % Formaldehyd / 10 % Methanol-Lösung (MERCK)	1 Teil
PB	9 Teile
(Endkonzentration 3,7 % FA)	

*Färbelösung (3'-3'-Diaminobenzidin =DAB / H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)*

DAB	0,5 g/l
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,01 %

*Proteinase-K-Lysis-Puffer:*

Tris HCl pH 8,0	100 mmol/l
EDTA	5 mmol/l
NaCl	200 mmol/l
SDS	0,2 %
Proteinase K	100 µg/ml

**2.10.3 Kommerzielle Kits und Chemikalien**

<i>Produkt</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Herkunft</i>
ABC-Kit	VECTOR	Wiesbaden
BSA	SIGMA	Deisenhofen
Biotinyliertes Tyramin	NEN	Boston, MA, USA
DEPEX	BDH	Pool, England
Diaminobenzidin	SIGMA	Deisenhofen
Formalin	MERCK	Darmstadt
Gelatine	MERCK	Darmstadt
OCT	SAKURA	Zoechterwoude, Holland
Proteinase K	BOEHRINGER	Mannheim
1 × PCR-Puffer	EUROBIO	Raunheim
VectaShield	VECTOR	Wiesbaden



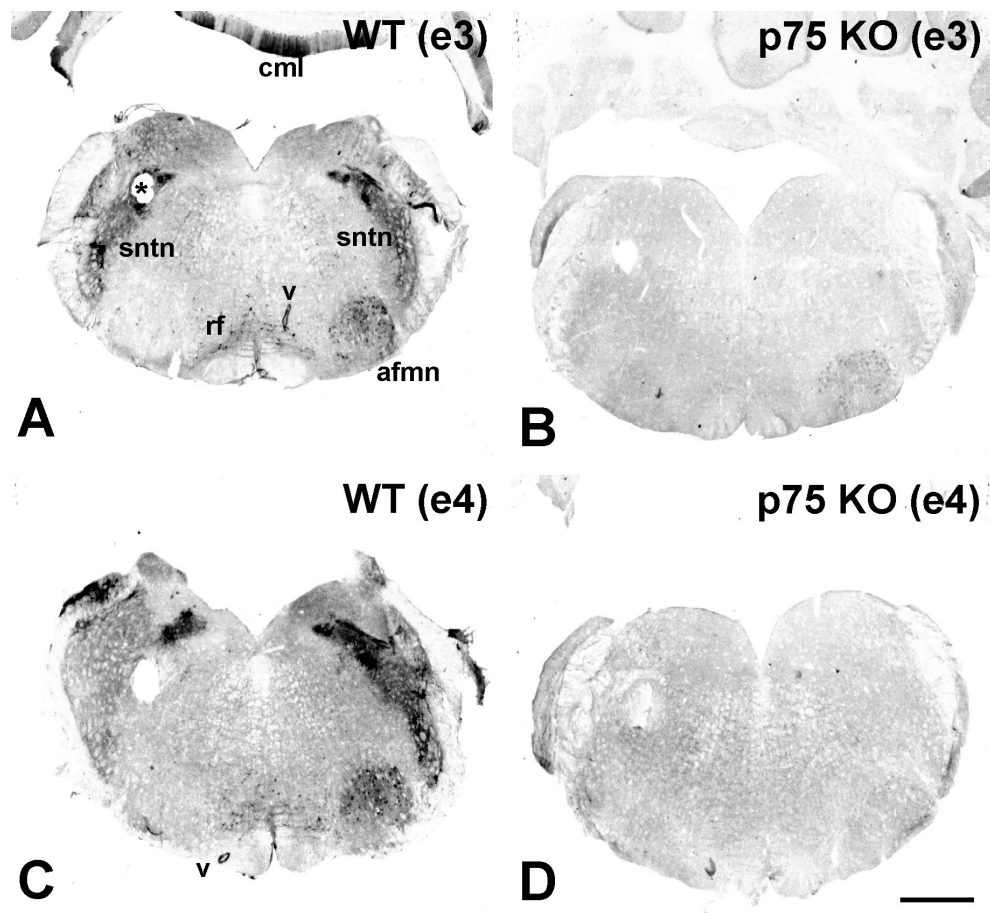
## 3 Ergebnisse

### 3.1 Expression von p75<sup>NTR</sup> im Nervensystem

Erkenntnisse darüber, in welchen anatomischen Regionen des Nervensystems p75<sup>NTR</sup> physiologischerweise exprimiert wird, auf welchen Zelltypen die Expression lokalisiert ist und wie sie sich unter pathologischen Bedingungen verändert, sind die Grundlage für ein Verständnis der Funktion des Rezeptors bei Regenerationsvorgängen. Um diese Fragen zu klären wurden immunhistochemische Färbungen mit einem polyklonalen, affinitätsgereinigten Antiserum gegen den intrazellulären Teil des Moleküls (Herstellung des Antikörpers: siehe Abschnitt 2.2 auf den Seiten 30–31), dessen optimale Konzentration für die Färbungen zunächst über eine von 1 : 25 bis 1 : 25 600 reichende Verdünnungsreihe auf 1 : 400 bestimmt worden war, angefertigt. Es kamen Immunhistochemie in ABC/DAB-Technik (Abschnitt 2.4.3 auf den Seiten 35–36), Quantifizierung lichtmikroskopischer Immunreaktivität (Abschnitt 2.6 auf den Seiten 39–42) und Doppelimmunfluoreszenzfärbungen (Abschnitt 2.4.4 auf den Seiten 36–37), die durch konfokale Mikroskopie ausgewertet wurden (Abschnitt 2.5 auf den Seiten 37–38) zum Einsatz. Die einseitige Axotomie des Nervus facialis bei der Maus (Abschnitt 2.3 auf den Seiten 31–33) diente als tierexperimentelles Modell für eine Verletzung des Nervensystems.

#### 3.1.1 Konstitutive Expression

Die Abbildungen 3.1 A und C auf der nächsten Seite zeigen transversale, in ABC/DAB-Technik gegen p75<sup>NTR</sup> gefärbte Schnitte durch den Hirnstamm von Wildtyp-Mäusen, am Tag 4 nach Axotomie des rechten Nervus facialis, bei niedriger Vergrößerung. Physiologischerweise wird der Rezeptor in Neuronen der *Formatio reticularis* und des *Nucleus* und *Tractus spinalis nervi trigemini*, sowie in longitudinalen Streifen im *Stratum moleculare*

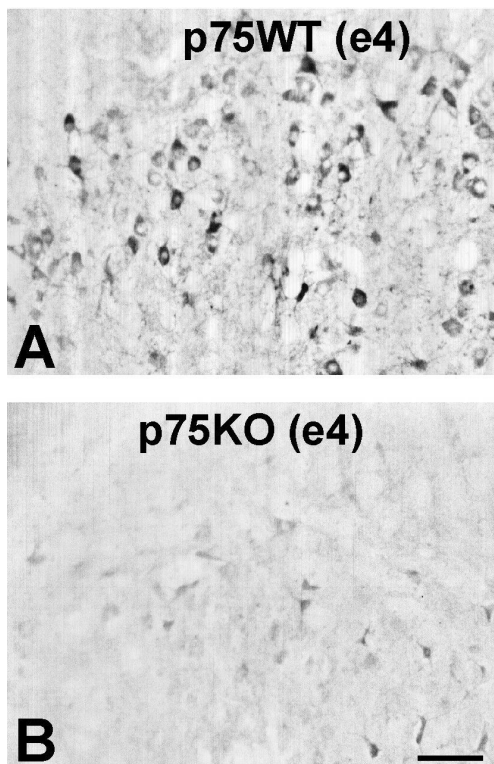


**Abb. 3.1:**

Die deutliche Immunreaktivität gegen  $p75^{NTR}$  in Wildtyp-Mäusen (**A, C**) fehlt bei homozygot  $p75^{NTR}$ -defizienten Tieren (**B, D**).

**A, C:** Wildtyp-Kontrollen für Exon 4 (e4) und Exon 3-Mutante (e3). Starke, bilaterale Färbung gegen  $p75^{NTR}$  ist im Nucleus und Tractus spinalis nervi trigemini zu finden (sntn): in **A** besonders gut zu erkennen, in **C** auf der linken Seite weniger als rechts, was von einer leichten Verkipfung der Schnittebene herrührt. Stark gefärbt sind außerdem Neurone der Formatio reticularis (rf), longitudinale Streifen des Stratum moleculare (cml) der Kleinhirnrinde, Gefäße (v) und der Nucleus facialis auf der operierten rechten Seite am Tag 4 nach Axotomie. Der Asterisk (\*) markiert ein Loch im Schnitt, das der Seitenzuordnung dient.

**B, D:** Verlust der spezifischen Immunreaktivität in transgenen Mäusen mit Ausschaltung von Exon 4 (**B**) oder Exon 3 (**C**) des  $p75^{NTR}$ -Gens. In diesem, wie in allen folgenden Experimenten, waren die homozygoten Wildtyp- (+/+), wie auch die homozygot  $p75^{NTR}$ -defizienten (-/-) Mäuse F1-Nachkommen von heterozygoten (+/-) Tieren: WT(e4) von  $p75^{e4+/-}$ , WT(e3) von  $p75^{e3+/-}$ . Maßstabsbalken = 1 mm



**Abb. 3.2:**

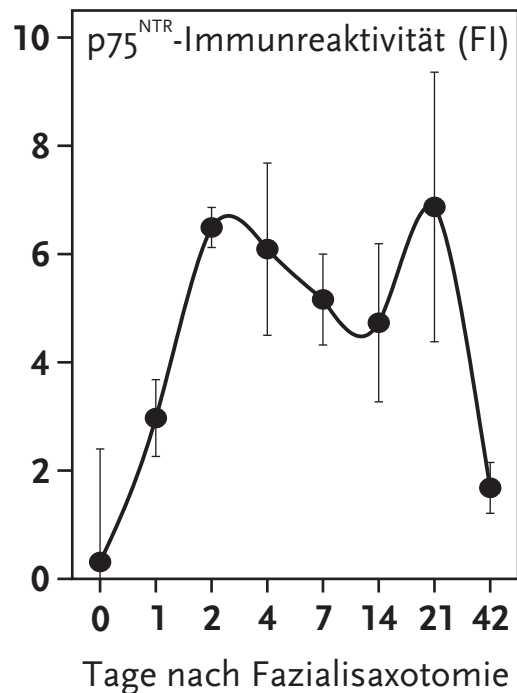
Immunreaktivität gegen p75<sup>NTR</sup> im axotomierten Nucleus facialis: Neuronale Lokalisation. Im Wildtyp (A) zeigt die Färbung eine heterogene Verteilung, wobei etwa 30–40% der axotomierten Motoneurone am Tag 4 nach Trauma stark gefärbt sind. Die übrigen Nervenzellkörper weisen eine deutlich schwächere Färbung auf. Homozygote p75<sup>NTR</sup>-Defizienz führt zum Verschwinden des spezifischen Signals (B). Maßstabs-Balken = 100 µm

des Kleinhirns stark exprimiert. Auch gelegentlich in den Schnitten zu findende, mittelgroße bis große Gefäße zeigen eine deutliche Färbung. Im unversehrten linken Fazialiskern (im Bild ebenfalls links) ist keine Expression nachweisbar.

### 3.1.2 Regulation nach Axotomie

Die Expression von p75<sup>NTR</sup> steigt unter pathologischen Bedingungen stark an. Vier Tage nach Axotomie ist bei den Wildtyp-Tieren eine starke Färbung gegen den Neurotrophinrezeptor im lädierten rechten Fazialiskern zu erkennen (Abbildung 3.1 A und C). Bei stärkerer Vergrößerung wird ein heterogenes Muster der Färbung deutlich: Nur etwa 30–40% der Motoneurone sind stark positiv für p75<sup>NTR</sup>, wogegen die übrigen deutlich schwächer gefärbt sind (Abbildung 3.2 A auf dieser Seite). Quantitative Untersuchungen zeigen, dass die Stärke der Immunreaktivität im verletzten Fazialiskern nach der Axotomie einen biphasischen Verlauf nimmt. Sie erreicht ein frühes Maximum bereits an Tag 2, gefolgt von einem leichten Abfall bis Tag 14 und einem erneuten Anstieg um Tag 21 nach Setzen der Läsion (siehe Abbildung 3.3 auf der nächsten Seite).

**Abb. 3.3:**  
 Zeitverlauf der p75<sup>NTR</sup>-Immunreaktivität im verletzten Nucleus facialis nach Axotomie (operierte – unoperierte Seite, Färbeintensität quantifiziert nach dem »Mean-SD«-Algorithmus, wie in Abschnitt 2.6 beschrieben): Es zeigt sich ein biphasischer Verlauf mit einem Maximum an Tag 2 und Tag 21. Ausgewertet wurden 2 geeignete Schnitte pro Tier,  $n=3$  Tiere pro Zeitpunkt, für die Quantifizierung wurde die Färbeintensität (»Optic Luminosity Value«, OLV) über der gesamten Fläche des Fazialiskerns auf dem jeweiligen Schnitt ermittelt; aufgetragen ist der Mittelwert  $\pm$  SEM.

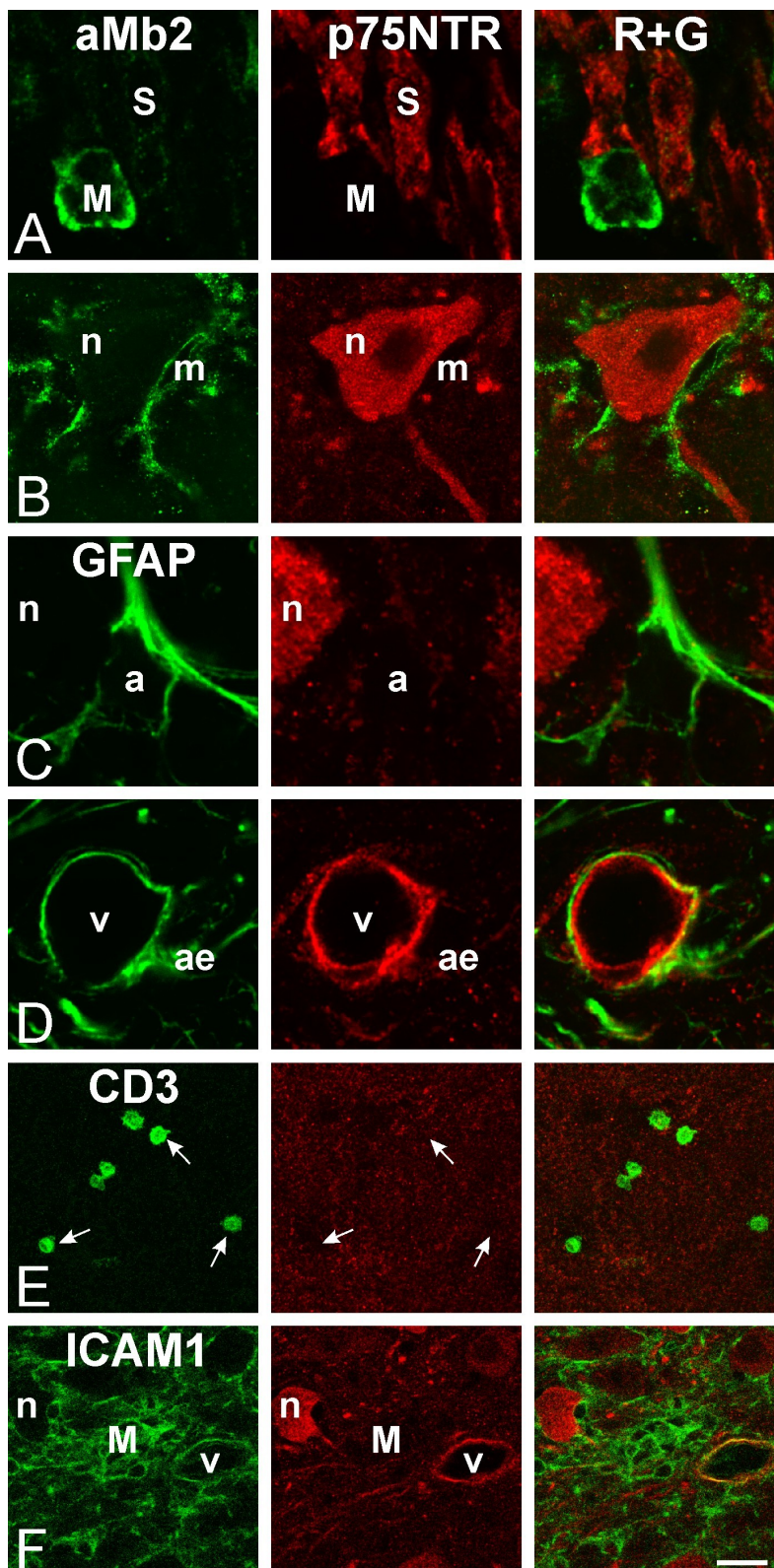


### 3.1.3 Effekt der transgenen Ausschaltung

Wie die Abbildungen 3.1 B und D zeigen, führt sowohl die Ausschaltung von Exon 3 (Exon-3-Knockout, p75e3<sup>-/-</sup>) wie auch von Exon 4 (Exon-4-Knockout, p75e4<sup>-/-</sup>) zum Verschwinden des spezifischen Signals. In Abb. 3.2 B ist der Effekt der transgenen Deletion (p75e4<sup>-/-</sup>) in stärkerer Vergrößerung zu sehen.

