

Abteilung für Neuromorphologie des Max-Planck-Instituts für Neurobiologie

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

**Mikrogliale Morphologie im verletzten Nervensystem:
Charakterisierung der molekularen Signale**

Roger Kalla

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. F. Fend

Die Dissertation wurde am 14.01.2004 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 22.07.2004 angenommen.

Inhaltsverzeichnis	Seite
1. Einleitung	1
1.1 Die Rolle von Gliazellen im zentralen Nervensystem	1
1.2 Reaktion der Mikroglia	2
1.3 Der axotomierte motorische Fazialiskern der Maus	7
1.3.1 Reaktion der Neurone nach Fazialisaxotomie	9
1.3.2 Degeneration und Regeneration im verletzten peripheren Nerv	10
1.3.3 Aktivierung der Mikroglia nach Fazialisaxotomie	13
1.3.4 Astrozytäre Reaktion	13
1.3.5 Rekrutierung von Lymphozyten	16
1.4 Pro-inflammatorische Zytokine im verletzten ZNS – Rolle für gliale und immunologische Aktivierung	18
1.5 Mikroglia in Zellkultur	19
1.6 Zielsetzung der Arbeit	21
2. Methoden und Materialien	23
2.1 Mikrogliale Antwort im verletzten Nervensystem	23
2.1.1 Tiermodell: Der axotomierte motorische Fazialiskern der Maus	23
2.1.2 Versuchstiere	25
2.1.3 Lichtmikroskopische Histologie	25
2.1.3.1 Gewebeentnahme für lichtmikroskopische Immunhistochemie	25
2.1.3.2 Immunhistochemie mit Diaminobenzidin (DAB)	26

2.1.3.3	Quantifizierung lichtmikroskopischer Immunhistochemie	28
2.1.3.4	Messung der Regenerationsrate im Nervus facialis	29
2.1.3.5	Anfärbung von Granulozyten und Makrophagen im Nervus facialis	29
2.1.4	Fluoreszenz Immunhistochemie	30
2.1.4.1	Immunfluoreszenz-Doppelmarkierungen	30
2.1.4.2	Doppelmarkierungen mit intrinsischem IgG	31
2.1.4.3	Digitalisierung der Fluoreszenz im konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop	33
2.1.4.4	Zelltypspezifische Quantifizierung der Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen	34
2.1.4.5	Autofluoreszenzextraktion im konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop	36
2.1.5	Immunelektronenmikroskopie	37
2.1.5.1	Gewebsentnahme und -behandlung für Immunelektronenmikroskopie	37
2.1.5.2	Immunhistochemie für die Elektronenmikroskopie	38
2.1.6	Quantifizierung der Leukozyten im Nucleus facialis	39
2.1.7	Messung von neuronalem Überleben im Nucleus facialis	39
2.2	Mikroglia in Zellkultur	40
2.2.1	Anlage der Zellkulturen	41
2.2.1.1	Primäre Astrozytenkultur aus der Ratte	41
2.2.1.2	Primäre Mikrogliakultur aus der Maus	42
2.2.1.3	Ramifizierten Mikroglia in Kokultur	43
2.2.1.4	Präparation der Zellmembranen	43
2.2.1.5	Stimulation der Kokulturen mit Zellmembranen	44
2.2.1.6	Stimulation der Kokulturen mit pharmakologisch wirksamen Substanzen	45
2.2.2	Immunzytochemie	45
2.2.2.1	Immunzytochemie mit Diaminobenzidin (DAB)	45
2.2.2.2	Immunzytochemische Fluoreszenz-Doppelmarkierungen	46
2.2.3	Quantifizierung der Deramifikation der Mikroglia	47
2.3	Material	49
2.3.1	Antikörper, Seren, Immunoreagentien	49
2.3.2	Lösungen, Puffer	51
2.3.3	Kulturmedien und -zusätze	53
2.3.4	Chemikalien	54

3. Ergebnisse	55
3.1 MCSF im verletzten Nervensystem	55
3.1.1 Morphologische Veränderungen der Mikroglia bei MCSF-defizienten Tieren	55
3.1.2 Quantitative Veränderungen der mikroglialen Adhäsionsmoleküle und anderer Aktivierungsmarker	60
3.1.3 Zelluläre Lokalisation des MCSF-Rezeptors	64
3.1.4 Rekrutierung von Lymphozyten nach Fazialisaxotomie	66
3.1.5 Neuronale und astrozytäre Antwort nach Fazialisaxotomie	67
3.1.5.1 Entfernung präsynaptischer Endigungen durch Astrozyten	67
3.1.5.2 Neuronales Überleben nach Fazialisaxotomie	69
3.1.6 Axonale Regeneration im axotomierten N. facialis	70
3.2 Interleukin-6 im verletzten Nervensystem	71
3.2.1 Morphologische Veränderungen bei IL6-defizienten Tieren nach Axotomie	71
3.2.2 Quantitative Veränderungen der mikroglialen Aktivierungsmarker	73
3.3 Mikroglia in Zellkultur	76
3.3.1 Wirkung des Zelldebris auf Mikroglia in vitro	76
3.3.1.1 Ruhender Phänotyp: Ramifizierung der Mikroglia	76
3.3.1.2 Effekt von Gehirnzellmembranen der Maus auf ramifizierte Mikroglia-Kokulturen	77
3.3.1.3 Transformierender Effekt von Membranpräparationen aus verschiedenen Geweben	82
3.3.1.4 Aufnahme von fluoreszierenden Gehirnmembranen und Fluorosphere-Latex Beads	84
3.3.2 Wirkung verschiedener pharmakologischer Substanzklassen auf Mikroglia	86
3.3.2.1 Effekte von intrazellulären Stimuli auf ramifizierte Mikroglia in Zellkultur	86
3.3.2.2 Effekte von extrazellulären Stimuli auf ramifizierte Mikroglia in Zellkultur	91

4.	Diskussion	95
4.1	MCSF im verletzten Nervensystem	97
4.1.1	MCSF und der Prozess der mikroglialen Aktivierung	97
4.1.2	Mikrogliale Aktivierung und neuronales Überleben	100
4.1.3	Zelluläre Antwort im verletzten Nervensystem	104
4.2	Interleukin-6 im verletzten Nervensystem	107
4.2.1	Interleukin-6 und der Prozess der mikroglialen Aktivierung	108
4.3	Transformation der Mikroglia in Phagozyten: Rolle des Zelldebris	110
4.3.1	Wirkung von Zellmembranen auf ramifizierte Mikroglia-Kokulturen	111
4.3.2	Pharmakologie der mikroglialen Transformation	115
4.3.2.1	Effekte von intrazellulären Stimuli auf ramifizierte Mikroglia in Zellkultur	116
4.3.2.2	Effekte von extrazellulären Stimuli auf ramifizierte Mikroglia in Zellkultur	119
5.	Zusammenfassung	123
6.	Literaturverzeichnis	125
7.	Abkürzungen	136
8.	Danksagung	139
9.	Lebenslauf	140
10.	Veröffentlichungen	142