### 3.1.4 Zelluläre Lokalisation

In den vorangegangenen Abschnitten konnte anhand DAB-gefärbter und lichtmikroskopisch untersuchter Schnitte bereits gezeigt werden, dass verletzte faziale Motoneurone in der Immunhistochemie gegen p75<sup>NTR</sup> stark positiv reagieren. Ein Nachteil dieser Arbeitstechnik besteht jedoch darin, dass genaue Aussagen über die zelluläre Lokalisation der Färbung nicht möglich sind. Es wurden daher Färbungen in Doppel-Immunfluoreszenz-Technik angefertigt und konfokal mikroskopiert, da diese Methode zuverlässige Aussagen über die Kolo-kalisation von zwei Antigenen erlaubt. Der



**Abb. 3.4:**  
 (Ko-)Lokalisation von p75<sup>NTR</sup> und nicht-neuronalen Markern im Nervus (A) und Nucleus facialis (B–F), 4 Tage nach Axotomie. Doppel-Immunfluoreszenz-Färbungen gegen p75<sup>NTR</sup> (rot, Mitte) und die Antigene (grün, links)  $\alpha_M\beta_2$ -Integrin (A, B), GFAP (C, D), CD3 (E) und ICAM-1 (F). Erklärungen: siehe Abschnitt 3.1.4 im Haupttext.  
 Legende:  
 S = Schwann-Zelle,  
 M = Makrophage,  
 n = Neuron,  
 m = Mikroglia,  
 a = Astrozyt,  
 v = Gefäß,  
 ae = Astrozytenfortsätze.  
 Maßstabs-Balken:  
 A–D = 5  $\mu$ m,  
 E–F = 20  $\mu$ m.

Antikörper gegen p75<sup>NTR</sup> wurde dafür mit verschiedenen kommerziellen Antikörpern gegen nicht-neuronale Antigene, deren Expressionsmuster im Nervensystem bekannt ist, kombiniert (siehe Abbildung 3.4 auf der vorherigen Seite): Makrophagen und Mikroglia wurden über eine Färbung gegen das  $\alpha_M\beta_2$ -Integrin nachgewiesen (A und B), Astrozyten über GFAP (C und D), T-Lymphozyten über CD3 (E) und als Marker für vaskuläre Endothelien und aktivierte Mikroglia diente ICAM-1 (F) [113].

Es ist zu erkennen, dass die p75<sup>NTR</sup>-Immunreaktivität auf Schwann-Zellen im peripheren Nerv (Abb. 3.4 A) und auf Neurone und Blutgefäße im Nucleus facialis (Abb. 3.4 B–F) beschränkt ist. Auf  $\alpha_M\beta_2$ -positiven Makrophagen im Fazialisnerv (A) und mikroglialen Zellen, die verletzen p75<sup>NTR</sup>-positiven Neuronen im Fazialiskern anhaften (B), sowie Zellkörpern GFAP-positiver Astrozyten (C), ist keine Färbung gegen p75<sup>NTR</sup> zu erkennen. In (D) ist ein p75<sup>NTR</sup>-positives Gefäß zu sehen, das in seinem ganzen Umfang von Fortsätzen GFAP-gefärbter Astrozyten, umschlossen wird. Trotz der unmittelbaren räumlichen Nähe der beiden Antigene ist bei genauem Hinsehen keine Kolo-kalisation zu erkennen. Auch T-Lymphozyten (E) sind negativ für p75<sup>NTR</sup>. Die Kombination mit dem Antikörper gegen ICAM-1(F) zeigt schließlich eine starke Färbung für p75<sup>NTR</sup> auf ICAM-1-positiven vaskulären Endothelien, jedoch kein Signal auf phagozytischer, ICAM-1-positiver Mikroglia.

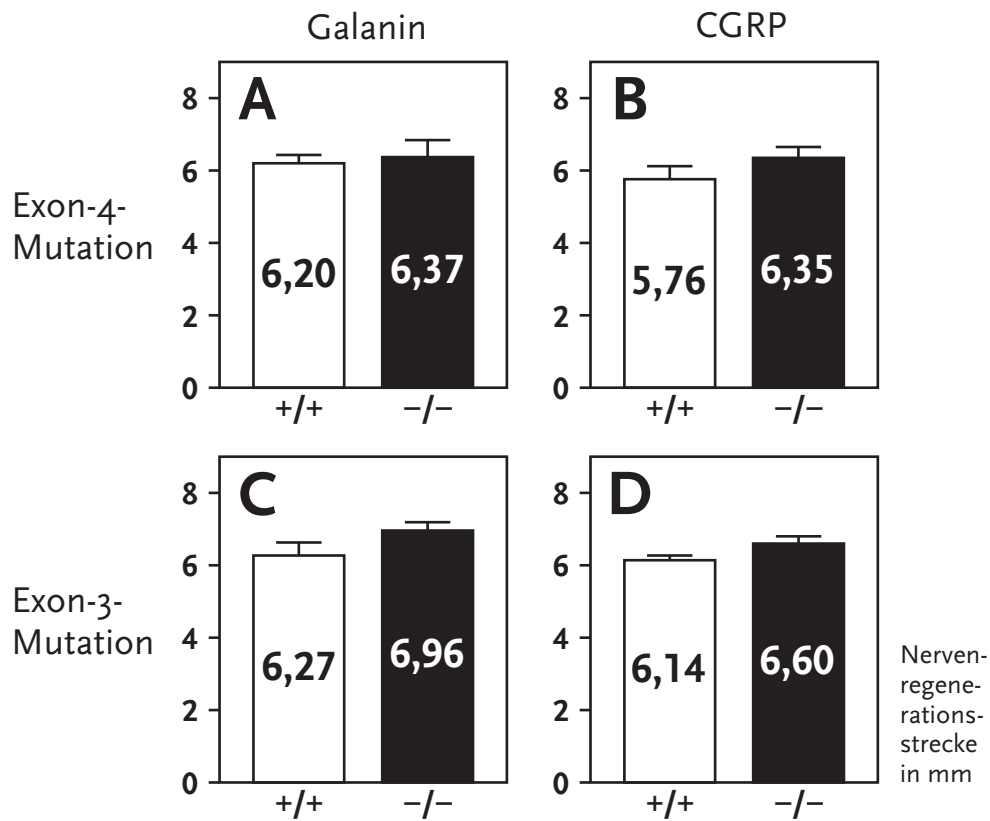
## 3.2 Neuronale Antwort auf Verletzung

Da in früheren Arbeiten ein Einfluss von p75<sup>NTR</sup> auf das Wachstum von Neuriten, neurochemische Differenzierungsvorgänge und neuronalen Zelltod nach Trauma beschrieben worden war [32, 59, 112, 119], untersuchten wir anschließend, welche Auswirkungen die Ausschaltung des Rezeptors auf die axonale Regeneration, die Expression von Neuropeptiden und das neuronale Überleben nach Fazialisaxotomie hat. Für diese Experimente wurden beide Stämme p75<sup>NTR</sup>-defizienter Mäuse verwendet.

### 3.2.1 Axonale Regeneration

Die axonale Regeneration wurde wie in Abschnitt 2.8 auf Seite 45 und in Ref. [115] beschrieben, 96 Stunden nach Axotomie an je 4 bis 5 CGRP-





**Abb. 3.5:** Die axonale Regeneration wird durch das Fehlen von  $p75^{NTR}$  nicht beeinflusst. Dargestellt ist die Regenerationsstrecke Galanin- (A, C) bzw. CGRP-positiver Neuriten (B, D) im Nervus facialis, 4 Tage nach proximaler Quetschung. A, B: homozygote  $p75e4^{-/-}$  Tiere versus  $p75e4^{+/+}$  (WT)-Kontrollen, C, D: homozygote  $p75e3^{-/-}$  Tiere versus  $p75e3^{+/+}$  (WT)-Kontrollen. Alle Werte sind Angaben in Millimetern, aufgetragen ist der Mittelwert  $\pm$ SEM,  $n = 4$  in jeder Gruppe,  $p$  ist das Ergebnis eines zweiseitigen Student-t-Tests.

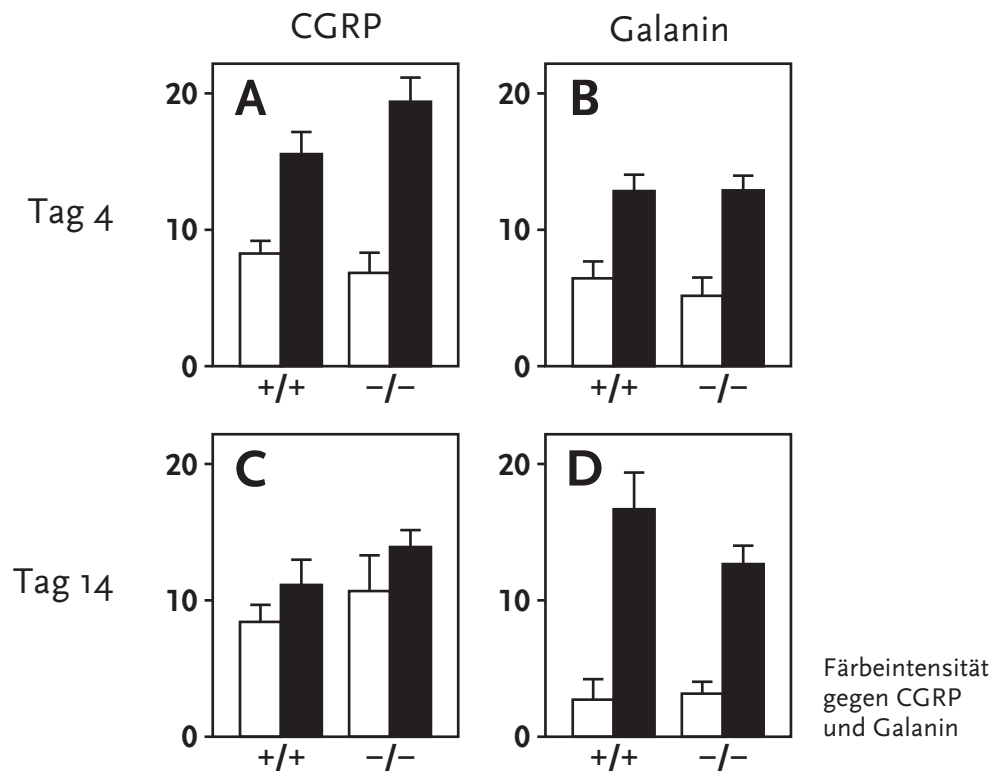
und Galanin-gefärbten Gefrierschnitten pro Tier untersucht, indem der Abstand von der Stelle der Quetschung bis zum distalen Ende der Wachstumsfront bestimmt und der Mittelwert für jedes Tier gebildet wurde. Aus den so erhobenen Daten wurden Mittelwert und Standardabweichung für jede der vier Gruppen (p75e4+/+ und -/-, p75e3+/+ und -/-,  $n = 4$  Tiere pro Gruppe) ermittelt. Weder bei Exon-4- noch bei Exon-3-Mutanten konnte ein signifikanter Unterschied in der von auswachsenden Neuriten überbrückten Distanz, im Vergleich zu den jeweiligen Wildtyp-Kontrollen erhoben werden. Bei den Exon-4-Mutanten betrug die Distanz  $6,37 \pm 0,46$  mm für die Galanin-positiven und  $6,35 \pm 0,30$  mm für die CGRP-positiven Neuriten, im Vergleich zu  $6,20 \pm 0,23$  mm und  $5,76 \pm 0,36$  mm bei den entsprechenden Wildtyp-Kontrollen. Bei den Exon-3-Mutanten lagen die Werte in ähnlichen Bereichen, mit  $6,96 \pm 0,23$  mm für Galanin und  $6,60 \pm 0,20$  mm für CGRP im Vergleich zu  $6,27 \pm 0,36$  mm und  $6,14 \pm 0,13$  mm bei den Wildtyp-Kontrollen. Abbildung 3.5 auf der vorherigen Seite zeigt diese Daten in grafischer Form.

#### 3.2.2 Expression von Neuropeptiden im verletzten Fazialiskern

Die Axotomie des Nervus facialis führt bei Wildtyp-Mäusen zu einem starken reaktiven Anstieg der Expression von Neuropeptiden wie CGRP und Galanin im zugehörigen Kerngebiet [69, 84, 105]. Im Falle von CGRP ist dieser Anstieg besonders stark an Tag 4, bei Galanin sowohl an Tag 4, als auch noch an Tag 14 zu beobachten. Weder an Tag 4, noch an Tag 14 ergaben sich jedoch signifikante Unterschiede für die CGRP- oder Galanin-Immunreaktivität bei p75e4-/- Tieren im Vergleich zu den zugehörigen p75e4+/+ Kontrollen (Abb. 3.6). Quantifiziert wurde unter Verwendung des »Mean-SD«-Algorithmus [68], wie in Abschnitt 2.6 auf den Seiten 39–42 beschrieben.

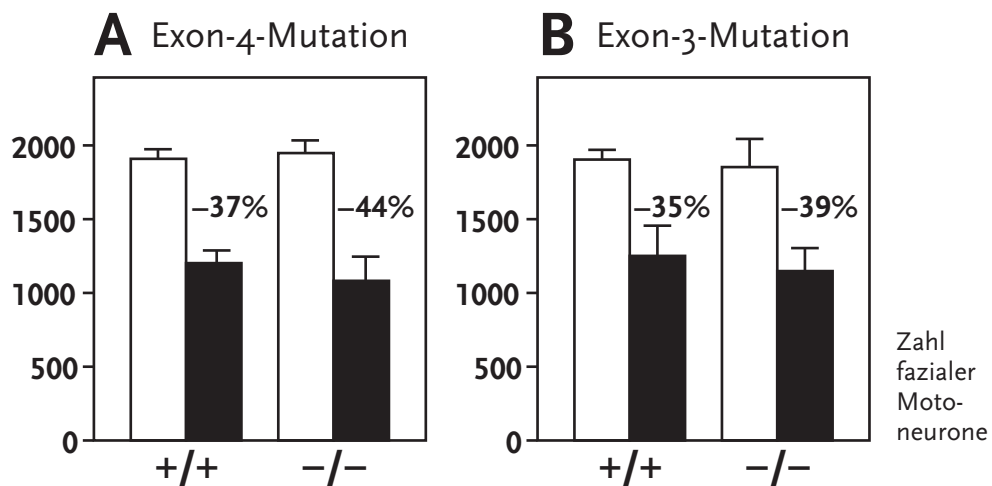
#### 3.2.3 Neuronaler Zelltod nach Axotomie

Die Axotomie des Nervus facialis führt zu einer verzögerten Form von neuronalem Zelltod im Fazialiskern mit einem Maximum an Tag 14 [80, 109]. Einige wenige Neurone sterben allerdings noch bis zu 9 Wochen nach Verletzung [68]. In dieser Arbeit wurde die neuronale Zellzahl an Tag 60 nach Axotomie untersucht, einem Zeitpunkt, zu dem praktisch kein durch die Verletzung ausgelöster Zelltod mehr auftritt. Es wurden alle neurona-

**Abb. 3.6:**

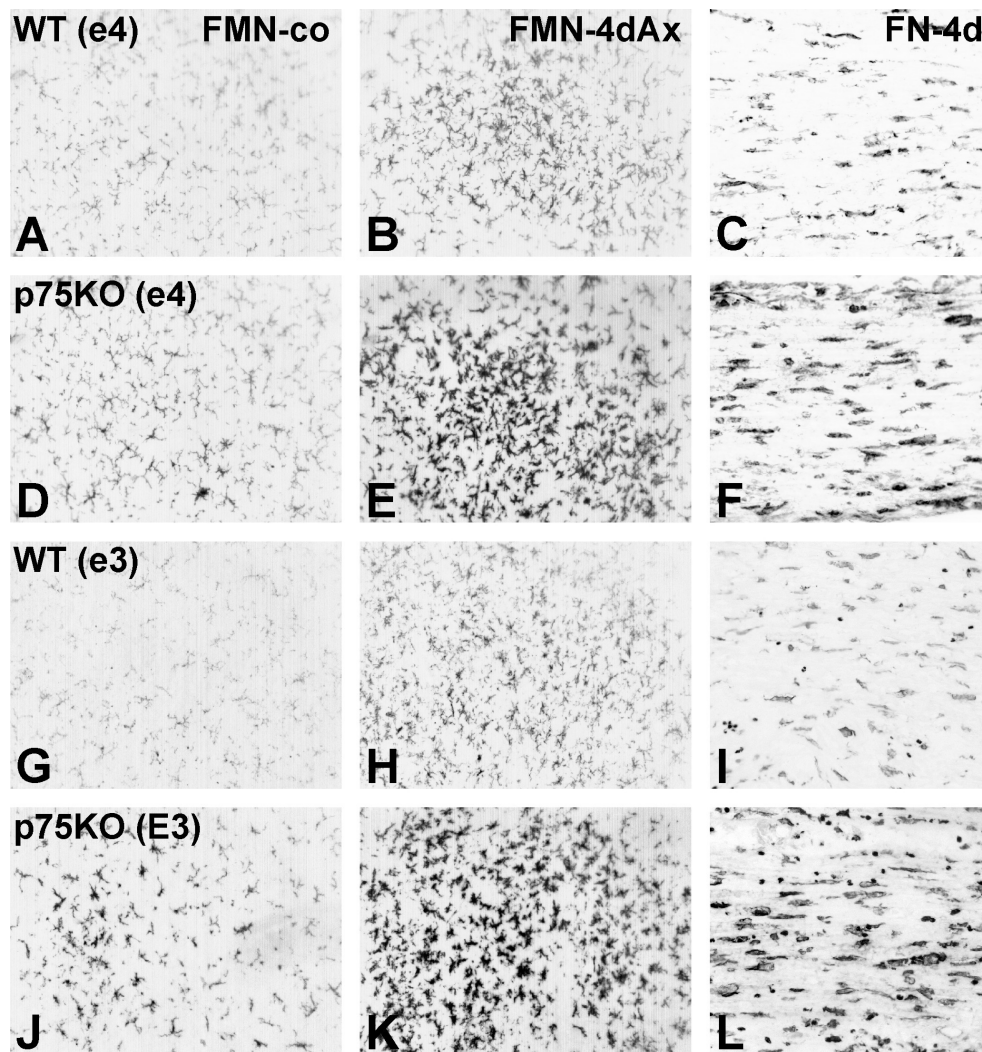
Der Anstieg von Galanin und CGRP im verletzten Fazialiskern wird durch  $p75^{\text{NTR}}$ -Defizienz nicht beeinflusst (Exon-4-Mutation). Aufgetragen ist die Färbeintensität gegen beide Neuropeptide 4 Tage (A, B) und 14 Tage (C, D) nach Läsion; weiße Säulen: unverletzte Seite, schwarze Säulen: operierte Seite. Mittelwerte  $\pm$ SEM,  $n=4$  in der -/- und +/+ Gruppe an Tag 4,  $n=4$  in der -/- und  $n=7$  in der +/+ Gruppe an Tag 14.

len Zellprofile auf 25  $\mu\text{m}$  dicken, PFA-fixierten und Nissl-gefärbten Schnitten gezählt und die erhobenen Daten nach Abercombie [1] korrigiert (siehe Abschnitt 2.7.1 auf Seite 42). Die so bestimmte Zahl von Motoneuronen lag bei Wildtyp-Mäusen auf der gesunden Seite bei etwa 1900, die Axotomie führte zu einem Verlust von etwa 35–40% dieser Zellen. Diese Zahlen stimmen mit Daten aus früheren Veröffentlichungen überein [36, 95]. Der durch die Verletzung vermittelte neuronale Zellverlust war stets hoch signifikant ( $p < 1\%$ ), die Ausschaltung von  $p75^{\text{NTR}}$  bei den transgenen Mäusen hatte darauf jedoch keinen Einfluss. Weder bei den Tieren mit Exon 4-, noch bei solchen mit Exon 3-Mutation ( $p75^{\text{e4-/-}}$ ,  $n=5$  und

**Abb. 3.7:**

Neuronales Überleben im Nucleus facialis nach peripherer Durchtrennung des Nerven wird durch die Ausschaltung von  $p75^{\text{NTR}}$  in transgenen Tieren nicht beeinflusst. Aufgetragen ist die durchschnittliche Gesamtzahl der Motoneurone im Nucleus facialis ( $\pm$ SEM) auf der operierten (schwarze Säulen) und auf der gesunden Kontrollseite (weiße Säulen), 60 Tage nach Axotomie. **A:** homozygot  $p75^{\text{NTR}}$ -defiziente Tiere mit Exon-4-Mutation ( $p75^{\text{e4}}-/-$ , rechts) und zugehörige Wildtyp-Kontrollen ( $p75^{\text{e4}}+/+$ , links); **B:** Ebenso für Exon-3-Mutation ( $p75^{\text{e3}}-/-$  vs.  $p75^{\text{e3}}+/+$ ). In allen 4 Gruppen kommt es zu einem hochsignifikanten Verlust von ca. 35–45 % der Motoneurone auf der verletzten im Vergleich zur unverletzten Seite ( $p < 1\%$  in einem zweiseitigen Student-t-Test). Unterschiede zwischen den  $+/+$  und  $-/-$  Gruppen bestehen jedoch nicht.

$p75^{\text{e3}}-/-$ ,  $n = 4$ ), waren im Vergleich zu den jeweiligen Wildtyp-Kontrollen ( $p75^{\text{e4}}+/+$ ,  $n = 6$  und  $p75^{\text{e3}}+/+$ ,  $n = 5$ ) Unterschiede im neuronalen Überleben nach Fazialisaxotomie festzustellen. Dies gilt auch, wenn die Korrektur nach Abercombie [1] nicht durchgeführt wurde. Die Zahl der Neurone betrug bei Exon4-Mutanten 1948  $\pm$ 86 auf der gesunden und 1082  $\pm$ 164 auf der operierten Seite, was einem Verlust von 44,2 % durch die Axotomie entspricht. Bei den zugehörigen Wildtyp-Kontrollen wurden 1909  $\pm$ 65 versus 1202  $\pm$ 86 Neurone gezählt (-37,2 %). Ähnliche Werte ergaben auch die Zählungen bei den Exon-3-Mutanten, mit 1853  $\pm$ 191 zu 1148  $\pm$ 156 (-34,7 %) und den zugehörigen Wildtyp-Mäusen mit 1904  $\pm$ 66 versus 1251  $\pm$ 205 (-38,6 %). Abbildung 3.7 zeigt diese Daten in grafischer Form.

**Abb. 3.8:**

$p75^{\text{NTR}}$ -Defizienz führt zu abnorm gesteigerter Aktivierung von Mikroglia im Nucleus facialis und Makrophagen im peripheren Nerv, vier Tage nach Axotomie. Die Abbildung zeigt eine Färbung gegen  $\alpha_M\beta_2$ -Integrin im gesunden (A, D, G, J) und im verletzten (B, E, H, K) Fazialiskern, sowie im verletzten Nerv (C, F, I, L). Normalerweise reagieren mikrogliale Zellen auf die Axotomie mit Proliferation und verstärkter Expression von Aktivierungsmarkern, wie z. B.  $\alpha_M\beta_2$ -Integrin. Diese Antwort ist bei den homozygoten Exon-4- (D–F) und Exon-3-Mutanten (J–L) deutlich stärker ausgeprägt, als bei den zugehörigen Wildtyp-Kontrollen (A–C und G–I). Zusätzlich führt das Fehlen von  $p75^{\text{NTR}}$  zu einer mikroglialen Aktivierung auch im kontralateralen, gesunden Nucleus facialis. Die gleiche verstärkte Reaktion auf das Trauma ist auch bei Makrophagen im verletzten peripheren Nerv zu beobachten. Maßstabs-Balken = 100  $\mu\text{m}$

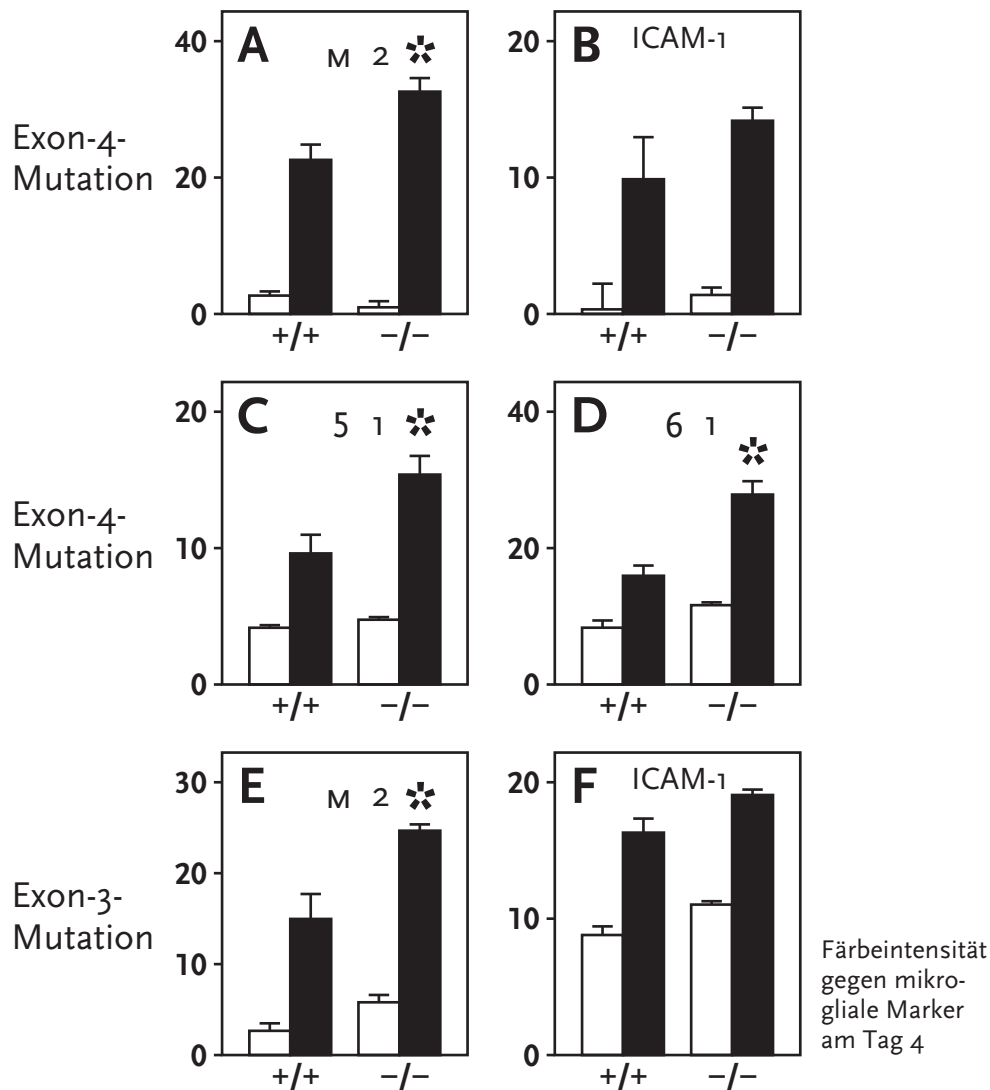
### 3.3 Antwort von Glia und Immunsystem

Die periphere Läsion des Fazialisnerven führt im ZNS nicht nur zu einer Reaktion der durch die Verletzung direkt betroffenen Neurone, sondern auch verschiedener nicht-neuronaler Zellen. Es kommt zu einer Entzündungsreaktion mit mikroglialer Aktivierung und chemotaktisch gesteuerter Einwanderung von T-Lymphozyten aus dem Blut in das geschädigte Kerngebiet. Die Verletzung führt darüber hinaus zu reaktiver Astroglieose und später zur Ausbildung einer »Glianarbe« in irreversibel geschädigten Gebieten. Diese Vorgänge wurden in der Einleitung (Abschnitt 1.1.2 auf den Seiten 15–17) beschrieben.

#### 3.3.1 Mikroglia

Die mikrogliale Reaktion läuft in zwei Phasen ab, die jeweils von unterschiedlichen molekularen Auslösern getriggert werden [36, 44, 82]. Die frühe Phase beginnt innerhalb von 24 Stunden nach Axotomie und stellt eine Antwort auf die Verletzung der noch lebenden Neurone dar. Diese Phase erreicht ihr Maximum an Tag 4 und äußert sich in starker Expression verschiedener Zelladhäsionsmoleküle, insbesondere der Integrine  $\alpha_5\beta_1$ ,  $\alpha_6\beta_1$  und  $\alpha_M\beta_2$  sowie von ICAM-1. Die zweite Hauptphase findet in Reaktion auf den verzögerten neuronalen Zelltod statt und erreicht ihr Maximum um Tag 14. Sie ist gekennzeichnet durch mikrogliale Phagozytose von Zell-Debris, Transformation in Makrophagen, Aggregation zu MHC-I-positiven mikroglialen »Knötchen« (siehe Abb. 3.10 auf Seite 65) und Aktivierung benachbarter, nicht-phagozytischer Mikroglia [68, 80, 109].

Die Verletzung durch Fazialisaxotomie führte bei  $p75^{NTR}$ -defizienten Tieren mit Exon 4 und Exon 3-Mutation zu zu einer deutlich stärkeren  $\alpha_M\beta_2$ -Immunreaktivität im verletzten Fazialiskern, als bei den jeweiligen Wildtyp-Kontrollen (vgl. hierzu Abb. 3.8 B und H mit Abb. 3.8 E und K). Ein ähnlicher Unterschied in der Färbintensität gegen  $\alpha_M\beta_2$  konnte auch im peripheren Nerv an Tag 4 nach Axotomie (Abb. 3.8 C und I vs. F und L) und, in geringerem Ausmaß, auch auf der kontralateralen, unoperierten Seite beobachtet werden (Abb. 3.8 A und G vs. D und J). Dieser Anstieg der  $\alpha_M\beta_2$ -Immunreaktivität schien interessanterweise nicht mit einer Erhöhung der mikroglialen Zelldichte einherzugehen, sondern nur durch die

**Abb. 3.9:**

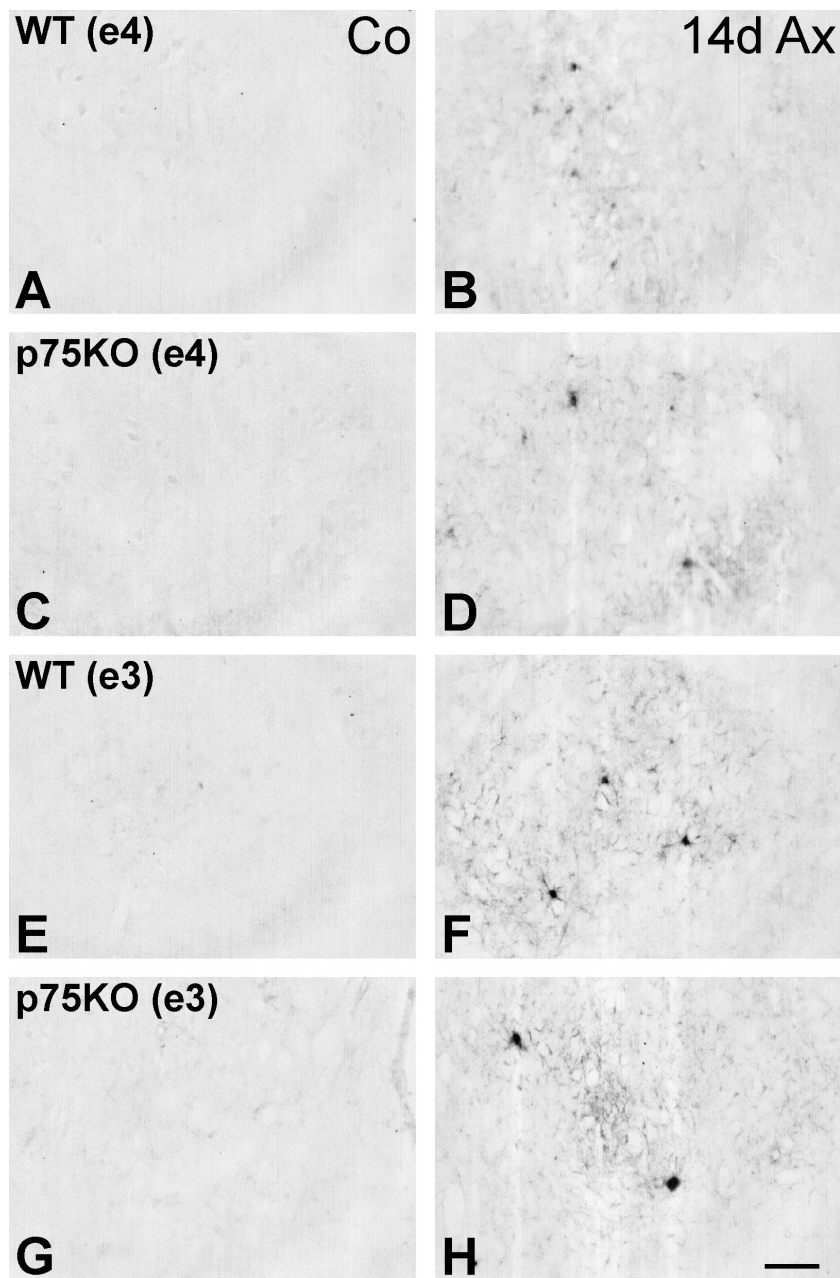
Quantifizierung der immunhistochemischen Färbeintensität gegen die mikroglialen Frühphase-Marker  $\alpha_M\beta_2$  (A, E),  $\alpha_5\beta_1$  (C)  $\alpha_6\beta_1$  (D) und ICAM-1 (B, F) im axotomierten (schwarze Säulen) und nicht-axotomierten (weiße Säulen) Nucleus facialis, 4 Tage nach Quetschung des Nervus facialis bei Exon-4- (A–D) und Exon-3-Mutanten (E–F) und ihren entsprechenden Wildtyp-Kontrollen ( $n = 4$  Tiere pro Gruppe). Der Anstieg von  $\alpha_M\beta_2$ ,  $\alpha_5\beta_1$  und  $\alpha_6\beta_1$  ist bei  $p75^{\text{NTR}}$ -defizienten Tieren signifikant stärker als bei ihren Wildtyp-Kontrollen. (\*  $p < 5\%$  in einem zweiseitigen Student-t-Test beim Vergleich der axotomierten Seite von -/- Tieren und +/+ Kontrollen.)

größere Färbeintensität pro einzelner Zelle verursacht zu sein. Die Zählung mikroglialer Zellen pro Gesichtsfeld bei 400-facher Vergrößerung ergab 52,8 ( $\pm 4,3$ )  $\alpha_M\beta_2$ -positive Zellkörper auf der axotomierten und 13,5 ( $\pm 0,9$ ) auf der gesunden Seite bei p75e4<sup>-/-</sup> Mäusen und lag mit 54,4 ( $\pm 4,3$ ) versus 12,0 ( $\pm 1,8$ ) bei den zugehörigen p75e4<sup>+/+</sup> Kontrollen in sehr ähnlichen Bereichen. Auch bei Wiederholung des Experiments mit Exon-3-Mutanten wurden ähnliche Daten erhoben: 51,9 ( $\pm 1,6$ ) und 13,1 ( $\pm 0,9$ ) für p75e3<sup>-/-</sup> und 49,4 ( $\pm 2,6$ ) und 12,1 ( $\pm 1,0$ ) bei p75e3<sup>+/+</sup> ( $n = 4$  in allen vier Gruppen). In allen Fällen führte die Axotomie zu einem hochsignifikanten, etwa 4-fachen Anstieg der mikroglialen Zellzahl auf der axotomierten im Vergleich zur Kontrollseite ( $p < 1\%$ ), was in Einklang mit den Ergebnissen früherer Arbeiten steht [83]. Es konnten jedoch weder beim Vergleich der operierten noch der gesunden Seiten Unterschiede in der mikroglialen Zellzahl zwischen p75<sup>NTR</sup>-defizienten Tieren mit Exon-3- oder Exon-4-Mutation und den jeweiligen Kontrollen gefunden werden.