1. Einleitung

1.1 Die Rolle von Gliazellen im zentralen Nervensystem

Im zentralen Nervensystem (ZNS) sind die Nervenzellen die Träger der spezifischen Funktion der Informationsverarbeitung. Hierbei sind die Neurone auf die Intaktheit der sie umgebenden Gliazellen, Astrozyten, Oligodendrozyten und Mikroglia angewiesen. Unter physiologischen Bedingungen erfüllen diese verschiedenen Gliazellen eine Reihe von zentralen Funktionen: die Konstant-Haltung des inneren Milieus und die Beteiligung an der Blut-Hirn-Schranke (BBB) mit dem selektiven Austausch von Nähr- und Schadstoffen (Astrozyten; Janzer und Raff, 1987; Tsacopoulos und Magistretti, 1996), die elektrische Isolierung der Axone des ZNS durch Markscheiden (Oligodendrozyten; Jacobson, 1991) und als Teil des intrinsischen Abwehrsystems des ZNS die Immunüberwachung (Mikroglia; Kreutzberg, 1996; Raivich et al., 1999a).

Zahlreiche Studien der letzten Jahre deuten auf eine funktionelle Mitbeteiligung der Neuroglia bei verschiedensten Formen von Hirnerkrankung hin: bei direktem oder indirektem Trauma, bei der Entstehung von hirneigenen Tumoren, bei den infektiösen und autoimmunen Entzündungen sowie bei ischämischen und degenerativen Erkrankungen des ZNS (Streit et al., 1988; Eddleston und Mucke, 1993; Norenberg, 1994; Perry et al., 1995). Interessanterweise führen sehr unterschiedliche Schädigungsmechanismen zu einer recht stereotypen zellulären Reaktion der beteiligten Gliazellen (Kreutzberg, 1996; Raivich et al., 1999), mit Produktion von proinflammatorischen Zytokinen, Veränderungen des Gefäßendothels und Rekrutierung von Immunzellen zur Seite der Läsion (Raivich et al., 1998).

Diese nichtneuronalen Veränderungen deuten auf eine wichtige Rolle der Gliazellen und des Immunsystems für den Schutz vor Pathogenen des Nervensystems hin (Raivich et al., 1999). Auf der anderen Seite sind die gleichen glialen Reaktionen auch wichtig für die eingeschränkte Regenerationskapazität des ZNS (Liuzzi und Lasek, 1987; Schwab und

Caroni, 1988, Müller und Stoll, 1998). Insgesamt weist diese einheitliche Reaktion der Gliazellen auf ein stark konserviertes Programm hin, dem eine wichtige Rolle bei Schutz und Regeneration des verletzten Nervensystems zukommt (Kreutzberg, 1996). Das bessere Verständnis der damit einhergehenden eingeschränkten Regenerationsfähigkeit wird zu einer rationalen Basis für die gezielte therapeutische Intervention bei Schädigungen des Nervensystems führen.

1.2 Reaktion der Mikroglia

Die Mikrogliazellen, welche ca. 10-20% der gesamten Neuroglia ausmachen, sind funktionell mit dem peripheren Makrophagen-Monozyten-System verwandt. Sie wurden Anfang des letzten Jahrhunderts erstmals von Pio del Rio-Hortega beschrieben, der 1919 eine auf Silbercarbonat basierende Färbemethode für Gewebeschnitte entwickelt hatte, mit welcher sich die mikroglialen Zellen von den übrigen im Gehirn vorkommenden Zellen unterscheiden ließen (del Rio-Hortega, 1919; del Rio-Hortega, 1932). Er erkannte ihre Mitbeteiligung bei Verletzungen des ZNS, und beschrieb ihre Abstammung von peripheren Monozyten, die während der Embryonalentwicklung Zugang zum Gehirnparenchym erhalten. Obwohl es in der Folgezeit einige Diskussion über die Abstammung der Mikroglia gab, wird heute allgemein angenommen, dass sie von peripheren Monozyten abstammen, die während der Embryonalentwicklung durch die offene BBB in das Parenchym einwandern und dort sesshaft werden (Eglitis und Mezey, 1994; Hickey et al., 1992; Ling und Wong, 1993; Kurz und Christ, 1998).

In ihrer neuen Umgebung nimmt die Mikroglia eine verästelte (ramifizierte) Form an und verteilt sich nicht-überlappend im Parenchym (Kreutzberg et al., 1996). Die Verteilung erfolgt heterogen, mit einem höheren Anteil in der grauen Substanz als in der weißen Substanz (Lawson et al., 1992). Im normalen Gehirn zeigt die Mikroglia in der grauen Substanz eine stellare Morphologie, mit welcher die Zellen ein Volumen von 30-40 µm Durchmesser

abdecken, wohingegen in der weißen Substanz eine Orientierung entlang des Verlaufes der Nervenfasern erfolgt (Compston et al., 1997). Entsprechend der Funktion des peripheren Makrophagen-Monozyten-System in anderen Geweben scheint die Mikroglia im ZNS an der Immunüberwachung beteiligt zu sein. Hierfür werden von ihr konstitutiv Rezeptoren für den Fc-Teil von γ -Immunglobulinen (IgG) und der Komplement-Rezeptor 3 (CR3) exprimiert (Graeber et al., 1988; Fishmann und Savitt, 1989; Liu et al., 1995; Peress et al., 1993; Werner et al., 1998).

Die ruhende Mikroglia kann jedoch im Rahmen von Schädigungen des Gehirnparenchyms schnell in einen aktivierten Zustand transformiert werden (Nissl, 1894; Merzbacher, 1909; del Rio-Hortega, 1932; Kreutzberg, 1996; Raivich et al., 1999; Kreutzberg 2000). Dies führt morphologisch zu einem Anschwellen des Zellkörpers, einer Verdickung der proximalen Fortsätze und einer Abnahme der distalen Ramifizierung (Abbildung 1C, Seite 8). Wenn es im Rahmen des Traumas zu einer Schädigung der BBB kommt, dann lässt sich ein Kräuseln der mikroglialen Membranoberfläche beobachten, welches auf ein exploratives Verhalten bezüglich ihrer Zellumgebung hindeutet. Auf molekularer Ebene verläuft die Aktivierung über verschiedene Stadien, welche mit einer veränderten Regulation von Oberflächen- und Zytoskelettproteinen einhergehen (Tabelle 1; Seite 5).