Quantifizierung der Immunreaktivität für die vier mikroglialen Frühphase-Marker  $\alpha_M\beta_2$ ,  $\alpha_5\beta_1$ ,  $\alpha_6\beta_1$  und ICAM-1 im der verletzten und gesunden Fazialiskern 4 Tage nach Axotomie, zeigte einen statistisch signifikanten, 1,6-fachen Anstieg für  $\alpha_M\beta_2$ , 2,0-fachen Anstieg für  $\alpha_5\beta_1$ , und einen 2,1-fachen Anstieg für  $\alpha_6\beta_1$  bei den p75e4<sup>-/-</sup> im Vergleich zu p75e4<sup>+/+</sup> Tieren ( $p = 1,6\% / 2,0\% / 0,35\%$ ; Abb 3.9). Auch für ICAM-1 war ein leichter, 1,3-facher Anstieg zu beobachten, dieser war jedoch nicht statistisch signifikant. Bei Experimenten in Exon 3-Mutanten konnten ähnliche Daten erhoben werden, es zeigte sich ein signifikanter, 1,5-facher Anstieg für  $\alpha_M\beta_2$  ( $p = 3,4\%$ ) und ein leichter, 1,1-facher Anstieg für ICAM-1 der kein Signifikanzniveau erreichte ( $p = 6,9\%$ ).

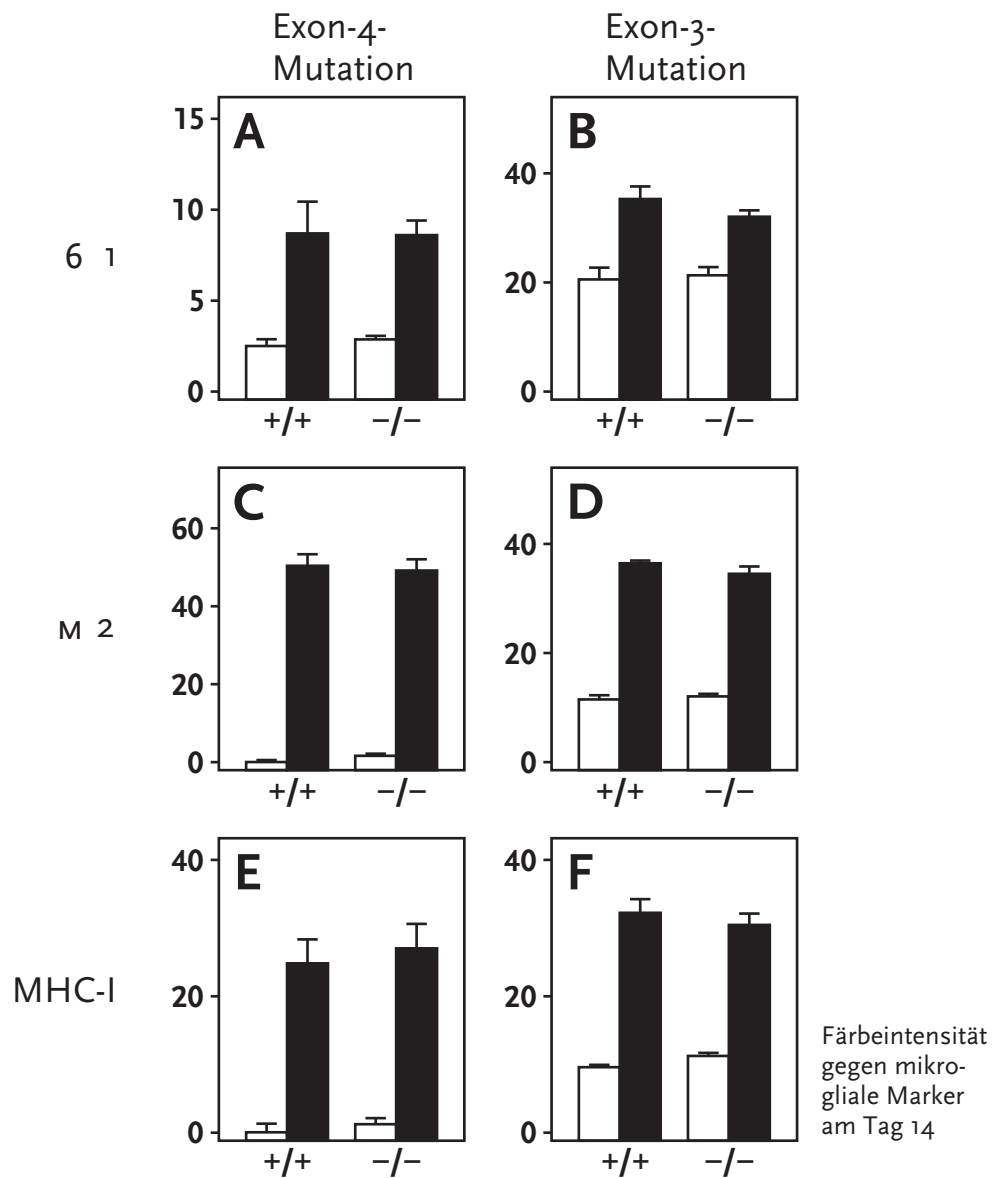
Die Analyse der mikroglialen Reaktion an Tag 14, also dem Höhepunkt des neuronalen Zelltodes nach Axotomie, zeigte keinen offensichtlichen Unterschied im Auftreten MHC-I-positiver mikroglialer »Knötchen« im verletzten Nucleus facialis bei p75<sup>NTR</sup>-defizienten Tieren (p75e4<sup>-/-</sup> und p75e3<sup>-/-</sup>) im Vergleich zu Wildtyp-Kontrollen (p75e4<sup>+/+</sup> und p75e3<sup>+/+</sup>). Das Auftreten dieser »Knötchen« scheint an das Vorhandensein sterbender Neurone mit konsekutiver Aktivierung von phagozytischer Mikroglia gebunden (Abb. 3.10). Die Quantifizierung der Färbeintensität für  $\alpha_M\beta_2$ ,  $\alpha_6\beta_1$  und MHC-I (die analog zu den Experimenten an Tag 4 durchgeführt wurde), zeigte wiederum einen starken, hochsignifikanten Anstieg





**Abb. 3.10:**

Immunhistochemie gegen MHC-I im axotomierten Nucleus facialis, 14 Tage nach Durchtrennung des Fazialisnervs (14d Ax, **B, D, F, H**) und auf der kontralateralen, unverletzten Seite (Co, **A, C, E, G**). Das Fehlen von p75<sup>NTR</sup> in Exon-4- und Exon-3-Mutanten beeinflusst das Auftreten der stark MHC-I-positiven, von phagozytierender Mikroglia gebildeten »Knötchen« (n) im verletzten Kerngebiet nicht (verglichen mit den jeweiligen Wildtyp-Kontrollen). Auf der gesunden Seite ist keine MHC-I-Immunreaktivität zu detektieren. (Maßstab-Balken = 100 µm.)



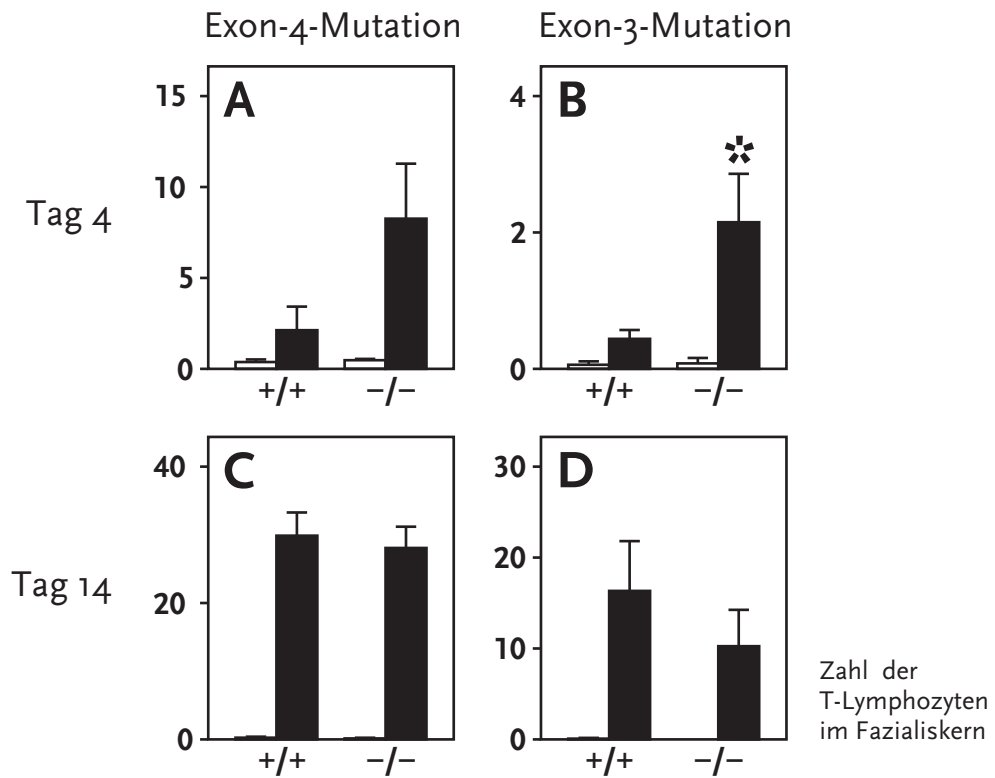
**Abb. 3.11:**

Quantifizierung von immunhistochemischer Färbeintensität für drei mikrogliale Marker: Immunreaktivität gegen  $\alpha_6\beta_1$ ,  $\alpha_M\beta_2$  und MHC-I während der späten Phase der Reaktion des Immunsystems, als Antwort auf neuronalen Zelltod, am Tag 14 nach Axotomie. Alle drei Marker zeigen einen starken und signifikanten ( $p < 5\%$ , t-Test) Anstieg auf der operierten (schwarze Säulen) gegenüber der kontralateralen gesunden Seite (weiße Säulen). Zwischen homozygot  $p75^{NTR}$ -defizienten Tieren und ihren jeweiligen Wildtyp-Kontrollen bestehen jedoch keine Unterschiede. **A, C, E:**  $p75e4^{+/+}$  (links) vs.  $p75e4^{-/-}$  (rechts), **B, D, F:**  $p75e3^{+/+}$  (links) vs.  $p75e3^{-/-}$  (rechts); durchschnittl. Färbeintensität  $\pm$ SEM,  $n = 4$  bzw. 7 Tiere für  $+/+$  bzw.  $-/-$  in **A, C** und **E**, je 5 in **B**, 6 bzw. 5 in **D** und je 6 in **F**.

in der Expression dieser Moleküle auf der operierten, im Vergleich zur gesunden Seite ( $p < 1\%$  in allen drei Fällen). Im Gegensatz zu den Effekten an Tag 4 war jedoch kein Unterschied zwischen  $p75^{\text{NTR}}$ -defizienten Tieren ( $p75e4^{-/-}$  und  $p75e3^{-/-}$ ) und ihren Wildtyp-Kontrollen ( $p75e4^{+/+}$  und  $p75e3^{+/+}$ ) zu erkennen.

### 3.3.2 Einwanderung von T-Lymphozyten in das ZNS

Die Axotomie des Nervus facialis führt zu zwei Phasen von Lymphozyten-einwanderung in die zugehörigen, verletzten Bereiche des ZNS. Bereits sehr früh nach der Verletzung sind einige wenige T-Zellen im Nucleus facialis nachweisbar, die Zahl bleibt in den ersten 4 Tagen nach der Verletzung in etwa konstant. Danach kommt es zu einem wesentlich stärkeren Einstrom, der sein Maximum schließlich an Tag 14 erreicht [80]. In dieser Arbeit wurde die Zahl der CD3-positiver T-Zellen im Nucleus facialis an Tag 4 und 14 nach Axotomie untersucht, wie in Abschnitt 2.7.2 auf Seite 44 beschrieben. Wegen der niedrigen Zahl von T-Lymphozyten an Tag 4 wurden hier sieben Schnitte pro Tier ausgezählt, an Tag 14 genügten zwei Schnitte, um ein statistisch verwertbares Ergebnis zu erhalten. Wie Abb. 3.12 A zeigt, gibt es einen Anstieg der Lymphozytenzahl an Tag 4 in  $p75e4^{-/-}$  Tieren im Vergleich zu Wildtyp-Kontrollen auf etwa das 4,5-fache. Dieser Unterschied verfehlt das Signifikanzniveau jedoch knapp ( $p = 6,6\%$ ). In Experimenten mit Exon-3-Mutanten war dieser Effekt reproduzierbar und sogar statistisch signifikant: Es kam zu einer 5,5-fachen Erhöhung der Lymphozytenzahl bei  $p75e3^{-/-}$  im Vergleich zu  $p75e3^{+/+}$  Tieren ( $p = 2,4\%$ , s. Abb. 3.12 B). Im Gegensatz zu den beobachteten Unterschieden an Tag 4, waren an Tag 14 in keiner der beiden Mutanten Unterschiede in der Zahl der T-Zellen im Fazialiskern nachweisbar (s. Abb. 3.12 C und D,  $p = 66\%$  bei  $p75e4$ ,  $p = 63\%$  bei  $p75e3$ ).

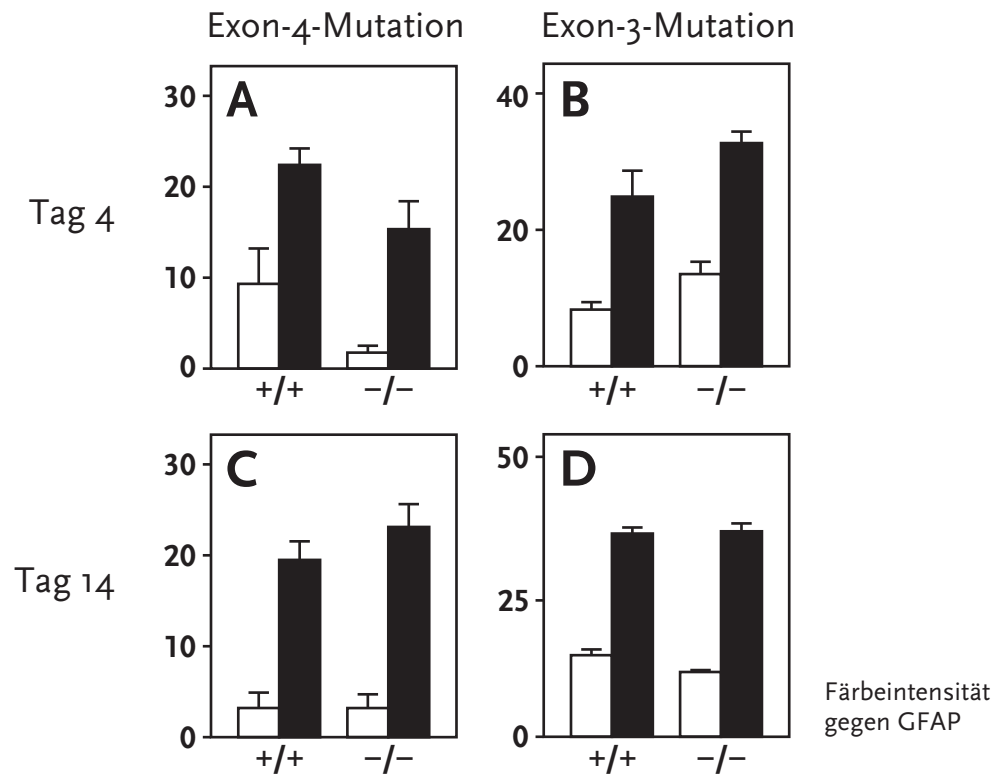


**Abb. 3.12:**

Effekt auf die Einwanderung von T-Lymphozyten in den Nucleus facialis, 4 (A, B) und 14 Tage (C, D) nach Axotomie: Bei beiden Linien p75<sup>NTR</sup>-defizienter Tiere (p75e3<sup>-/-</sup> und p75e4<sup>-/-</sup>) ist die Zahl der T-Zellen im verletzten Kern gegenüber den Wildtyp-Kontrollen an Tag 4 etwa 5-fach erhöht; dies ist statistisch signifikant in der Exon-3-Mutante (\* $p < 2,5\%$ ) und erreicht fast Signifikanzniveau in der Exon-4-Mutante ( $p = 6,6\%$ ). An Tag 14 ist jedoch kein Effekt nachweisbar. Durchschnittliche Lymphozytenzahl  $\pm$ SEM,  $n =$  je 4 in A und B, 4 bzw. 7 in C und 6 bzw. 5 in D für die +/+ bzw. -/- Subgruppen.

### 3.3.3 Astroglia

Die astrogliale Reaktion wurde durch Quantifizierung der Immunreaktivität für GFAP, einem Standard-Marker für reaktive Astrogliose [12], untersucht. Die Färbeintensität wurde an Tag 4 und Tag 14 nach Axotomie auf je zwei Schnitten im verletzten und gesunden Fazialiskern bestimmt. Es zeigte sich in allen Fällen eine hochsignifikante Erhöhung der GFAP-Expression auf der operierten im Vergleich zur gesunden Seite, jedoch kein Unterschied zwischen Exon-4- und Exon-3-Mutanten und den Wildtyp-Kontrollen.



**Abb. 3.13:**

Quantifizierung der Immunreaktivität gegen GFAP (als spezifischem astroglialen Marker) im Nucleus facialis, an Tag 4 (**A, B**) und Tag 14 (**C, D**) nach Axotomie, bei Exon-4- (**A, C**) und Exon-3-Mutanten (**B, D**) und den zugehörigen Wildtyp-Kontrollen. In allen Fällen zeigt die Färbung einen starken, signifikanten Anstieg auf der operierten (schwarze Säulen), im Vergleich zur gesunden Seite (weiße Säulen;  $p < 5\%$ , Student-t-Test). Dieser Anstieg als Reaktion auf ein Trauma wird durch das Fehlen von p75<sup>NTR</sup> in p75e4<sup>-/-</sup> und p75e3<sup>-/-</sup> Tieren nicht beeinflusst. Durchschnittl. Färbeintensität  $\pm$ SEM, jeweils  $n = 4$  in der +/+ und -/- Gruppe in **A** und **C**,  $n = 4$  bzw.  $n = 7$  in **B** und jeweils  $n = 6$  in **D**.

## 4 Diskussion

In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Linien  $p75^{NTR}$ -defizienter Mäuse untersucht, um die Funktionen des Rezeptors während der Regeneration von Motoneuronen nach Fazialisaxotomie zu beleuchten. Beiden »Knock-out«-Stämmen fehlt der Volllängen-Neurotrophinrezeptor (FL- $p75^{NTR}$ ), sie unterscheiden sich jedoch durch das Vorhandensein der kürzeren Spleißvariante des Gens (s- $p75^{NTR}$ ): Diese ist bei den Mäusen mit Exon-3-Mutation unverändert nachweisbar, fehlt jedoch bei den Tieren mit Mutation in Exon 4 [91]. Es konnte gezeigt werden, dass beide Mutationen zu einem Verlust der immunhistochemischen Anfärbbarkeit gegen  $p75^{NTR}$ , sowie zu einer verstärkten Reaktion des Immunsystems in der Frühphase nach Verletzung führen: Es kam bei den transgenen Tieren am Tag 4 nach Fazialisaxotomie zu einem stärkeren Anstieg mikroglialer Aktivierungsmarker, sowie zu einem vermehrten Einstrom von im Blut zirkulierenden T-Lymphozyten in den geschädigten Nucleus facialis. Keine der beiden Mutationen zeigte einen Effekt auf die Geschwindigkeit der axonalen Regeneration, neuronalen Zelltod nach Axotomie, oder die Spätphase der glialen und lymphozytären Antwort, die in Reaktion auf sterbende Motoneurone abläuft und an Tag 14 untersucht wurde. Die vorliegende Arbeit demonstriert damit die wichtige Rolle von neuronalem  $p75^{NTR}$  bei der Verhinderung einer überschießenden Reaktion des Immunsystems in der Frühphase nach Trauma.

### 4.1 Effekte des genetischen Hintergrundes

Der genetische Hintergrund von Versuchstieren kann entscheidenden Einfluss auf die Ergebnisse aus Experimenten an transgenen Mäusen haben – dies trifft auch auf die beiden im Moment verfügbaren Linien  $p75^{NTR}$ -defizienter Tiere zu [72]. Es existieren beträchtliche phänotypische Unterschiede zwischen Tieren mit unterschiedlichem genetischen Hintergrund

[43, 92], die zu falsch-positiven Ergebnissen führen können, wenn transgene Tiere nicht mit sorgfältig ausgewählten, entsprechend abgestimmten Wildtyp-Kontrollen verglichen werden. Der Anteil sterbender Neurone nach Fazialisaxotomie kann beispielsweise je nach verwendetem Inzucht-Stamm zwischen 15 % und 40 % schwanken, mit relativ geringen Verlusten bei 129Sv/J-Mäusen und etwa doppelt so hohen Zahlen bei C57Bl/6, Balb/C und CD-1 [32, 82, 97]. Außerdem können bei Kreuzungen zwischen Inzucht-Stämmen, die über mehrere Generationen untereinander weiter verpaart werden, deutliche Unterschiede im Vergleich zu den beiden ursprünglichen Linien auftreten: So zeigte der kürzlich untersuchte Bl6 × 129 Stamm mit über 50 % neuronalem Zelltod nach Axotomie deutlich höhere Werte, als sowohl die 129Sv/J (16 %) und die C57Bl/6 (30 %) Tiere in der selben Studie [82].

Interessanterweise könnten die Unterschiede, die bei der Zahl der normalerweise vorhandenen Neurone im gesunden Fazialiskern von p75<sup>NTR</sup>-defizienten Tieren im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen beobachtet wurden (15–30 % niedriger in der Studie von Ferri et al. [32], so gut wie kein Unterschied in dieser Arbeit), auch auf einen Effekt des unterschiedlichen genetischen Hintergrundes zurückzuführen sein: Balb/C in der Arbeit von Wiese et al. [116] und Balb/C × 129Sv/J in der eben erwähnten Arbeit von Ferri et al. [32] gegenüber C57Bl/6 bei den hier vorgestellten Experimenten. Es wurden mehrere Strategien vorgeschlagen, um derartige Probleme zu umgehen [98]. Eine relativ einfache aber wirksame Technik besteht darin, ausschließlich homozygote F<sub>1</sub>-Nachkommen heterozygoter Tiere für Experimente zu verwenden, so wurde auch bei dieser Arbeit verfahren.

Auch bei der Kontroverse über die Funktion des p75-Neurotrophinrezeptors bei der Regeneration von Motoneuronen scheinen Probleme mit dem genetischen Hintergrund der Tiere eine Rolle zu spielen. Die initiale Studie von Ferri et al. [32] zeigte eine signifikant bessere axonale Regeneration und erhöhtes neuronales Überleben nach Fazialisaxotomie bei p75<sup>NTR</sup>-defizienten Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Tieren. Diese Effekte wurden sowohl bei neugeborenen, als auch bei erwachsenen Tieren beim Vergleich von Exon-3-Mutanten (p75<sup>e3</sup>-/-) in einem gemischten Balb/C × 129Sv/J Hintergrund mit Wildtyp-Mäusen aus einer CD-1 und Balb/C-Inzuchtlinie beschrieben. In der neueren Arbeit von Wiese et al. [116], in der die gleiche Linie transgener Tiere – allerdings nach Rückkreuzung in einen Balb/C-



Hintergrund über mehrere Generationen – verwendet wurde, konnten diese positiven Effekte der  $p75^{\text{NTR}}$ -Defizienz auf neuronales Überleben nach Fazialisaxotomie in neugeborenen Mäusen nicht reproduziert werden. Als Wildtyp-Kontrollen dienten hier Mäuse aus einem Balb/C-Inzuchtstamm. Vorläufige eigene Daten, ebenfalls aus Experimenten mit neugeborenen Mäusen, deuten darauf hin, dass nach Rückkreuzung in einen C57Bl/6 Hintergrund über fünf Generationen, bei Exon-4-Mutanten ( $p75^{\text{e4}}/-$ ) ebenfalls keine Effekte auf das neuronale Überleben im Vergleich zu Wildtyp-Tieren bestehen [40].

Am Rande seien in diesem Zusammenhang auch Experimente diskutiert, bei denen nach Verletzung peripherer Nerven hohe Dosen an NGF lokal appliziert wurden. Für Wildtyp-Mäuse konnte gezeigt werden, dass dieses exogene NGF das Überleben von Motoneuronen nach Fazialisaxotomie reduziert. Im Gegensatz dazu trat bei  $p75^{\text{NTR}}$ -defizienten Tieren ( $p75^{\text{e3}}/-$ ) eine drastische Verbesserung des neuronalen Überlebens nach Applikation derselben, für die normalen Mäuse neurotoxischen Dosen auf. Es liegt daher nahe,  $p75^{\text{NTR}}$  in diesem Zusammenhang eine Rolle als »Zelltod-Rezeptor« zuzuschreiben [96, 116]. Derartige Effekte scheinen aber unter physiologischen Bedingungen keine Rolle zu spielen. Das Fehlen eines Effektes auf das Überleben von Motoneuronen bei  $p75^{\text{NTR}}/-$  Tieren in Experimenten mit genauer Abstimmung des genetischen Hintergrundes und sorgfältiger Auswahl der Kontrolltiere, ohne Exposition gegenüber exogenem NGF, deutet darauf hin, dass endogenes NGF und andere Neurotrophine – zumindest bei diesem experimentellen Ansatz – keine toxische Wirkung haben. Eine interessante Beobachtung besteht darin, dass NGF-Bindungsstellen auf denervierten Schwann-Zellen unter bestimmten Bedingungen gleichsam als »Auffangbecken« für NGF zu dienen scheinen [78]; das Fehlen des Rezeptors in  $p75^{\text{NTR}}$ -defizienten Tieren kann die Verfügbarkeit von freiem NGF und anderen Neurotrophinen daher erhöhen [17, 67]. Es ist anzunehmen, dass sich dieser Mechanismus bei niedrigen, physiologischen NGF-Konzentrationen deutlich stärker auswirkt als unter experimentellen Bedingungen mit exogen zugegebenen Neurotrophinen – letztlich ist seine biologische Relevanz in diesem Zusammenhang allerdings unklar.

Auch frühere Arbeiten [16] geben bei genauerer Betrachtung keinen Anhalt dafür, dass  $p75^{\text{NTR}}$ -Defizienz in Exon-3-Knockouts einen Einfluss auf die Geschwindigkeit des axonalen Wachstums hat: Vielmehr scheint das

Vorhandensein von  $p75^{\text{NTR}}$  nur die Fähigkeit der Axone zu beeinträchtigen, relativ große Lücken zwischen proximalem und distalem Stumpf eines komplett durchtrennten Nerven zu überbrücken. Dieser Vorgang erfordert in hohem Maß auch Leistungen nicht-neuronaler Zellen, wie z. B.  $p75^{\text{NTR}}$ -positiver Schwann-Zellen, die dabei eine Art zelluläre Brücke zwischen den diskonnektierten Nervenenden bilden, welche dann als »Leitbahn« für die auswachsenden Axone dient [62, 99]. Wird der Nerv lediglich durch Quetschung verletzt und nicht komplett durchtrennt, so besteht keine (oder zumindest eine wesentlich geringere) Notwendigkeit für derartige Vorgänge, um erfolgreiche Regeneration zu ermöglichen. Bei der Quetschung werden zwar die Axone in ihrer Kontinuität unterbrochen, es erfolgt jedoch keine Dislokation zwischen proximalem und distalem Teil des Nerven, und die Nervenhülle sowie die Basalmembranen der Neurotubuli bleiben dabei weitgehend intakt.

Wie die vorliegende Arbeit zeigt, führt der komplette Verlust beider Isoformen von  $p75^{\text{NTR}}$  in  $p75e4^{-/-}$  Mäusen, nach Rückkreuzung in einen C57Bl/6-Hintergrund über 7 Generationen und Verwendung der F<sub>1</sub>-Nachkommen von heterozygoten Tieren für Experimente, weder zu Veränderungen beim neuronalen Überleben nach Axotomie, noch der axonalen Regeneration nach proximaler Quetschung des Fazialisnervs. Auch bei Tieren, die homozygot für die Exon-3-Mutation waren ( $p75e3^{-/-}$ ), zeigten sich keine Effekte. Die Experimente wurden an Mäusen durchgeführt, die durch Rückkreuzung des mutierten Exon-3-Allels in einen C57Bl/6-Hintergrund (die gleiche Linie, wie in früheren Arbeiten) über 5 Generationen und Paarung der daraus entstandenen, heterozygoten Tiere gewonnen worden waren.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Auswahl geeigneter Wildtyp-Kontrollen große Bedeutung besitzt, um widersprüchliche Ergebnisse zu vermeiden und außerdem die Zahl der Tiere zu minimieren, die in Versuchen benötigt werden, um eine bestimmte Hypothese zu beweisen oder zu widerlegen. Die Tatsache, dass bei sorgfältiger Abstimmung des genetischen Hintergrundes der Versuchstiere, in verschiedenen Mäusestämmen (Balb/C und C57Bl/6) und bei verschiedenen Linien transgener Mäuse (Exon-3- und Exon-4-Mutanten), die gleichen Ergebnisse gewonnen werden können, unterstreicht zudem die Wichtigkeit der »Hintergrund-Effekte« bei Untersuchungen an »Knockout«-Mäusen und die Notwendigkeit, experimentelle Strategien zu wählen, die dies berücksichtigen.

## 4.2 Inflammatorische Signale und p75<sup>NTR</sup>

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass p75<sup>NTR</sup> eine wichtige Rolle bei der Kontrolle inflammatorischer Prozesse im verletzten Nervensystem spielt. Beide Linien p75<sup>NTR</sup>-defizienter Mäuse zeigten einen deutlich stärkeren Anstieg von verschiedenen Markern, die eine Aktivierung von Mikroglia und Makrophagen im Rahmen einer Entzündungsreaktion anzeigen, sowie einen verstärkten Einstrom von T-Lymphozyten in den verletzten Fazialiskern.

Auch bei autoimmun-entzündlichen Erkrankungen des Nervensystems ist die Expression von NGF und p75<sup>NTR</sup> deutlich erhöht [19, 23, 70]. Sowohl der Rezeptor, als auch sein Ligand unterdrücken Interferon- $\gamma$ -vermittelte mikrogliale Aktivierung *in vitro* [73]. Die Freisetzung des Neurotrophins durch aktivierte, für das basische Myelinprotein (MPB) spezifische CD4+ T-Zellen, welche mit einem rekombinanten, für NGF kodierenden Retrovirus transduziert wurden, zeigte antiinflammatorische Effekte bei der experimentell allergischen Enzephalomyelitis (EAE) [33]. Die starke und frühe Entzündungsreaktion bei p75<sup>NTR</sup>-defizienten Mäusen als Antwort auf eine nicht-autoimmune Verletzung des Nervensystems, die bei den hier vorgestellten Experimenten beobachtet wurde, unterstreicht auch in diesem Modell die Wichtigkeit des Signalweges bei der Verhinderung einer überschießenden Aktivierung des Immunsystems.

Obwohl aus dem Gehirn stammende Mikroglia in Zellkultur-Experimenten p75<sup>NTR</sup> exprimiert [73], ist bei den Untersuchungen in dieser Arbeit, *in vivo* lediglich eine starke und selektive Expression des Rezeptors auf axotomierten Neuronen und denervierten Schwann-Zellen zu detektieren – auf benachbarten mikroglialen Zellen, Makrophagen und CD3-positiven T-Zellen ist immunhistochemisch kein p75<sup>NTR</sup> nachweisbar (siehe Abbildung 3.4 auf Seite 55). Diese Befunde deuten darauf hin, dass die *in vivo* erhobenen Ergebnisse zum Einfluss von p75<sup>NTR</sup> auf Zellen des Immunsystems indirekter Natur sind und über Neurone und Schwann-Zellen vermittelt werden. Eine derartige, negativ-regulatorische Funktion wurde auch für CD200 (früher OX2), zwischen neuronalem CD200 und dem mikroglialen CD200-Rezeptor gezeigt [42]. Abgesehen von der Bildung von Homodimeren geht p75<sup>NTR</sup> auch Wechselwirkung mit einer Reihe von anderen membranständigen Molekülen ein, darunter Ganglioside wie GT1b, der

Nogo-Rezeptor (NgR), alle drei Trk-Rezeptoren und das »Ankyrin repeat-rich membrane spanning protein«, kurz ARMS [52] (eine Übersichtsarbeit bietet Ref. [26]). Eine solche Interaktion mit CD200, aber auch anderen, verwandten Molekülen, könnte einer der Wege sein, auf dem p75<sup>NTR</sup> anti-inflammatorische Effekte vermittelt. Diese Hypothese harrt einer Überprüfung in weiteren Studien.

Periphere Nervenläsionen führen auch zu einem bedeutsamen Anstieg von neuronalen Mediatoren wie z. B. Interleukin-6, die eine Schlüsselrolle bei der Induktion der glialen Antwort auf die Verletzung und für die Einwanderung von Lymphozyten in das geschädigte Gewebe spielen [36, 46, 107]. Ein empfindliches Gleichgewicht zwischen entzündungsfördernden und -hemmenden Stoffen, die von verletzten Neuronen freigesetzt werden, ist nötig, um eine überschießende inflammatorische Reaktion auf die Verletzung zu verhindern. Die Daten, die in den Abbildungen 3.8, 3.9 und 3.12 auf den Seiten 61, 63 und 68 gezeigt wurden, weisen auf eine wichtige Rolle von p75<sup>NTR</sup> bei der Kontrolle dieser Vorgänge, sowohl im peripheren, als auch im zentralen Nervensystem hin.

Wie schon in der Einleitung (Abschnitt 1.1.2 auf den Seiten 15–17) beschrieben, läuft sowohl die mikrogliale Reaktion auf Verletzung, als auch die durch die Schädigung ausgelöste Einwanderung von Lymphozyten in zwei Phasen ab, welche anscheinend auch von unterschiedlichen molekularen Stimuli abhängen. Die erste Phase beginnt innerhalb von 24 Stunden nach Trauma und erreicht ihr Maximum ungefähr an Tag 4. Diese Reaktion findet in Interaktion mit verletzten, aber zu diesem Zeitpunkt noch lebenden Motoneuronen statt und zeichnet sich durch die starke mikrogliale Expression verschiedener Zelladhäsionsmoleküle, insbesondere der Integrine  $\alpha_5\beta_1$ ,  $\alpha_6\beta_1$  und  $\alpha_M\beta_2$ , sowie von ICAM-1 aus [39, 49, 68, 77, 113]. Die Einwanderung von Lymphozyten in das verletzte Gewebe beginnt ebenfalls bereits innerhalb der ersten 24 Stunden und erreicht ein Plateau von Tag 1 bis 4. Beide Teile der frühen Reaktion hängen von der Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen wie MCSF, IL-6 und TGF- $\beta_1$  ab und werden durch transgene Ausschaltung der jeweiligen Moleküle in entsprechenden Tiermodellen fast vollständig unterdrückt [36, 44, 90]. Wie die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen, werden diese beiden frühen Reaktionen auch durch p75<sup>NTR</sup> negativ reguliert.