Die frühe Aktivierung der Mikroglia (Phase 1; Abbildung 1C) innerhalb der ersten 24 Stunden nach Trauma geht mit einer Zunahme der Immunreaktivität für verschiedene Immunmoleküle einher. So wird die Expression von IgG, Thrombospondin (TSP), dem InterCellular Adhesion Molecule 1 (ICAM1) und seinem Rezeptor, dem Integrin α M β 2 (auch bekannt als MAC-1 oder Complement Receptor type 3/CR3), erhöht (Graeber et al., 1988b; Möller et al, 1996; Raivich et al., 1998a; Werner et al., 1998). Die vermehrte Expression mikroglialer Adhäsionsmoleküle ermöglicht es, den Kontakt zu verschiedenen Immunzellen des Blutes, wie z.B. Granulozyten, Leukozyten, Makrophagen und Lymphozyten, herzustellen (Hynes et al., 1992).

Die zweite Phase der Aktivierung der Mikroglia ist durch die Zielfindung und Adhäsion an verletzte Neurone gekennzeichnet. Hiermit gehen eine Zunahme des im Zytoskelett vorkommenden Proteins Vimentins und eine weitere Abnahme der Ramifizierung einher (Graeber et al., 1988c, Raivich et al., 1993), welche offensichtlich zu einer Mobilitätssteigerung der Mikroglia nach Verletzung führt (Angelov et al., 1995). Dies ermöglicht nun den direkten Kontakt mit den verletzten Neuronen, wo sie die präsynaptischen Axonendigungen entfernen, ein Phänomen, das als „synaptic stripping“ bezeichnet wird (Blinzinger und Kreutzberg, 1968). Des Weiteren kommt es zu einer Zunahme der Expression der Rezeptoren für den Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktor (MCSF) und den Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktor (GMCSF), was zu einer Zunahme der Proliferation beiträgt (Raivich et al., 1991, 1998b). Die mitotische Aktivität der Mikroglia ist 2-3 Tage nach Axotomie maximal und führt zu einer 4- bis 6-fachen Zunahme ihrer Zellzahl (Raivich et al., 1994) sowie einer damit einhergehenden Zunahme der Oberflächenproteine MHC1 und B7.2, die bei der Antigenpräsentation eine wichtige Rolle spielen (Streit et al., 1989; Raivich et al., 1993, Bohatschek et al., 1998). Der direkte Zellkontakt zwischen axotomierten Neuronen und Mikroglia trägt mitunter zur Aufnahme von verschiedenen, durch die teilweise undichte neuronale Membran freigesetzten Molekülen bei, die den infiltrierenden Lymphozyten präsentiert werden können. Im weiteren Verlauf kann die Mikroglia in ihren ursprünglichen ramifizierten Ruhezustand zurückkehren (Phase 0`), sofern keine weitere Schädigung der Neurone mit konsekutivem Zelldebris entstanden ist. Falls es jedoch im geschädigten Parenchym zu neuronalem Zelltod kommt, erfolgt eine weitere Transformation der mikroglialen Zellen in Phagozyten (Phase 3a; Abb. 1C), die das entstehende neuronale Debris und assoziierte Myelin abräumen (Möller et al., 1996; Streit et al., 1988a). Dies führt häufig zur Ausbildung von so genannten mikroglialen Knötchen, bestehend aus 3-20 Phagozyten, die sich im Bereich der verbleibenden zellulären Strukturen großer Motoneurone bilden (Streit et al., 1988b). In diesem Stadium kommt es zu einem massiven Anstieg der Aktivierungsmarker der Phase 1

und 2, wobei auch zahlreiche Adhäsionsmoleküle wie z.B. $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$, $\alpha M\beta 2$, TSP und ICAM1 vermehrt exprimiert werden (Kloss et al., 1999; Werner et al., 1998). Zusätzlich steigt die Expression der Immunmoleküle B7.2, MHC1 und des Fc γ -Rezeptor auf den Phagozyten (Bohatschek et al., 1998; De Simone et al., 1995; McGeer et al., 1993). Auf den Mikrogliazellen der weißen Substanz kann außerdem eine starke Expression von MHC2 beobachtet werden (McGeer et al., 1992). Über diese Moleküle erfolgt die Interaktion mit den ins ZNS einwandernden Lymphozyten im Bereich der mikroglialen Knötchen (Raivich et al., 1998a), wodurch eine Immunantwort im geschädigten Parenchym stattfinden kann (Tab.1). Im Rahmen der Phagozytose von neuronalem Debris kommt es gleichzeitig zu einer Mitreaktion der umliegenden nicht-phagozytotischen Mikroglia (Phase 3b). Diese scheint durch die Induktion von proinflammatorischen Zytokinen wie Interleukin-1 (IL1) oder Tumornekrosefaktor- α (TNF α) während der Phagozytose bedingt zu sein (Raivich et al., 1999b). Es findet sich eine Zunahme der Immunreaktivität für MHC1, B7.2, $\alpha 4\beta 1$ und $\alpha M\beta 2$ auf den in der näheren Umgebung von Knötchen befindlichen Zellen (Bohatschek et al., 1998; Kloss et al., 1999; Raivich et al., 1998a).

Tabelle 1: Phasen-spezifische Expression mikroglialer Aktivierungsmarker

	Stadium	Marker (Maus)
Phase 0	Normales Gehirn	Fc γ R, IgG, $\alpha M\beta 2$
Phase 1	Alarm	IgG \uparrow , $\alpha M\beta 2\uparrow$, ICAM1 \uparrow
Phase 2	Zielfindung/ Adhäsion	MCSFR \uparrow , $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$, MHC1 \uparrow , B7.2 \uparrow
Phase 3a	Phagozytose	MHC1 \uparrow , $\alpha 5\beta 1\uparrow$, $\alpha 6\beta 1\uparrow$, $\alpha M\beta 2\uparrow$, IgG \uparrow , B7.2 \uparrow , ICAM1 \uparrow
Phase 3b	Umgebungsaktivierung	MHC1 \uparrow , B7.2 \uparrow , ICAM1 \uparrow , $\alpha M\beta 2\uparrow$, $\alpha 4\beta 1$
Phase 0-3	Immunantwort	MHC2\uparrow, iNOS\uparrow

Modifiziert nach Raivich et al., 1999

Im Falle von MHC1 erstreckt sich diese Umgebungsaktivierung auf einen Durchmesser von 60-100 μm um ein zentrales Gliaknötchen.