Die zweite Phase findet in Reaktion auf eine verzögerte Form von neuronalem Zelltod, der sein Maximum an Tag 14 erreicht, statt. Sie zeichnet sich durch eine Aktivierung von Mikroglia mit Phagozytose von Zell-Debris, Transformation zu Makrophagen, Aggregation zu MHC-I-positiven »Knötchen« und Aktivierung von benachbarter, nicht-phagozytischer Mikroglia, gefolgt von gezielter, durch chemotaktische Reize gesteuerter Einwanderung von Lymphozyten aus dem Blut aus [68, 77, 80, 82, 109]. Diese Phase wird von einem späten Anstieg der Expression von IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  begleitet, diese Botenstoffe spielen eine wichtige und gleichzeitig sehr spezifische Rolle bei der Regulation von neuronalem Zelltod, mikroglialer Aktivierung und chemotaktisch gesteuerter Einwanderung von Lymphozyten [15, 82]. Wie die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen, wird diese zweite Phase nicht durch das Fehlen von p75<sup>NTR</sup> bei transgenen Mäusen beeinflusst. Dies erscheint auf den ersten Blick überraschend – ähnliche, selektive Effekte, die die auf eine getrennte Steuerung und eine mögliche unterschiedliche Funktion der frühen und der späten Phase der inflammatorischen Reaktion hinweisen, wurden allerdings auch schon früher beschrieben [36, 44, 82]. Diese Ergebnisse können so interpretiert werden, dass die mikrogliale und lymphozytäre Reaktion in diesem Stadium weniger von überlebenden Neuronen, die p75<sup>NTR</sup> exprimieren, abhängt, sondern eher als lokale Reaktion auf Zell-Trümmer zugrunde gegangener Neurone und auf p75<sup>NTR</sup>-negative, nicht-neuronale Zellen stattfindet. Außerdem könnte das Fehlen eines Effektes auf die T-Zell-Einwanderung in das lädierte Kerngebiet an Tag 14 oder in den unverletzten Fazialiskern bedeuten, dass der Rezeptor nicht eine globale Aktivierung und allgemein verstärkten Einwanderung von Lymphozyten vermittelt, sondern dass es sich bei den beobachteten Effekten um einen lokalen Effekt handelt, der durch verletzte Neurone in der Frühphase hervorgerufen wird. Die Identifikation von Signalen, die stromabwärts in der neuronalen Signalkaskade liegen, könnte die Möglichkeiten verbessern, die Entzündungsreaktion und die dadurch verursachte Destruktion von Gewebe zu verringern.



## 5 Zusammenfassung

Der Neurotrophinrezeptor  $p75^{\text{NTR}}$  gehört zur Superfamilie der Tumornekrosefaktor-Rezeptoren und bindet alle vier Neurotrophine (NGF, BDNF, NT3 und NT4) mit vergleichbarer Affinität. Er wird physiologischerweise während der Entwicklung des Nervensystems, sowie unter pathologischen Bedingungen, wie z. B. nach neuronaler Verletzung oder Neurodegeneration, auf Motoneuronen exprimiert.

In einem Tiermodell, der peripheren Axotomie des Nervus facialis bei der Maus, wurde in dieser Arbeit zunächst die Regulation und zelluläre Lokalisation von  $p75^{\text{NTR}}$  während der Regeneration von Motoneuronen untersucht. Die Axotomie führte bei Wildtyp-Mäusen zu einem starken Anstieg der  $p75^{\text{NTR}}$ -Immunreaktivität auf verletzten Motoneuronen und denervierten Schwann-Zellen. Experimente zur zellulären Kolokalisation zeigten, dass der Rezeptor auch auf Blutgefäßen exprimiert wird, nicht aber auf aktivierten, GFAP-positiven Astrozyten,  $\alpha_M\beta_2$ -positiver Mikroglia, oder auf Makrophagen.

Um die Funktion des Rezeptors in diesem Modell neuronaler Verletzung zu bestimmen, wurden die Effekte seiner Ausschaltung in zwei verschiedenen Linien transgener,  $p75^{\text{NTR}}$ -defizienter Mäuse, die Mutationen in Exon 3 bzw. Exon 4 des  $p75^{\text{NTR}}$ -Gens trugen, untersucht. Bei beiden Linien zeigte sich am Tag 4 nach Axotomie, im Vergleich zu Wildtyp-Tieren, eine vermehrte Einwanderung von T-Lymphozyten in den verletzten Fazialiskern, sowie ein signifikant höherer Anstieg der Immunreaktivität für die Integrine  $\alpha_5\beta_1$ ,  $\alpha_6\beta_1$  und  $\alpha_M\beta_2$  im Fazialiskern und (für  $\alpha_M\beta_2$ ) im Fazialisnerv. Es konnten keine Effekte auf die GFAP-Immunreaktivität von aktivierter Astroglia sowie auf die späte mikrogliale und lymphozytäre Antwort am Tag 14 nachgewiesen werden. Die überbrückte Distanz der regenerierenden Axone im verletzten Fazialisnerv, sowie der neuronale Zelltod nach Axotomie wurden durch das Fehlen von  $p75^{\text{NTR}}$  ebenfalls nicht beeinflusst. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass  $p75^{\text{NTR}}$  eine wichtige Rolle bei der

Regulation der immunologischen Reaktion in der frühen Phase nach neuronaler Verletzung spielt. Auf die Spätphase dieser Reaktion, sowie auf das neuronale Überleben nach Axotomie und auf die Regenerationsgeschwindigkeit verletzter Axone, scheint p75<sup>NTR</sup> jedoch keinen Einfluss zu haben.



## Literatur

- [1] ABERCOMBIE, M.: Estimation of nuclear populations from microtome sections. *Anat. Rec.*, 94:239–247, 1946
- [2] ADAMS, J. C.: Biotin amplification of biotin and horseradish peroxidase signals in histochemical stains. *J. Histochem. Cytochem.*, 40(10):1457–1463, Oct. 1992
- [3] BAMJI, S. X.; MAJDAN, M.; POZNIAK, C. D.; BELLIVEAU, D. J.; ALOYZ, R.; KOHN, J.; CAUSING, C. G.; MILLER, F. D.: The p75 neurotrophin receptor mediates neuronal apoptosis and is essential for naturally occurring sympathetic neuron death. *J. Cell. Biol.*, 140(4):911–923, Feb. 1998
- [4] BARBACID, M.: The Trk family of neurotrophin receptors. *J. Neurobiol.*, 25(11):1386–1403, Nov. 1994
- [5] BARBACID, M.: Structural and functional properties of the TRK family of neurotrophin receptors. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 766:442–458, Sep. 1995
- [6] BARTHELD, C. S. v.; KINOSHITA, Y.; PREVETTE, D.; YIN, Q. W.; OPPENHEIM, R. W.; BOTHWELL, M.: Positive and negative effects of neurotrophins on the isthmo-optic nucleus in chick embryos. *Neuron*, 12(3):639–54, Mar. 1994
- [7] BERNHARDT, R. R.: Cellular and molecular bases of axonal regeneration in the fish central nervous system. *Exp. Neurol.*, 157(2):223–40, Jun. 1999
- [8] BERNSTEIN, J. J.; BERNSTEIN, M. E.: Axonal regeneration and formation of synapses proximal to the site of lesion following

- hemisection of the rat spinal cord. *Exp. Neurol.*, 30(2):336–351, Feb. 1971
- [9] BERNSTEIN, J. J.; GELDERD, J. B.: Regeneration of the long spinal tracts in the goldfish. *Brain Res.*, 20(1):33–38, May 1970
- [10] BIBEL, M.; BARDE, Y. A.: Neurotrophins: key regulators of cell fate and cell shape in the vertebrate nervous system. *Genes Dev.*, 14(23):2919–2937, Dec. 2000
- [11] BIGNAMI, A.; ENG, L. F.; DAHL, D.; UYEDA, C. T.: Localization of the glial fibrillary acidic protein in astrocytes by immunofluorescence. *Brain Res.*, 43(2):429–435, Aug. 1972
- [12] BIGNAMI, A.; FORNO, L.; DAHL, D.: The neuroglial response to injury following spinal cord transection in the goldfish. *Exp. Neurol.*, 44(1):60–70, Jul. 1974
- [13] BISBY, M. A.: Regeneration of peripheral nervous system axons. In: Waxman, S. G.; Kocsis, J. D. und Stys, J. D. (Hrsg.): *The Axon*, Oxford University Press, New York, 1995, Kapitel 28, Seite 553–578.
- [14] BLINZINGER, K.; KREUTZBERG, G.: Displacement of synaptic terminals from regenerating motoneurons by microglial cells. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.*, 85(2):145–157, 1968
- [15] BOHATSCHKE, M.; GSCHWENDTNER, A.; MALTZAN, X. von; KLOSS, C. U. A.; PFEFFER, K.; LABOW, M.; BLUETHMANN, H.; KREUTZBERG, G. W.; RAIVICH, G.: Cytokine-mediated regulation of MHC1, MHC2, and B7-2 in the axotomized mouse facial motor nucleus. *Soc. Neurosci. Abs.*, 25:1535, 1999
- [16] BOYD, J. G.; GORDON, T.: The neurotrophin receptors, trkB and p75, differentially regulate motor axonal regeneration. *J. Neurobiol.*, 49(4):314–325, Dec. 2001
- [17] BOYD, J. G.; GORDON, T.: A dose-dependent facilitation and inhibition of peripheral nerve regeneration by brain-derived neurotrophic factor. *Eur. J. Neurosci.*, 15(4):613–626, Feb. 2002

- [18] CAJAL, S. Ramón y: Degeneration and regeneration in the nervous system (translated and edited by R. M. May). *Faksimile der Ausgabe von 1928*, New York, Hafner, 1957
- [19] CALZA, L.; GIARDINO, L.; POZZA, M.; MICERA, A.; ALOE, L.: Time-course changes of nerve growth factor, corticotropin-releasing hormone, and nitric oxide synthase isoforms and their possible role in the development of inflammatory response in experimental allergic encephalomyelitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 94(7):3368–3373, Apr. 1997
- [20] CARTER, B. D.; LEWIN, G. R.: Neurotrophins live or let die: does p75NTR decide? *Neuron*, 18(2):187–90, Feb. 1997
- [21] CHAO, M.; CASACCIA-BONNEFIL, P.; CARTER, B.; CHITTKA, A.; KONG, H.; YOON, S. O.: Neurotrophin receptors: mediators of life and death. *Brain Res. – Brain Res. Rev.*, 26(2-3):295–301, May 1998
- [22] DAVIS, B. M.; DUFFY, M. T.; SIMPSON JR., S. B.: Bulbospinal and intraspinal connections in normal and regenerated salamander spinal cord. *Exp Neurol.*, 103(1):41–51, Jan. 1989
- [23] DE SIMONE, R.; MICERA, A.; TIRASSA, P.; ALOE, L.: mRNA for NGF and p75 in the central nervous system of rats affected by experimental allergic encephalomyelitis. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, 22(1):54–59, Feb. 1996
- [24] DECHANT, G.: Molecular interactions between neurotrophin receptors. *Cell. Tissue Res.*, 305(2):229–238, Aug. 2001
- [25] DECHANT, G.; BARDE, Y. A.: Signalling through the neurotrophin receptor p75NTR. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 7(3):413–418, Jun. 1997
- [26] DECHANT, G.; BARDE, Y. A.: The neurotrophin receptor p75NTR: novel functions and implications for diseases of the nervous system. *Nat. Neurosci.*, 5(11):1131–1136, Nov. 2002
- [27] DECHANT, G.; TSOULFAS, P.; PARADA, L. F.; BARDE, Y. A.: The neurotrophin receptor p75 binds neurotrophin-3 on sympathetic

- neurons with high affinity and specificity. *J. Neurosci.*, 17(14):5281–5287, Jul. 1997
- [28] DELLA-BIANCA, V.; ROSSI, F.; ARMATO, U.; DAL-PRA, I.; COSTANTINI, C.; PERINI, G.; POLITI, V.; DELLA VALLE, G.: Neurotrophin p75 receptor is involved in neuronal damage by prion peptide-(106-126). *J. Biol. Chem.*, 276(42):38929–38933, Oct. 2001
- [29] ERNFORS, P.; HALLBOOK, F.; EBENDAL, T.; SHOOTER, E. M.; RADEKE, M. J.; MISKO, T. P.; PERSSON, H.: Developmental and regional expression of beta-nerve growth factor receptor mRNA in the chick and rat. *Neuron*, 1(10):983–996, Dec. 1988
- [30] ERNFORS, P.; HENSCHEN, A.; OLSON, L.; PERSSON, H.: Expression of nerve growth factor receptor mRNA is developmentally regulated and increased after axotomy in rat spinal cord motoneurons. *Neuron*, 2(6):1605–1613, Jun. 1989
- [31] FERINGA, E. R.; SHUER, L. M.; VAHLSING, H. L.; DAVIS, S. W.: Regeneration of corticospinal axons in the rat. *Ann. Neurol.*, 2(4):315–321, Oct. 1977
- [32] FERRI, C. C.; MOORE, F. A.; BISBY, M. A.: Effects of facial nerve injury on mouse motoneurons lacking the p75 low-affinity neurotrophin receptor. *J. Neurobiol.*, 34(1):1–9, Jan. 1998
- [33] FLÜGEL, A.; MATSUMURO, K.; NEUMANN, H.; KLINKERT, W. E.; BIRNBACHER, R.; LASSMANN, H.; OTTEN, U.; WEKERLE, H.: Anti-inflammatory activity of nerve growth factor in experimental autoimmune encephalomyelitis: inhibition of monocyte transendothelial migration. *Eur. J. Immunol.*, 31(1):11–22, Jan. 2001
- [34] FRADE, J. M.; BARDE, Y. A.: Nerve growth factor: two receptors, multiple functions. Review. *Bioessays*, 20(2):137–145, Feb. 1998
- [35] FRADE, J. M.; RODRIGUEZ-TEBAR, A.; BARDE, Y. A.: Induction of cell death by endogenous nerve growth factor through its p75 receptor. *Nature*, 383(6596):166–168, Sep. 1996

- [36] GALIANO, M.; LIU, Z. Q.; KALLA, R.; BOHATSCHKEK, M.; KOPPIUS, A.; GSCHWENDTNER, A.; XU, S.; WERNER, A.; KLOSS, C. U. A.; JONES, L. L.; BLUETHMANN, H.; RAIVICH, G.: Interleukin-6 (IL6) and cellular response to facial nerve injury: effects on lymphocyte recruitment, early microglial activation and axonal outgrowth in IL6-deficient mice. *Eur. J. Neurosci.*, 14(2):327–341, Jul. 2001
- [37] GRAEBER, M. B.; KREUTZBERG, G. W.: Delayed astrocyte reaction following facial nerve axotomy. *J. Neurocytol.*, 17(2):209–220, Apr. 1988
- [38] GRAEBER, M. B.; STREIT, W. J.: Microglia: Immune network in the CNS. *Brain Pathol.*, 1:2–5, Sep. 1990
- [39] GRAEBER, M. B.; STREIT, W. J.; KREUTZBERG, G. W.: Axotomy of the rat facial nerve leads to increased CR3 complement receptor expression by activated microglial cells. *J. Neurosci. Res.*, 21(1):18–24, Sep. 1988
- [40] GSCHWENDTNER, A.; DECHANT, G.; GRAEBER, M.; FRADE, J. M.; KALLA, R.; JONES, L. L.; KREUTZBERG, G. W.; BARDE, Y. A.; RAIVICH, G.: Regulation and function of the gp75 neurotrophin receptor in motoneuron regeneration. *Soc. Neurosci. Abs.*, 25:1782, 1999
- [41] HAYES, R. C.; WILEY, R. G.; ARMSTRONG, D. M.: Induction of nerve growth factor receptor (p75NGFr) mRNA within hypoglossal motoneurons following axonal injury. *Brain Res. - Mol. Brain Res.*, 15(3-4):291–297, Oct. 1992
- [42] HOEK, R.M.; RUULS, S.R.; MURPHY, CA; WRIGHT, G. J.; GODDARD, R.; ZURAWSKI, S. M.; BLOM, B.; HOMOLA, M. E.; STREIT, W. J.; BROWN, M. H.; BARCLAY, A. N.; SEDGWICK, J. D.: Down-regulation of the macrophage lineage through interaction with OX2 (CD200). *Science*, 290(5497):1768–1771, Dec. 2000
- [43] INMAN, D.; GUTH, L.; STEWARD, O.: Genetic influences on secondary degeneration and wound healing following spinal cord injury in various strains of mice. *J. Comp. Neurol.*, 451(3):225–235, Sep. 2002

- [44] KALLA, R.; LIU, Z.; XU, S.; KOPPIUS, A.; IMAI, Y.; KLOSS, C. U. A.; KOHSAKA, S.; GSCHWENDTNER, A.; MÖLLER, J. C.; WERNER, A.; RAIVICH, G.: Microglia and the early phase of immune surveillance in the axotomized facial motor nucleus: impaired microglial activation and lymphocyte recruitment but no effect on neuronal survival or axonal regeneration in macrophage-colony stimulating factor-deficient mice. *J. Comp. Neurol.*, 436(2):182–201, Jul. 2001
- [45] KERKHOFF, H.; JENNEKENS, F. G.; TROOST, D.; VELDMAN, H.: Nerve growth factor receptor immunostaining in the spinal cord and peripheral nerves in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol (Berl.)*, 81(6):649–656, 1991
- [46] KLEIN, M. A.; MÖLLER, J. C.; JONES, L. L.; BLUETHMANN, H.; KREUTZBERG, G. W.; RAIVICH, G.: Impaired neuroglial activation in interleukin-6 deficient mice. *Glia*, 19(3):227–233, Mar. 1997
- [47] KLEIN, R.; JING, S. Q.; NANDURI, V.; O’ROURKE, E.; BARBACID, M.: The trk proto-oncogene encodes a receptor for nerve growth factor. *Cell*, 65(1):189–97, Apr. 1991
- [48] KLOSS, C. U. A.: Integrine und Neuroglia – Eine Familie von Zelladhäsionsmolekülen und die Mikroglia-Aktivierung im zentralen Nervensystem. *Dissertation an der Technischen Universität München, Fakultät für Medizin*, 2000, online abrufbar unter: <http://tumb1.biblio.tu-muenchen.de/publ/diss/me/2000/kloss.html>
- [49] KLOSS, C. U. A.; WERNER, A.; KLEIN, M. A.; SHEN, J.; MENUZ, K.; PROBST, J. C.; KREUTZBERG, G. W.; RAIVICH, G.: Integrin family of cell adhesion molecules in the injured brain: regulation and cellular localization in the normal and regenerating mouse facial motor nucleus. *J. Comp. Neurol.*, 411(1):162–78, Aug. 1999
- [50] KOLIATSOS, V. E.; CRAWFORD, T. O.; PRICE, D. L.: Axotomy induces nerve growth factor receptor immunoreactivity in spinal motor neurons. *Brain Res.*, 549(2):297–304, May 1991
- [51] KOLODKIN, A. L.: Growth cones and the cues that repel them. *Trends Neurosci.*, 19(11):507–513, Nov. 1996

- [52] KONG, H.; BOULTER, J.; WEBER, J. L.; LAI, C.; CHAO, M. V.: An evolutionarily conserved transmembrane protein that is a novel downstream target of neurotrophin and ephrin receptors. *J. Neurosci.*, 21(1):176–185, Jan. 2001
- [53] KORDOWER, J. H.; BANKIEWICZ, K. S.; MUFSON, E. J.: NGF receptor (p75)-immunoreactivity within hypoglossal motoneurons following axotomy in monkeys. *Restor. Neurol. Neurosci.*, 4:411–417, 1992
- [54] KREUTZBERG, G. W.: Microglia: A Sensor for Pathological Events in the CNS. *Trends Neurosci.*, 19(8):312–318, Aug. 1996
- [55] KREUTZBERG, G. W.: Principles of neuronal regeneration. *Acta Neurochir. Suppl. (Wien)*, 66:103–106, 1996
- [56] KREUTZBERG, G. W.: Reaction of the neuronal cell body to axonal damage. In: Waxman, S. G.; Kocsis, J. D. und Stys, J. D. (Hrsg.): *The Axon*, Oxford University Press, New York, 1995, Seite 355–374.
- [57] LAMBALLE, F.; KLEIN, R.; BARBACID, M.: TrkC, a new member of the trk family of tyrosine protein kinases, is a receptor for neurotrophin-3. *Cell*, 66(5):967–979, Sep. 1991
- [58] LANGEVIN, C.; JAARO, H.; BRESSANELLI, S.; FAINZILBER, M.; TUFFEREAU, C.: Rabies virus glycoprotein (RVG) is a trimeric ligand for the N-terminal cysteine-rich domain of the mammalian p75 neurotrophin receptor. *J. Biol. Chem.*, 277(40):37655–37662, Oct. 2002
- [59] LEE, K. F.; LI, E.; HUBER, L. J.; LANDIS, S. C.; SHARPE, A. H.; CHAO, M. V.; JAENISCH, R.: Targeted mutation of the gene encoding the low affinity NGF receptor p75 leads to deficits in the peripheral sensory nervous system. *Cell*, 69(5):737–749, May 1992
- [60] LIEPINSH, E.; ILAG, L. L.; OTTING, G.; IBANEZ, C. F.: NMR structure of the death domain of the p75 neurotrophin receptor. *EMBO J.*, 16(16):4999–5005, Aug. 1997
- [61] LUCKENBILL-EDDS, L.: Laminin and the mechanism of neuronal outgrowth. *Brain Res. – Brain Res. Rev.*, 23(1-2):1–27, Feb. 1997

- [62] LUNDBORG, G.; DAHLIN, L. B.; DANIELSEN, N.; GELBERMAN, R. H.; LONGO, F. M.; POWELL, H. C.; VARON, S.: Nerve regeneration in silicone chambers: influence of gap length and of distal stump components. *Exp. Neurol.*, 76(2):361–375, May 1982
- [63] MALLETT, S.; BARCLAY, A. N.: A new superfamily of cell surface proteins related to the nerve growth factor receptor. *Immunol. Today*, 12(7):220–223, Jul. 1991
- [64] MARKUS, A.; PATEL, T. D.; SNIDER, W. D.: Neurotrophic factors and axonal growth. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 12(5):523–531, Oct. 2002
- [65] MARTINI, R.: Expression and functional roles of neural cell surface molecules and extracellular matrix components during development and regeneration of peripheral nerves. *J. Neurocytol.*, 23(1):1–28, Jan. 1994
- [66] MERZBACHER, L.: Untersuchungen über die Morphologie und Biologie der Abraumzellen im Zentralnervensystem. Fischer Verlag, 1909
- [67] MEYER, M.; MATSUOKA, I.; WETMORE, C.; OLSON, L.; THOENEN, H.: Enhanced synthesis of brain-derived neurotrophic factor in the lesioned peripheral nerve: different mechanisms are responsible for the regulation of BDNF and NGF mRNA. *J. Cell Biol.*, 119(1):45–54, Oct. 1992
- [68] MÖLLER, J. C.; KLEIN, M. A.; HAAS, S.; JONES, L. L.; KREUTZBERG, G. W.; RAIVICH, G.: Regulation of thrombospondin in the regenerating mouse facial motor nucleus. *Glia*, 17(2):121–132, Jun. 1996
- [69] MOORE, R. Y.: Cranial motor neurons contain either galanin- or calcitonin gene-related peptidelike immunoreactivity. *J. Comp. Neurol.*, 282(4):512–522, Apr. 1989
- [70] NATAF, S.; NAVEILHAN, P.; SINDJI, L.; DARCY, F.; BRACHET, P.; MONTERO-MENEI, C. N.: Low affinity NGF receptor expression in the central nervous system during experimental allergic encephalomyelitis. *J. Neurosci. Res.*, 52(1):83–92, Apr. 1998



- [71] NAUJOKS-MANTEUFFEL, C.; NIEMANN, U.: Microglial cells in the brain of *Pleurodeles waltl* (Urodela, Salamandridae) after wallerian degeneration in the primary visual system using *Bandeiraea simplicifolia* isolectin B4-cytochemistry. *GLIA*, 10(2):101–113, Feb. 1994
- [72] NAUMANN, T.; CASADEMUNT, E.; HOLLERBACH, E.; HOFMANN, J.; DECHANT, G.; FROTSCHER, M.; BARDE, Y. A.: Complete deletion of the neurotrophin receptor p75<sup>NTR</sup> leads to long-lasting increases in the number of basal forebrain cholinergic neurons. *J. Neurosci.*, 22(7):2409–2418, Apr. 2002
- [73] NEUMANN, H.; MISGELD, T.; MATSUMURO, K.; WEKERLE, H.: Neurotrophins inhibit major histocompatibility class II inducibility of microglia: involvement of the p75 neurotrophin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 95(10):5779–5784, May 1998
- [74] NISSL, F.: Über einige Beziehungen zwischen Nervenzellerkrankungen und gliösen Erscheinungen bei verschiedenen Psychosen. *Arch. Psychiatr.*, 32:1–21, 1899
- [75] PERINI, G.; DELLA-BIANCA, V.; POLITI, V.; DELLA VALLE, G.; DAL-PRA, I.; ROSSI, F.; ARMATO, U.: Role of p75 neurotrophin receptor in the neurotoxicity by beta-amyloid peptides and synergistic effect of inflammatory cytokines. *J. Exp. Med.*, 195(9):907–918, May 2002
- [76] PERRY, V. H.; GORDON, S.: Macrophages and microglia in the nervous system. *Trends Neurosci.*, 11(6):273–277, Jun. 1988
- [77] RAIVICH, G.; BOHATSCHKEK, M.; KLOSS, C. U. A.; WERNER, A.; JONES, L. L.; KREUTZBERG, G. W.: Neuroglial activation repertoire in the injured brain: graded response, molecular mechanisms and cues to physiological function. *Brain Res. – Brain Res. Rev.*, 30:77–105, Jul. 1999
- [78] RAIVICH, G.; GRAEBER, M. B.; GEHRMANN, J.; KREUTZBERG, G. W.: Transferrin receptor expression and iron uptake in the injured and regenerating rat sciatic nerve. *Eur. J. Neurosci.*, 3(10):919–927, 1991

- [79] RAIVICH, G.; HAAS, S.; WERNER, A.; KLEIN, M. A.; KLOSS, C.; KREUTZBERG, G. W.: Regulation of MCSF receptors on microglia in the normal and injured mouse central nervous system: a quantitative immunofluorescence study using confocal laser microscopy. *J. Comp. Neurol.*, 395(3):342–358, Jun. 1998
- [80] RAIVICH, G.; JONES, L. L.; KLOSS, C. U. A.; WERNER, A.; NEUMANN, H.; KREUTZBERG, G. W.: Immune surveillance in the injured nervous system: T-lymphocytes invade the axotomized mouse facial motor nucleus and aggregate around sites of neuronal degeneration. *J. Neurosci.*, 18(15):5804–5816, Aug. 1998
- [81] RAIVICH, G.; KREUTZBERG, G. W.: Peripheral nerve regeneration: role of growth factors and their receptors. *Int. J. Dev. Neurosci.*, 11(3):311–324, Jun. 1993
- [82] RAIVICH, G.; LIU, Z. Q.; KLOSS, C. U. A.; LABOW, M.; BLUETHMANN, H.; BOHATSCHKE, M.: Cytotoxic potential of proinflammatory cytokines: combined deletion of TNF receptors TNFR1 and TNFR2 prevents motoneuron cell death after facial axotomy in adult mouse. *Exp. Neurol.*, 178(2):186–93, Dec. 2002
- [83] RAIVICH, G.; MORENO-FLORES, M. T.; MÖLLER, J. C.; KREUTZBERG, G. W.: Inhibition of posttraumatic microglial proliferation in a genetic model of macrophage colony-stimulating factor deficiency in the mouse. *Eur. J. Neurosci.*, 6(10):1615–1618, Oct. 1994
- [84] RAIVICH, G.; REDDINGTON, M.; HAAS, C. A.; KREUTZBERG, G. W.: Peptides in motoneurons. *Prog. Brain Res.*, 104:3–20, 1995
- [85] RAIVICH, G.; ZIMMERMANN, A.; SUTTER, A.: The spatial and temporal pattern of beta NGF receptor expression in the developing chick embryo. *EMBO J.*, 4(3):637–644, Mar. 1985
- [86] RENDE, M.; PROVENZANO, C.; TONALI, P.: Modulation of low-affinity nerve growth factor receptor in injured adult rat spinal cord motoneurons. *J. Comp. Neurol.*, 338(4):560–574, Dec. 1993

- 
- [87] RIESKE, E.; GRAEBER, M. B.; TETZLAFF, W.; CZLONKOWSKA, A.; STREIT, W. J.; KREUTZBERG, G. W.: Microglia and microglia-derived brain macrophages in culture: generation from axotomized rat facial nuclei, identification and characterization in vitro. *Brain Res.*, 492(1-2):1–14, Jul. 1989
- [88] RIO-HORTEGA, P. del: Microglia. *in: Penfield, E. (Hrsg.), Cytology and cellular pathology of the central nervous system, Vol. II.*, :481–534, Paul B. Hoeber, New York, 1932
- [89] RODRIGUEZ-TEBAR, A.; DECHANT, G.; BARDE, Y. A.: Binding of brain-derived neurotrophic factor to the nerve growth factor receptor. *Neuron*, 4(4):487–492, Apr. 1990
- [90] RONG, L. Y.; JONES, L. L.; BUERINGER, D.; KOPPIUS, A.; DOETSCHMAN, T.; RAIVICH, G.: Axon/myelin pathology, astrogliosis and perturbed microglial response in TGF $\beta$ 1-deficient mice. *Soc. Neurosci. Abs.*, 28:880, 2001
- [91] SCHACK, D. VON; CASADEMUNT, E.; SCHWEIGREITER, R.; MEYER, M.; BIBEL, M.; DECHANT, G.: Complete ablation of the neurotrophin receptor p75NTR causes defects both in the nervous and the vascular system. *Nat. Neurosci.*, 4(10):977–978, Oct. 2001
- [92] SCHAUWECKER, P. E.; STEWARD, O.: Genetic determinants of susceptibility to excitotoxic cell death: implications for gene targeting approaches. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 94(8):4103–4108, Apr. 1997
- [93] SCHRÖPEL, A.; SCHACK, D. VON; DECHANT, G.; BARDE, Y. A.: Early expression of the nerve growth factor receptor *ctrkA* in chick sympathetic and sensory ganglia. *Mol. Cell. Neurosci.*, 6(6):544–556, Dec. 1995
- [94] SEEBURGER, J. L.; TARRAS, S.; NATTER, H.; SPRINGER, J. E.: Spinal cord motoneurons express p75NGFR and p145trkB mRNA in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Res.*, 621(1):111–115, Sep. 1993

- [95] SENDTNER, M.; GÖTZ, R.; HOLTMANN, B.; THOENEN, H.: Endogenous ciliary neurotrophic factor is a lesion factor for axotomized motoneurons in adult mice. *J. Neurosci.*, 17(18):6999–7006, Sep. 1997
- [96] SENDTNER, M.; HOLTMANN, B.; KOLBECK, R.; THOENEN, H.; BARDE, Y. A.: Brain-derived neurotrophic factor prevents the death of motoneurons in newborn rats after nerve section. *Nature*, 360(6406):757–759, Dec. 1992
- [97] SERPE, C. J.; M., Sanders. V.; JONES, K. J.: Kinetics of facial motoneuron loss following facial nerve transection in severe combined immunodeficient mice. *J. Neurosci. Res.*, 62(2):273–278, Oct. 2000
- [98] SILVA, A. J.; SIMPSON, E. M.; TAKAHASHI, J. S.; LIPP, H.; NAKANISHI, S.; WEHNER, J. M.; GIESE, K. P.; TULLY, T.; ABEL, T.; CAPMAN, P. F. et al.: Mutant mice and neuroscience: recommendations concerning genetic background. Banbury Conference on genetic background in mice. *Neuron*, 19(4):755–9, 1998
- [99] SJOBERG, J.; KANJE, M.; EDSTROM, A.: Influence of non-neuronal cells on regeneration of the rat sciatic nerve. *Brain Res.*, 453(1-2):221–226, Jun. 1988
- [100] SJÖSTRAND, J.: Studies on glial cells in the hypoglossal nucleus of the rabbit during nerve regeneration. *Acta Physiol. Scand. Suppl.*, 270:1–17, 1966
- [101] SNIDER, W. D.: Functions of the neurotrophins during nervous system development: what the knockouts are teaching us. *Cell*, 77(5):627–638, Jun. 1994
- [102] SPERRY, R. W.: Functional regeneration in the optic system. In: Windle, W. F. (Hrsg.): *Regeneration in the central nervous system*, 1955, Seite 66–76

- [103] SQUINTO, S. P.; STITT, T. N.; ALDRICH, T. H.; DAVIS, S.; BIANCO, S. M.; RADZIEJEWSKI, C.; GLASS, D. J.; MASIAKOWSKI, P.; FURTH, M. E.; VALENZUELA, D. M. et al.: *trkB* encodes a functional receptor for brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 but not nerve growth factor. *Cell*, 65(5):885–893, May 1991
- [104] STEWARD, O.; SCHAUWECKER, P. E.; GUTH, L.; ZHANG, Z.; FUJIKI, M.; INMAN, D.; WRATHALL, J.; KEMPERMANN, G.; GAGE, F. H.; SAATMAN, K. E.; RAGHUPATHI, R.; MCINTOSH, T.: Genetic approaches to neurotrauma research: opportunities and potential pitfalls of murine models. *Exp. Neurol.*, 157(1):19–42, May 1999
- [105] STREIT, W. J.; DUMOULIN, F. L.; RAIVICH, G.; KREUTZBERG, G. W.: Calcitonin gene-related peptide increases in rat facial motoneurons after peripheral nerve transection. *Neurosci. Lett.*, 101(2):143–148, Jun. 1989
- [106] STUERMER, C. A.; BASTMEYER, M.; BAHR, M.; STROBEL, G.; PASCHKE, K.: Trying to understand axonal regeneration in the CNS of fish. *J. Neurobiol.*, 23(5):537–50, Jul. 1992
- [107] SUGIURA, S.; LAHAV, R.; HAN, J.; KOU, S. Y.; BANNER, L. R.; PABLO, F. de; PATTERSON, P. H.: Leukaemia inhibitory factor is required for normal inflammatory responses to injury in the peripheral and central nervous systems in vivo and is chemotactic for macrophages in vitro. *Eur. J. Neurosci.*, 12(2):457–466, Feb. 2000
- [108] THREADGILL, D. W.; DLUGOSZ, A. A.; HANSEN, L. A.; TENNENBAUM, T.; LICHTI, U.; YEE, D.; LAMANTIA, C.; MOURTON, T.; HERRUP, K.; HARRIS, R. C. et al.: Targeted disruption of mouse EGF receptor: effect of genetic background on mutant phenotype. *Science*, 269(5221):230–4, Jul. 1995
- [109] TORVIK, A.; SKJÖRTEN, F.: Electron microscopic observations on nerve cell regeneration and degeneration after axon lesions. II. Changes in the glial cells. *Acta Neuropathol. (Berl.)*, 17(3):265–82, 1971