Diese graduelle Aktivierung der Mikroglia (Phase 1-3b) findet sich auch bei floriden viralen, bakteriellen, parasitären oder autoimmun bedingten Entzündungen des ZNS. Im Vergleich zu den nicht immunogen bedingten Verletzungen des Gehirnparenchyms findet sich hier ein besonders starker Anstieg von MHC2 und der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) auf der aktivierten Mikroglia. Diese Induktion scheint auf eine vermehrte Infiltration von Lymphozyten zurückzugehen, die insbesondere eine gesteigerte Ausschüttung von Interferon-gamma ($\text{IFN}\gamma$) bedingen (Schluter et al., 1998) sowie zur Bildung von zytotoxischen Peroxynitrit, einem Produkt aus Stickstoffmonoxid (NO) und Hydroxyradikalen, führen.

Zusammenfassend lassen sich die Veränderungen der mikroglialen Morphologie nach Verletzungen des ZNS wie folgt beschreiben:

- Innerhalb der ersten 24 Stunden nach Trauma (Phase 1) kommt es zu einer Abnahme der distalen Verästelung.
- Die weitergehende mikrogliale Aktivierung ist durch die Zielfindung und Adhäsion an verletzte Neurone gekennzeichnet (Phase 2), der Entfernung von präsynaptischen Axonendigungen („synaptic stripping“) und einer weiteren Abnahme der Ramifizierung. Dabei kommt es zum Anschwellen des Zellkörpers und einer Verdickung der proximalen Zellfortsätze.
- Mit dem Auftreten von neuronalem Zelldebris erfolgt die Transformation der Mikroglia in vollständig deramifizierte Phagozyten (Phase 3a) und die Aktivierung der benachbarten, nicht-phagozytotischen mikroglialen Zellen (Phase 3b).

Die verschiedenen Phasen gehen mit einer Vielzahl an unterschiedlich regulierten proinflammatorischen Zytokinen und molekularen Signalen einher (siehe unten), die je nach Grad und Muster der Schädigung in unterschiedlichem Maße auftreten. Bisher ist jedoch unklar, welche Signale für die morphologische Transformation der Mikrogliazellen in Phagozyten zuständig sind.

1.3 Der axotomierte motorische Fazialiskern der Maus

Das von Kreutzberg und Mitarbeitern entwickelte Modell der Axotomie des Nervus facialis eignet sich insbesondere zur Untersuchung der zentralen Reaktionsmechanismen nach Verletzung des Nervensystems (Kreutzberg, 1966; Kreutzberg and Raivich, 1997; Streit, 2002). In diesem Modell führt die periphere Durchtrennung des siebten Hirnnervs, unmittelbar nach Austritt aus dem Foramen stylomastoideum, zu einer wohl definierten, stereotypen Reaktion der im betroffenen motorischen Kerngebiet befindlichen Gliazellen, ohne die Intaktheit der BBB zu beeinflussen. Anders als bei vielen anderen neuropathologischen Erkrankungsmodellen kommt es hier nicht zu einer Einwanderung von Granulozyten oder Makrophagen, die mit endogenen aktivierten Mikrogliazellen verwechselt werden könnten (Streit et al., 1988; Bohatschek et al., 2001; Fluegel et al., 2001). Da es sich beim N. facialis um einen peripheren regenerationsfähigen Nerv handelt, kann man die Geschwindigkeit der axonalen Regeneration messen und in Beziehung zur glialen Aktivierung setzen. Daneben kommt es in diesem Modell zu einer späten Form des neuronalen Zelltodes im betroffenen Kerngebiet (Raivich et al., 1998a; 2002), der möglicherweise auch durch die Aktivierung der Gliazellen und die daran beteiligten molekularen Signale beeinflusst wird.