- [110] TUFFEREAU, C.; BÉNÉJEAN, J.; BLONDEL, D.; KIEFFER, B.; FLAMAND, A.: Low-affinity nerve-growth factor receptor (P75NTR) can serve as a receptor for rabies virus. *EMBO J.*, 17(24):7250–7259, Dec. 1998
- [111] UDIN, S. B.; FAWCETT, J. W.: Formation of topographic maps. *Annu. Rev. Neurosci.*, 11(5):289–327, Mar. 1988
- [112] WANG, K. C.; KIM, J. A.; SIVASANKARAN, R.; SEGAL, R.; HE, Z.: P75 interacts with the Nogo receptor as a co-receptor for Nogo, MAG and OMgp. *Nature*, 420(6911):74–8, Nov. 2002
- [113] WERNER, A.; KLOSS, C. U. A.; WALTER, J.; KREUTZBERG, G. W.; RAIVICH, G.: Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in the mouse facial motor nucleus after axonal injury and during regeneration. *J. Neurocytol.*, 27(4):219–232, Apr. 1998
- [114] WERNER, A.; MARTIN, S.; GUTIERREZ-RAMOS, J. C.; RAIVICH, G.: Leukocyte recruitment and neuroglial activation during facial nerve regeneration in ICAM-1-deficient mice: effects of breeding strategy. *Cell Tissue Res.*, 305(1):25–41, Jul. 2001
- [115] WERNER, A.; WILLEM, M.; JONES, L. L.; KREUTZBERG, G. W.; MAYER, U.; RAIVICH, G.: Impaired axonal regeneration in alpha7 integrin-deficient mice. *J. Neurosci.*, 20(5):1822–1830, Mar. 2000
- [116] WIESE, S.; METZGER, F.; HOLTSMANN, B.; SENDTNER, M.: The role of p75NTR in modulating neurotrophin survival effects in developing motoneurons. *Eur. J. Neurosci.*, 11(5):1668–1676, May 1999
- [117] WOOD, S. J.; PRITCHARD, J.; SOFRONIEW, M. V.: Re-expression of nerve growth factor receptor after axonal injury recapitulates a developmental event in motor neurons: differential regulation when regeneration is allowed or prevented. *Eur. J. Neurosci.*, 2(7):650–657, 1990
- [118] YAAR, M.; ZHAI, S.; PILCH, P. F.; DOYLE, S. M.; EISENHAUER, P. B.; FINE, R. E.; GILCHREST, B. A.: Binding of beta-amyloid to the p75 neurotrophin receptor induces apoptosis. A possible mechanism for Alzheimer's disease. *J. Clin. Invest.*, 100(9):2333–2340, Nov. 1997

- [119] YAMASHITA, T.; TUCKER, K. L.; BARDE, Y. A.: Neurotrophin binding to the p75 receptor modulates Rho activity and axonal outgrowth. *Neuron*, 24(3):585–593, Nov. 1999
- [120] YAN, Q.; JOHNSON JR., E. M.: An immunohistochemical study of the nerve growth factor receptor in developing rats. *J. Neurosci.*, 8(9):3481–3498, Sep. 1988
- [121] YANO, H.; CHAO, M. V.: Neurotrophin receptor structure and interactions. *Pharm. Acta Helv.*, 74(2-3):253–60, Mar. 2000





# Publikationen

Im Rahmen dieser Arbeit sind folgende Veröffentlichungen entstanden:

## Originalarbeiten:

- KALLA, R.; LIU, Z.; XU, S.; KOPPIUS, A.; IMAI, Y.; KLOSS, C. U. A.; KOHSAKA, S.; GSWENDTNER, A.; MÖLLER, J. C.; WERNER, A.; RAIVICH, G.: Microglia and the early phase of immune surveillance in the axotomized facial motor nucleus: impaired microglial activation and lymphocyte recruitment but no effect on neuronal survival or axonal regeneration in macrophage-colony stimulating factor-deficient mice. *J. Comp. Neurol.*, 436(2):182-201, Jul. 2001
- GALIANO, M.; LIU, Z. Q.; KALLA, R.; BOHATSCHK, M.; KOPPIUS, A.; GSWENDTNER, A.; XU, S.; WERNER, A.; KLOSS, C. U. A.; JONES, L. L.; BLUETHMANN, H.; RAIVICH, G.: Interleukin-6 (IL6) and cellular response to facial nerve injury: effects on lymphocyte recruitment, early microglial activation and axonal outgrowth in IL6-deficient mice. *Eur. J. Neurosci.*, 14(2):327-341, Jul. 2001
- GSWENDTNER, A.; LIU, Z.; HUCHO, T.; BOHATSCHK, M.; KALLA, R.; DECHANT, G.; RAIVICH, G.: Regulation, cellular localization, and function of the p75 neurotrophin receptor (p75NTR) during the regeneration of facial motoneurons. *Mol. Cell. Neurosci.*, 24(2):307-322, Oct. 2003

**Kongressbeiträge:**

- Gschwendtner, A.; Dechant, G.; Graeber, M.; Fraide, J. M.; Kalla, R.; Jones, L. L.; Kreutzberg, G. W.; Barde, Y. A.; Raivich, G.: Regulation and function of the gp75 neurotrophin receptor in motoneuron regeneration. *Soc. Neurosci. Abs.*, 25:1782, 1999
- Bohatschek, M.; Gschwendtner, A.; von Maltzan, X. Kloss, C. U. A.; Pfeffer, K.; Labow, M.; Bluethmann, H.; Kreutzberg, G. W.; Raivich, G.: Cytokine-mediated regulation of MHC1, MHC2 and B7-2, in the axotomized mouse facial motor nucleus *Soc. Neurosci. Abs.*, 25:1535, 1999

# Index

129Sv/J-Mäuse 29, 72

## A

ABC/DAB-Technik *siehe*  
    Immunhistochemie  
Abercombie Correction 43  
Adjuvans, Freund'sches 31  
Alkoholreihe 36  
Amputationsneurom 21  
Amyloid- $\beta$  22  
Anästhesie 33  
»Ankyrin repeat-rich membrane  
    spanning protein« *siehe*  
    ARMS  
Apo 1 22  
ARMS 76  
Astrogliose 62, 69  
Autofluoreszenz 38  
Avertin® *siehe* Tribromethanol  
Avidin 35, 37  
Axotomie des N. facialis  
– Arbeitstechnik 33  
– Vorteile des Modells 31

## B

B7.2 16  
Bänder, Büngner'sche 19

Büngner'sche Bänder *siehe* Bänder,  
    Büngner'sche  
Bakterienkultur *siehe* E. coli-Kultur  
Balb/C-Mäuse 72–74  
Basalmembran, neurotubuläre 19  
BDNF 21, 22, 79  
biotinyliertes Tyramin *siehe*  
    Tyramin, biotinyliertes  
Blut-Hirn-Schranke 17, 32, 33  
Brain-derived growth factor *siehe*  
    BDNF

## C

C3bi 16  
C57Bl/6-Mäuse 29, 72–74  
Calcitonin gene related  
    peptide *siehe* CGRP  
CD-1-Mäuse 72  
CD200 75, 76  
CD95 22  
CD40 22  
CGRP 18, 45, 47, 58  
CoCl<sub>2</sub> *siehe* Kobalt-Nickel-  
    Verstärkung  
Cy3 37, 38  
Cy5 38  
Cystein-reiche Domäne *siehe*  
    Domäne, Cystein-reiche

## D

- Degeneration, Waller'sche 19
- Deletion, transgene 54
- Domäne, Cystein-reiche 23
- Doppelimmunfluoreszenz *siehe*
  - Immunhistochemie,
  - Fluoreszenz-Technik
- Doppelmarkierung *siehe*
  - Immunhistochemie,
  - Fluoreszenz-Technik

## E

- E. coli-Kultur 30
- EAE 32, 75
- Elongation, axonale 19, 23
- endogene Peroxidase *siehe*
  - Peroxidase, endogene
- Enzephalomyelitis, experimentell-
  - allergische *siehe*
  - EAE
- Epineurium 19
- »Exon-3-Knockout 25, 54
- »Exon-4-Knockout 25, 54

## F

- Färbeintensität, Berechnung 42
- Fas 22
- Fazialiskern *siehe* Nucleus facialis
- Fazialisnerv *siehe* Nervus facialis
- Filopodien 19
- FITC 37, 38
- Fluoreszenzimmunhistochemie *sie-*
  - he* Immunhistochemie,
  - Fluoreszenz-Technik
- Foramen stylomastoideum 31, 33
- Formatio reticularis 51
- Freund'sches Adjuvans *siehe*
  - Adjuvans, Freund'sches

## G

- Galanin 18, 45, 47, 58
- Gefrierschnitttechnik 34–35
- Genotypisierung 29
- GFAP 17, 56, 69, 79
- Gliafaserprotein, saures *siehe* GFAP
- »Glial fibrillary acidic protein« *siehe*
  - GFAP
- »Glianarbe« 15, 17, 62
- Glykoprotein, myelinassoziiertes
  - siehe* MAG
- Granulozyten
  - Färbung 44
  - Quantifizierung im Nerv 44
- Growth cone *siehe* Wachstumskegel
- GT1b 75

## H

- Hintergrund, genetischer 26, 29,
  - 71–74
- His-Tag 30

## I

- Iba-1 16
- IFN- $\gamma$  16, 75, 77
- IgG, membranständiges 16
- IL-1 16, 77
- IL-6 16, 76
- Immunhistochemie
  - ABC/DAB-Technik 35–36, 44, 51
  - Fluoreszenz-Technik 36–37, 51, 54
- Immunreaktion, Phasen 15–17, 62,
  - 76–77
- Indokarbocyanin 3 bzw. 5 *siehe* Cy3
  - bzw. Cy5
- Infektion, Bekämpfung 14–15
- Interferon *siehe* IFN
- Interleukin *siehe* IL
- IPTG 30

**K**

Ketamin 33  
 Ketanest® *siehe* Ketamin  
 »Knockout«-Mäuse 25  
 Kobalt-Nickel-Verstärkung 35–36, 41  
 Kobalt-Nickel-Verstärkung 39  
 Komplement-System 16

**L**

LB-Medium 30  
 Lymphozyten  
 – Einwanderung 17, 67  
 – Zählung 44

**M**

MAG 23  
 Makrophagen  
 – Färbung 44  
 – Quantifizierung 44–45  
 »Matching« 26  
 MCSF 16, 76  
 Mean–SD-Algorithmus 41–42, 58  
 MHC Klasse I 16, 17, 64, 77  
 MHC Klasse II 16, 17  
 Mikroglia  
 – Deramifizierung 15  
 – ramifizierte 15  
 mikrogliale Reaktion *siehe*  
     Immunreaktion, Phasen  
 Mikroskopie, konfokale 36, 37–38,  
     51, 54  
 MPB 75  
 Myelin basic protein *siehe* MBP  
 Myelinprotein, basisches *siehe* MBP

**N**

Neomycin-Insertion 25, 29  
 Neomycin-Kassette 25, 29, 30  
 Nervus facialis

– Fixierung des Gewebes 34  
 Neurone  
 – cholinerge 25  
 – thermo- und nozizeptive 25  
 – TrkA-negative 25  
 Neuronenzahl *siehe* Zellzahl,  
     neuronale  
 Neuropeptide 45, 56  
 – Expression im Fazialiskern 58  
 Neurotrophin 3 *siehe* NT3  
 Neurotrophin 4 *siehe* NT4  
 Neurotrophine, Vertreter 21  
 neurotubuläre Basalmembran *siehe*  
     Basalmembran,  
     neurotubuläre  
 NGF 21, 22, 73, 75, 79  
 Nickel-Säule 30  
 NiSO<sub>4</sub> *siehe* Kobalt-Nickel-  
     Verstärkung  
 Nogo 23  
 Nogo-Rezeptor (NgR) 23, 76  
 NT3 21, 22, 79  
 NT4 21, 22, 79  
 Nucleus facialis, Eigenschaften 31–32  
 Nucleus spinalis nervi trigemini 51

**O**

OLV 38–43  
 Optical luminosity value *siehe* OLV  
 OPTIMAS-Software 38, 43  
 OX2 75

**P**

p75<sup>NTR</sup>, Isoformen 23  
 p75<sup>NTR</sup>-Expression  
 – Anstieg nach Axotomie 53  
 – Effekt der Ausschaltung 54  
 – physiologische 51–53  
 – Zeitverlauf nach Axotomie 53

– Zelluläre Kolo­kalisierung 54–56  
PCR, Genotypisierung 29  
Perfusion 34  
Perineurium 19  
Peroxidase, endogene 44  
Phasen der Immunreaktion *siehe*  
    Immunreaktion, Phasen  
p75<sup>NTR</sup>, Spleißvarianten *siehe*  
p75<sup>NTR</sup>, Isoformen  
Polymerase-Kettenreaktion *siehe*  
    PCR, Genotypisierung  
pQE-31-Vektor 30  
Prionen-Proteine 22  
»Prometheus-Effekt« 13  
Proteinase-K-Lysispuffer 29

## R

Rabies-Virus 23  
Ramus auricularis posterior 33  
Ranvier'scher Schnürring *siehe*  
    Schnürring, Ranvierscher  
Reaktion, mikrogliale *siehe*  
    Immunreaktion, Phasen  
Regeneration  
– axonale  
– – Einfluss von p75<sup>NTR</sup> 56–58, 72  
– – experimentelle  
    Untersuchung 45  
– – Grundlagen 19–21  
– funktionelle 13  
– strukturelle 13  
Rezeptor-Tyrosin-Kinasen 22  
Rompun® *siehe* Xylazin

## S

Saccharose-Lösung 34  
Schnürring, Ranvier'scher 21  
Serumproteine 33  
Spleißen, alternatives 23

Spleißvarianten von p75<sup>NTR</sup> *siehe*  
    p75<sup>NTR</sup>, Isoformen  
Stratum moleculare, Kleinhirn 51  
»synaptic stripping« 16

## T

Taq-Polymerase 29  
Texas-Red 37  
TGF-β<sub>1</sub> 16, 76  
Thrombospondin 16  
Tierversuchsnummern 33  
TNF-α 16, 77  
TNF-Rezeptor Superfamilie 22, 23,  
    79  
TR *siehe* Texas-Red  
Tractus spinalis nervi trigemini 51  
Tribromethanol 33  
Trk-Rezeptoren 21–22, 76  
TrkA 22, 25  
TrkB 22  
TrkC 22  
Tumornekrosefaktor *siehe* TNF  
Tumorstadiumsfaktor *siehe* TGF  
Tyramin, biotinyliertes 44

## V

VectaShield® 37  
Vernarbung, gliale 17  
Vorderhirn, basales 25

## W

Wachstumskegel 19, 45  
Waller'sche Degeneration *siehe*  
    Degeneration, Waller'sche

## X

Xylazin 33

## Z

Zelldurchmesser, neuronaler 43

- Zellfläche, neuronale 43
- Zelltod, neuronaler 16, 17, 21, 22, 26,  
33, 56, 58–60, 64, 71, 72, 77,  
79
- Zellzahl, neuronale 58–60
  - Methode der Bestimmung 42–43





# Danksagung

Ich danke Herrn Professor Georg W. Kreutzberg für seine Förderung und Unterstützung, seinen Rat und für die Schaffung von außergewöhnlich positiven Arbeitsbedingungen, sowohl was die technische Ausstattung, als auch was die äußerst angenehme, produktive und trotzdem entspannte Atmosphäre in seiner Abteilung anbelangt.

Bei meinen Mitdoktoranden Matthias Galiano, Christian Kloss, Roger Kalla und Marion Bohatschek möchte ich mich für ihre Kollegialität und Hilfsbereitschaft bedanken. Mein ganz besonders herzlicher Dank gilt Alexander Werner, der viel Zeit damit verbrachte, mich bei meinen ersten Schritten im Labor zu betreuen und mir die Grundlagen der angewandten Arbeitstechniken zu vermitteln.

Für die Bereitstellung des p75-Antikörpers bzw. der transgenen Tiere bedanke ich mich bei Dr. Tim Hucho und Prof. Georg Dechant aus der Abteilung Neurobiochemie. Beiden gilt mein Dank darüber hinaus auch für ihr Interesse an meinem Projekt, ihren fachlichen Rat und ihre freundliche Unterstützung bei vielen Gelegenheiten.

Andreas Koppius danke ich für ihre Hilfe bei der Zucht und Genotypisierung der Tiere, Dietmute Bühringer für Hilfe bei histologischen Färbungen, Dr. James Chalcraft für Unterstützung beim Erstellen der digitalen Abbildungen und ZhiQiang Liu für die Durchführung der neuronalen Zellzählung. Auch allen anderen, nicht namentlich genannten Mitarbeitern der Abteilung Neuromorphologie möchte ich für ihre Hilfsbereitschaft bei unzähligen Gelegenheiten danken.

Schließlich gilt mein ganz besonders herzlicher Dank Herrn PD Dr. Gennadij Raivich, der diese Arbeit mit großer Begeisterung, forscherscher Kreativität und herausragender fachlicher Kompetenz betreute, für mich im Labor zu jedem Zeitpunkt ansprechbar war und dieses Vorhaben durch seine stets gewährte, bei theoretischen *und* praktischen Fragen kompetente Hilfe erst ermöglichte. Vielen Dank für diese Unterstützung.



# Lebenslauf

Name: Andreas Gschwendtner  
geboren am: 2. 12. 1974  
in: München  
Eltern: Gerhard u. Karin Gschwendtner (geb. Dunz)

## Schulbildung:

Herbst 1981 – Sommer 1985: Grundschule I Ottobrunn  
Herbst 1985 – Sommer 1994: Gymnasium Ottobrunn,  
Abitur am 1. 7. 1994

## Zivildienst:

Sommer 1994 – Herbst 1995: Krankenhaus München Neuperlach,  
Abteilung für Röntgendiagnostik und  
Nuklearmedizin

## Studium:

Herbst 1995: Immatrikulation an der  
Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg  
im Studiengang Humanmedizin  
Herbst 1997: Ärztliche Vorprüfung (»Physikum«)  
Herbst 1998: Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
Herbst 1998: Wechsel an die Ludwig-Maximilians-  
Universität München  
Sommer 2000: Teilnahme am Benjamin-Franklin-Contest  
in Berlin für das Team der LMU  
(Ergebnis: 1. Platz)

Herbst 2001: Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
Herbst 2001 – Herbst 2002: Praktisches Jahr:  
1. Innere Medizin  
(München, Krh. Neuperlach)  
2. Chirurgie + Neurochirurgie  
(Auslandstertial an der University of  
Illinois at Chicago mit einem Stipendium  
des DAAD und der »International  
Academy of Lifesciences«)  
3. Neurologie  
(München, Klinikum Großhadern)  
3. Dezember 2002: Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
(Staatsexamen)

**Doktorarbeit:**

Dez. 1998 – Sommer 2001: Doktorand am Max-Planck-Institut  
für Neurobiologie in Martinsried,  
Abt. Neuromorphologie (Prof. Kreuzberg)

**Beruflicher Werdegang:**

Seit Januar 2003: Arzt im Praktikum an der Neurologischen  
Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität  
München, Klinikum Großhadern,  
Arbeitsgruppe Neurogenetik