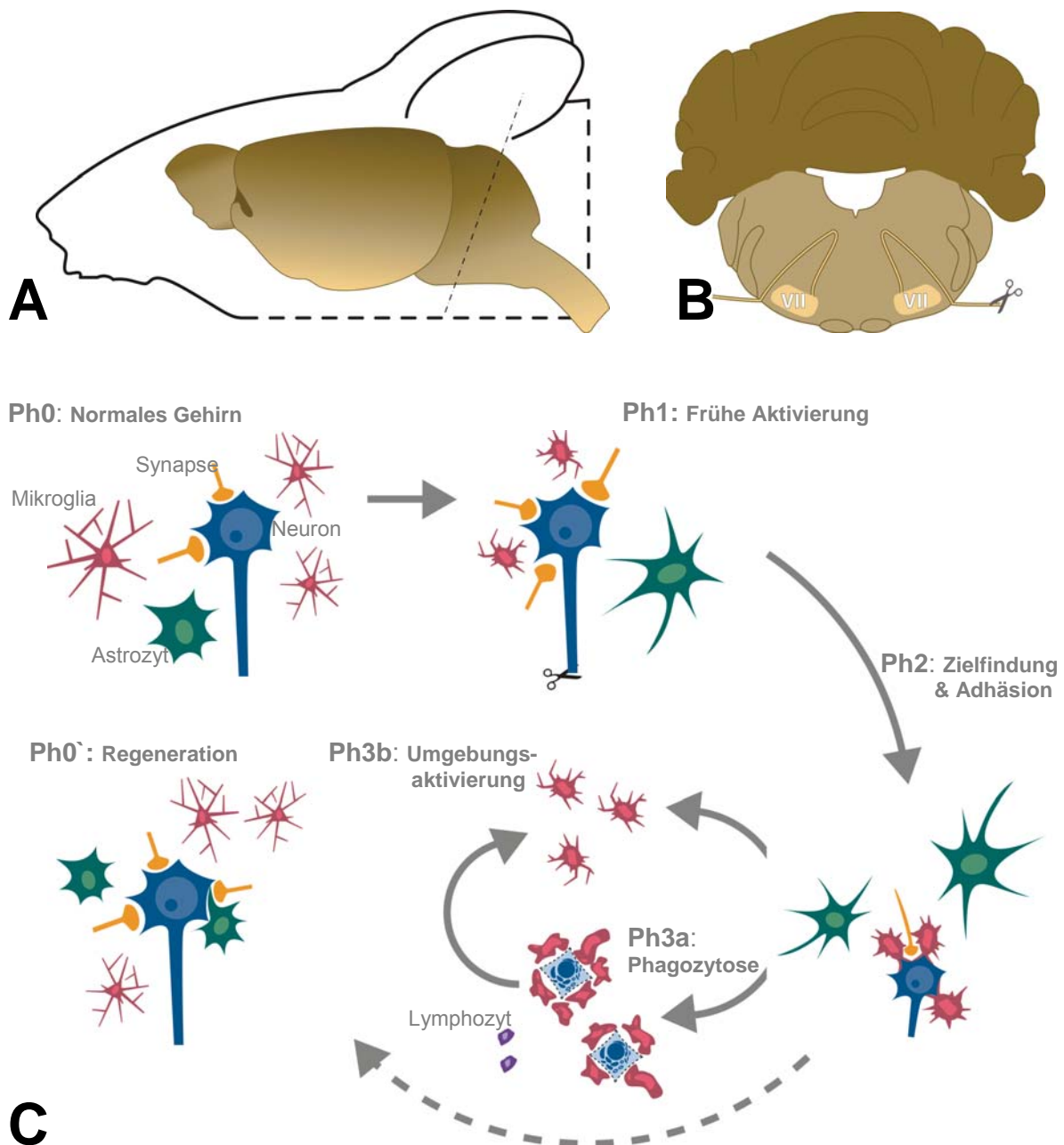


ABBILDUNG 1. Axotomie des Nervus facialis und nukleäre Reaktionsmechanismen. **A.** Übersicht des Läsionsmodells: **B.** Der N. facialis wird kurz nach seinem Austritt aus dem Foramen stylomastoideum komplett durchtrennt. **C.** Schema der zellulären Veränderungen im Ncl. facialis nach Axotomie: **Ph0.** Im normalen Hirnstamm ist die Oberfläche der Neurone mit Synapsen besetzt. Es finden sich Mikroglia (M) mit zahlreichen schlanken Fortsätzen und distaler Ramifikation (Phase 0: normales Gehirn) sowie im Parenchym verteilte protoplasmatische Astrozyten (A). **Ph1/Ph2.** Nach der Axotomie kommt es zu retrograden Veränderungen im zugehörigen Kerngebiet. In der Frühphase proliferiert die aktivierte Mikroglia, die Fortsätze verplumpen (Ph1, Phase 1: Alarm) und im Rahmen der Adhäsion an die neuronalen Zellkörper (Phase 2: Adhäsion) werden zahlreiche präsynaptische Endigungen entfernt (Ph2, „synaptic stripping“). Ohne zusätzlichen Zellschaden erfolgt eine teilweise Rücktransformation der Mikrogliazellen in den Ruhezustand. **Ph3a/b.** Der Untergang von verletzten Motoneuronen führt zur Ausbildung von mikroglialen Knötchen mit Transformation in phagozytische Zellen (Phase 3a: Phagozytose) und der Rekrutierung von Lymphozyten (L) aus dem peripheren Blut. Zusätzlich kommt es zu einer Aktivierung der umgebenden, nicht-phagozytischen Mikroglia (Phase 3b: Umgebungsaktivierung). **Ph4.** Rückkehr der Mikroglia in ihren ursprünglichen ramifizierten Ruhezustand. Modifiziert nach Raivich, 1999.

1.3.1 Reaktion der Neurone nach Fazialisaxotomie

Die Durchtrennung des N. facialis führt zur Wallerschen Degeneration des distalen Teils des Axons mit Abbau des Axons und assoziierten Myelins durch die umgebenden Schwannschen Zellen innerhalb der ersten Tage nach Trauma (Stoll et al., 1989; Carroll et al., 1997). Gleichzeitig führt die Axotomie zu einer retrograden Reaktion im axotomierten Fazialiskern mit Anschwellen der neuronalen Zellkörper, exzentrischer Verlagerung des Nukleolus und Zerfall der Nissl-Substanz (Nissl, 1894; Kreutzberg, 1995). Mit diesen morphologischen Veränderungen gehen eine veränderte Proteinsynthese sowie Nährstoffaufnahme der Neurone einher (Grafstein und McQuarrie, 1978; Tetzlaff et al., 1988; Graeber et al., 1989; Kreutzberg et al., 1990; Kreutzberg, 1995).

Auf molekularer Ebene steigt in der Frühphase nach neuronaler Schädigung das Enzym Ornithindecaboxylase an (Gilad und Gilad, 1983; Tetzlaff und Kreutzberg, 1985). Die damit einhergehende Zunahme der Polyaminproduktion, als Ausdruck einer unspezifischen zellulären Stressreaktion, trägt mitunter zur veränderten Genregulation bei (Paschen, 1992; Seiler, 2000). „Immediate early genes“ und nukleäre Transkriptionsfaktoren wie c-jun, junB, junD und TIS11 werden ebenfalls hochreguliert und sind vermutlich an der veränderten Genregulation mitbeteiligt (Jenkins und Hunt, 1991; Herdegen et al., 1991; Haas et al., 1993; Schwaiger et al., 1999). Des Weiteren kommt es zu einer vermehrten Synthese von strukturerhaltenden Proteinen, wie z.B. GAP-43, einem bereits in der Embryonalphase aufgetretenen Wachstumsprotein (Skene, 1989; Saika et al., 1993; Palacios et al., 1994), sowie einer Abnahme der für den neuronalen Informationsfluss benötigten postsynaptischen Proteine (Kreutzberg et al., 1984; Nakayama et al., 1995).

Darüber hinaus steigt in den axotomierten Neuronen die Konzentration von Zytokinen, Wachstumsfaktoren und ihren Rezeptoren wie IL6 (Kiefer et al., 1993; Klein et al., 1997; Murphy et al., 1999a), PDGF (Hermanson et al., 1995), Transferrin-Rezeptor (Graeber et al., 1989) und p75^{NTR} Rezeptor (Gschwendtner et al., 2003). Daneben kommt es auch zu einer vermehrten Synthese von neuroaktiven Peptiden wie „calcitonin gen-related peptide“

(CGRP), Galanin, „vasoactive intestinal peptide“ (VIP) (Raivich et al., 1995) und Stickstoffmonoxid-synthetisierende NADPH-Diaphorase (Kreutzberg, 1963; Yu, 1994). Diese Signalmoleküle ermöglichen es den verletzten Neuronen mit ihrer zellulären Umgebung zu interagieren. Zudem verändern die Neurone ihre Zelladhäsionseigenschaften, indem z.B. CD44 und das extrazelluläre Matrixprotein TSP vermehrt exprimiert werden (Möller et al., 1996; Jones et al., 1997). Die so veränderten Adhäsionseigenschaften der Neurone führen zu einer Beeinflussung der Anhaftung benachbarter Zellen. Nach Fazialisaxotomie kommt es während der zweiten bis vierten Woche nach Verletzung zum Zelltod von etwa einem Drittel der betroffenen Neurone, während die erfolgreich regenerierten Zellen ihre Zielmuskeln reinnervieren (Sinatra und Ford, 1979; Guntinas-Lichius et al., 1996; Ferri et al., 1998). Die komplexen zellulären Mechanismen, welche letztendlich die Regenerationsfähigkeit von verletzten Neuronen bestimmen, sind allerdings nicht ausreichend bekannt (Yu, 1989; Fawcett et al., 1998; Baumgartner und Shine, 1998; Angelov et al., 1998).

1.3.2 Degeneration und Regeneration im verletzten peripheren Nerv

Im peripheren Nervensystem (PNS) führt die Durchtrennung eines Axons in der Regel zum Wiederauswachsen der verletzten Nervenbündel (Abb. 2, Seite 12). Im distalen Teil des Axons führt die Unterbrechung des Axons zur Wallerschen Degeneration (WLD), welche sowohl für die entzündlichen als auch regenerativen Veränderungen im distalen Nervenstumpf eine wichtige Rolle spielt (Griffin et al., 1996).

Die Degeneration der Axone und des assoziierten Myelins geht mit einer Rekrutierung von zirkulierenden Leukozyten, neutrophilen Granulozyten und Makrophagen aus dem Blut zur Seite der Läsionsstelle einher (Powell et al., 1980; Frisen et al., 1993). Die Invasion dieser immunkompetenten Zellen erfolgt über chemotaktische Peptide und verschiedene Adhäsionsmoleküle (Übersicht in Springer, 1994). So konnte mit Hilfe von genetisch defizienten ICAM-1 Mäusen eine deutliche Reduktion in der Invasion von Makrophagen und Granulozyten in das geschädigte PNS beobachtet werden (Vougioukas et al., 1998).

Insbesondere die hämatopoetischen Makrophagen scheinen eine besonders wichtige Rolle im Rahmen der WLD zu spielen (Dailey et al., 1998). So entfernen sie das anfallende Zelldebris und produzieren eine Vielzahl von Zytokinen wie z.B. IL1, IL6; TGF β , TNF α und den von Thrombozyten gebildeten Wachstumsfaktor (PDGF), die sowohl Schwannsche Zellen als auch die umliegenden Fibroblasten zur Proliferation stimulieren (Lindholm et al., 1987; Raivich und Kreutzberg, 1993; Kiefer et al., 1995; Wagner und Meyers, 1996). In der WLD-Mausmutante mit verlangsamter WLD kann man eine Abnahme in der Geschwindigkeit der Axonregeneration im peripheren Nerv beobachten (Martini und Schacher, 1988; Brown et al., 1994), was die funktionelle Bedeutung der Entfernung des Zelldebris durch Schwannsche Zellen (Stoll et al., 1989; Carroll et al., 1997) und hämatopoetische Makrophagen bei der Regeneration im PNS unterstreicht (Beuche und Friede, 1984; Brück et al., 1996; Dailey et al., 1998).

Proximal zur Läsion erfolgt eine vermehrte Synthese von zahlreichen Zellbestandteilen, wie z.B. Organellen, Signalmoleküle, Vesikel, Membrane und Zytoskelettkomponenten, mit deren Hilfe der distale Teil ersetzt werden soll (Grafstein und McQuarrie, 1978; Barron, 1983; Kreutzberg, 1995). Innerhalb von drei Tagen führen die im Zellkörper neu synthetisierten Moleküle über den verstärkten axonalen Transport zu einem Anschwellen der betroffenen axonalen Endigungen (Skene, 1986; Bisby et al., 1995). Hier kommt es durch die gleichzeitige Akkumulation von Adhäsionsmolekülen, Rezeptoren, Tyrosinkinase, NO-Synthasen und zahlreichen Neuropeptiden zur Ausbildung eines Wachstumskegels (Kreutzberg et al., 1963; Maness et al., 1990; Raivich et al., 1992; Martini, 1994; Raivich et al., 1995). Dieser ist in der Lage, die extrazellulären Signale zu lesen und die Richtung des auswachsenden Axons zu bestimmen (Kater und Rehder 1995; Aubert et al., 1995), wobei die Richtung des Auswachsens über sehr feine Fortsätze (Filopodien) an der Axonspitze gesteuert wird (Übersichten in Cajal, 1928; Bisby, 1995; Kreutzberg und Raivich, 1999). Der Kontakt der Filopodien mit einem günstigen Substrat seiner Umgebung führt zur Adhäsion zwischen extrazellulären Substratbestandteilen, ihren neuronalen Rezeptoren und Strukturen

des Zytoskeletts. Auf diese Weise kommt es zum Auswachsen des Wachstumskegels in die gleiche Richtung, wobei die weniger erfolgreichen Filopodien kollabieren.

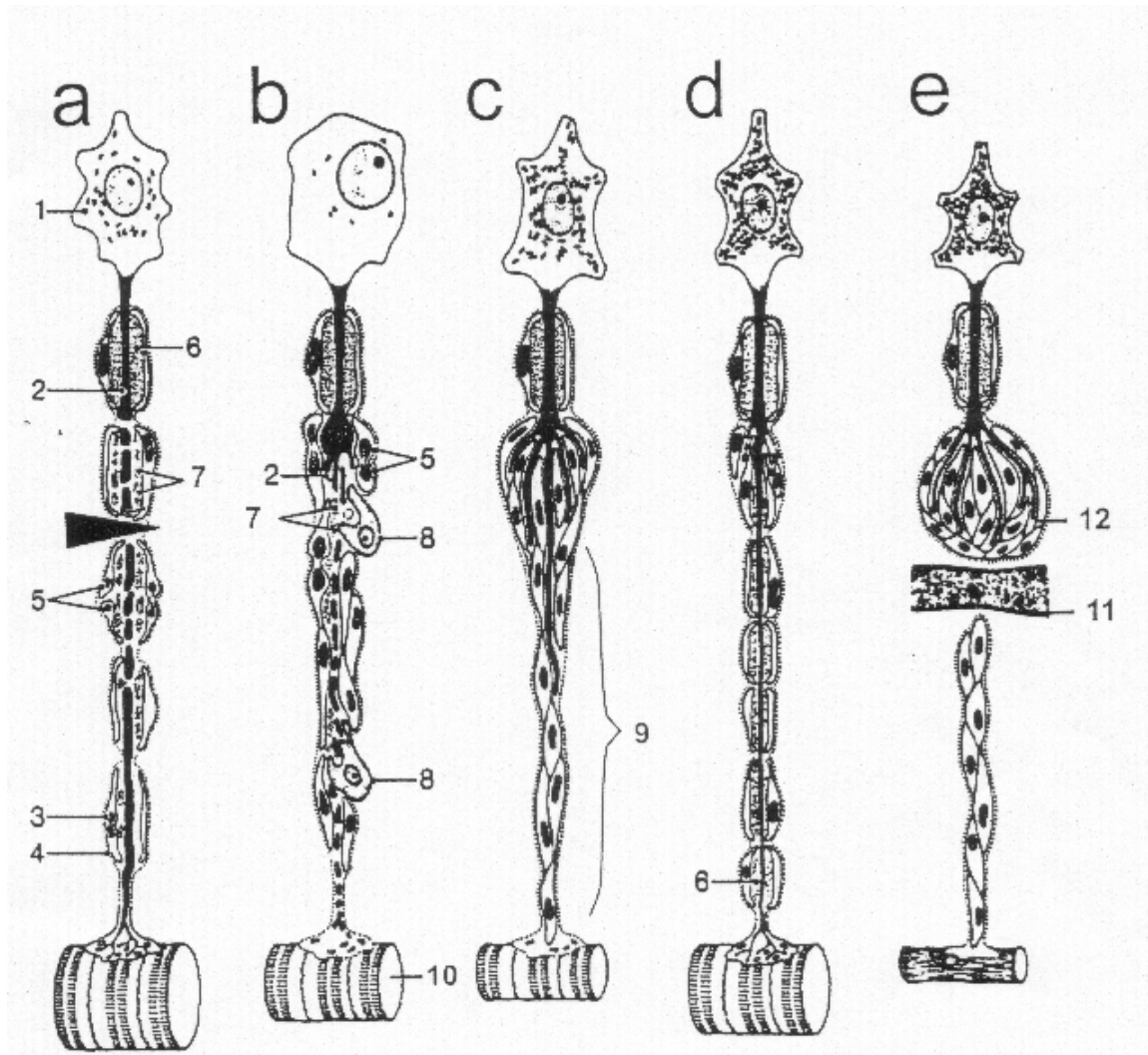


ABBILDUNG 2. Degeneration und Regeneration im verletzten peripheren Nerv nach Durchtrennung einer motorischen Nervenfasers. Durchtrennung des Axons führt zur Wallerschen Degeneration des distalen Teils des Nerv (a). Im proximalen Stumpf, wo im geschädigten Markscheidensegment das Axon und assoziierte Myelin zerfallen, bilden sich innerhalb von 3 Tagen nach dem Trauma Wachstumskegel aus (b), während im distalen Teil unmyelinisierte Schwannsche Zellen und rekrutierte Makrophagen die Axon- und Myelinabbauprodukte entfernen. Im distalen Teil formieren sich proliferierende Schwannsche Zellen zu Büngnerschen Bändern, die den auswachsenden Axonsprossen als Leitschiene auf ihrem Weg zum peripheren Gewebe dienen (c). Die Reinnervation des Zielorgans und die Remyelinisierung führen zur Wiederaufnahme der physiologischen Funktion des Nerv (d). Wird das axonale Auswachsen durch Hindernisse, wie z.B. eine Narbe, verhindert, kommt es im proximalen Stumpf durch Schwanzzell- und Fibroblastenwucherung zur Ausbildung eines sogenannten Amputationsneuroms (e). Das distale Büngnersche Band kann über Jahre erhalten bleiben (e). 1. Zellkörper; 2. Axon, Wachstumskegel; 3. Schwannsche Zelle; 4. Basalmembran der Schwannschen Zelle; 5. Schwanzzell-Proliferation; 6. Markscheide; 7. Myelindebris; 8. Makrophagen; 9. Büngnersche Bänder aus proliferierenden Schwannschen Zellen; 10. Muskelfaser; 11. Bindegewebsnarbe; 12. Amputationsneurom. Modifiziert nach Mumenthaler, 1993.

1.3.3 Aktiveringung der Mikroglia nach Fazialisaxotomie

Wenige Stunden nach der operativen Durchtrennung des Nervs kommt es nicht nur zu neuronalen Veränderungen, sondern auch zu einer Rekrutierung von Lymphozyten und einer deutlichen, frühen Aktivierung von Astrozyten und Mikroglia im entsprechenden Nucleus facialis (Phase 1) mit den in Abschnitt 2 für die Mikroglia beschriebenen molekularen Veränderungen. Bereits 48 Stunden nach Axotomie beginnt die Mikroglia zu proliferieren (Kreutzberg 1966; Graeber et al., 1988), adhärirt an die geschädigten neuronalen Zellkörper (Phase 2) und reduziert auf diese Weise den synaptischen Input der Motoneurone durch Besetzung perineuronaler Positionen („synaptic stripping“, Blinzinger und Kreuzberg, 1968). Die mit der mikroglialen Adhäsion assoziierte Entfernung des synaptischen Inputs führt zu einer elektrischen Isolierung der betroffenen Neurone (Lux und Schubert, 1975).

Der Untergang von ca. 30% der Neuronen, mit einem Höhepunkt 2 Wochen nach Nervenverletzung, bewirkt die Ausbildung von Gliaknötchen um das Debris der betroffenen Neurone (Phase 3a), gefolgt von der Phagozytose der neuronalen Bruchstücke (Möller et al., 1996), der Aktivierung der benachbarten, nicht-phagozytotischen Mikroglia und Rekrutierung von Lymphozyten aus dem peripheren Blut (Raivich et al., 1998a). Interessanterweise kann der größere Teil der verletzten Neurone in der Maus (70%) und in der Ratte (100%) überleben und erfolgreich regenerieren (Werner et al., 2000). Bei diesen Neuronen werden in einer späten Reaktion die aktivierten Mikrogliazellen von Astrozyten verdrängt, die nun die Oberfläche der Neurone mit mehreren feinen Zellausläufern umschlingen (Graeber und Kreutzberg, 1988). Eine schematische Zusammenfassung dieser nichtneuronalen Veränderungen im Ncl. facialis ist in Abbildung 1 dargestellt.

1.3.4 Astrozytäre Reaktion

Die Astrozyten stellen zahlenmäßig die häufigste Zellart im ZNS dar (Eddleston und Mucke, 1993), welche aus dem Neuralrohr hervorgehen und ein wichtiges Versorgungswerk im ZNS

bilden (Abb. 3C, Seite 15). Aufgrund einer Vielzahl von Rezeptoren für Neurotransmitter, Neuropeptide und Neurotrophine (Murphy und Pearce, 1987; McKeon et al., 1997) sind Astrozyten in der Lage, auf Veränderungen in ihrer zellulären Umgebung zu reagieren. Zum anderen regulieren Astrozyten die sie umgebenden Zellen aktiv, indem sie zur Ausbildung von sogenannten tight junctions (engl. = enge Verbindung) zwischen den benachbarten Endothelzellen beitragen (Tao-Cheng et al., 1987), einen ramifizierten Phänotyp der Mikroglia induzieren (Kloss et al., 1997) und insbesondere nach Trauma des ZNS zahlreiche trophische Faktoren (NGF, CNTF, IGF-1, TGF α) für die benachbarten Neurone und Oligodendrozyten ausschütten (Eddleston und Mücke., 1993; Ridet et al., 1997). Im gesunden Gehirn kommen Astrozyten in zwei Hauptformen vor: fibrillär und protoplasmatisch. Letztere finden sich fast ausschließlich in der grauen Substanz rund um Nervenzellkörper, Dendriten und Synapsen, sind schwach positiv für das saure Gliafaserprotein (englisch „glial fibrillary acidic protein“= GFAP) und haben viele kurze Zellfortsätze mit breitflächigen, flappigen Membranverzweigungen. Die Membrankontur der protoplasmatischen Astrozyten lässt sich immunhistochemisch nicht vollständig darstellen. Mit den Markern S100b und der endothelialen Stickstoffmonoxidsynthase (eNOS) können lediglich die proximalen Verzweigungen dargestellt werden (Cammer und Tansey, 1988; Gabott und Bacon, 1996; Didier et al. 2000). Die fibrillären Astrozyten finden sich vor allem in der weißen Substanz und können leicht an ihrer starken Immunreaktivität gegen GFAP identifiziert werden (Bignami et al., 1972)(Abb. 3D).

Im Rahmen der posttraumatischen Reaktion im Ncl. Facialis nach Axotomie kommt es zu einer schnellen Reaktion der perineuronalen, protoplasmatischen Astrozyten innerhalb von 24 Stunden nach der Verletzung, mit einer drastischen Steigerung der GFAP-Bildung (Tetzlaff et al., 1988) und Reorganisation des Zytoskeletts, was zum klassischen Erscheinungsbild sternförmiger Astrozyten innerhalb von 3 Tagen führt (Graeber und Kreutzberg, 1986) (Abb. 3A). Die morphologischen Veränderungen der Astrozyten in dieser Frühphase werden durch Zytokine gesteuert. So konnte gezeigt werden, dass es in IL-6

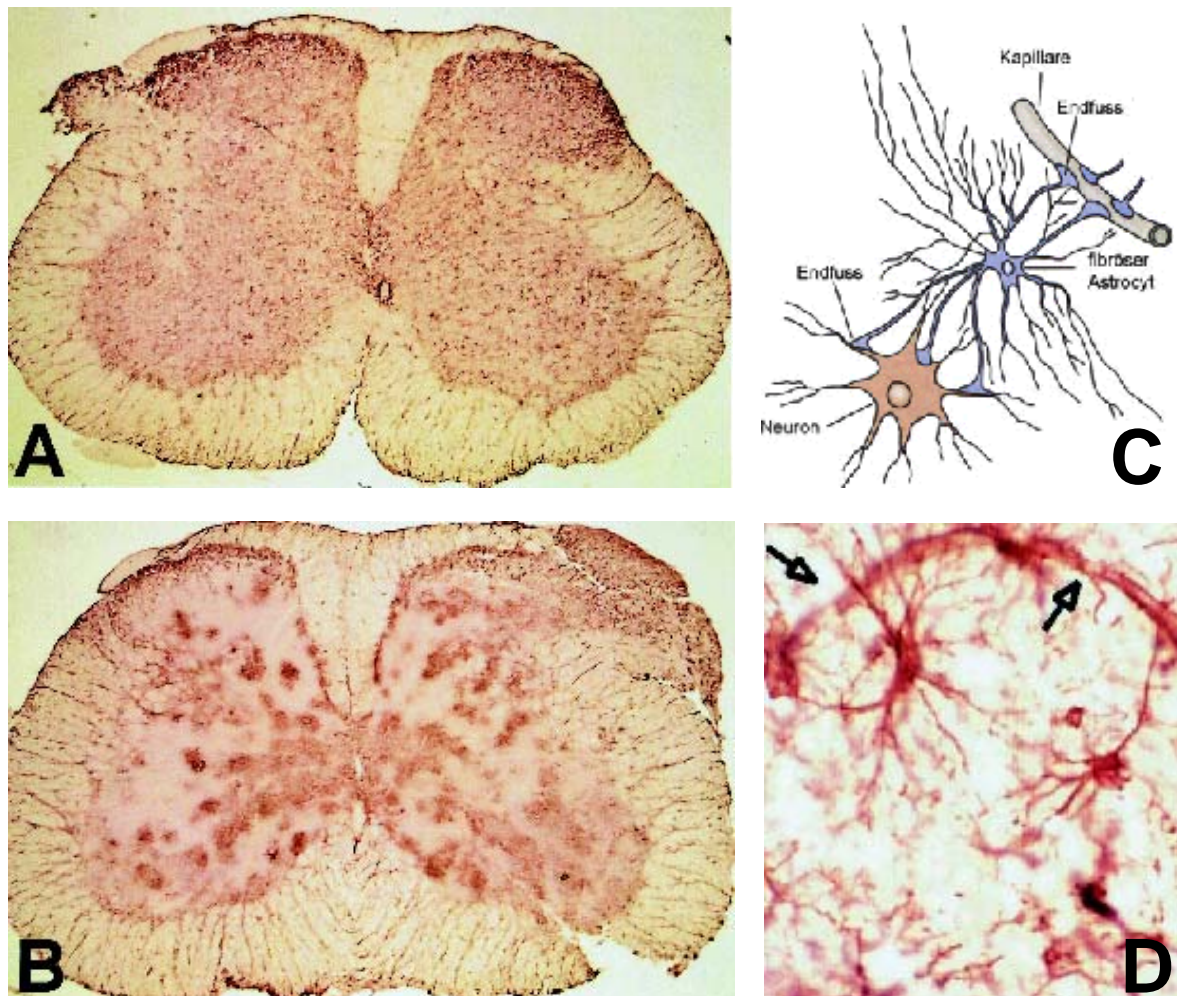


ABBILDUNG 3. Astrozyten im verletzten und normalen Nervensystem. (A, B). Immunhistochemische Darstellung (GFAP) des Effektes von IL-6 auf die morphologische Veränderung von Astrozyten im Rückenmark von Wildtypmieren (A) und transgenen IL-6 defizienten Mäusen (B), drei Tage nach Durchtrennung des rechten Nervus ischiadicus. **A.** In den normalen Tieren kommt es nach Trauma zu einer Zunahme der Anzahl von Astrozyten in der grauen Substanz des Rückenmarks auf der operierten Seite. Die Astrozyten zeigen eine deutliche fibrilläre Morphologie. **B.** In den IL-6 defizienten Mäusen zeigen die Astrozyten eine deutliche breitflächige und flappige Morphologie in der grauen Substanz, im Sinne von protoplasmatischen Astrozyten. **C.** Schematische Darstellung eines Astrozyten mit seinem Versorgungswerk im normalen ZNS. **D.** Lichtmikroskopische Darstellung von fibrillären Astrozyten in der weißen Substanz des Corpus Callosum im normalen ZNS der Maus mit GFAP. Die offenen Pfeile weisen auf die ebenfalls GFAP-positiven Gefäße hin. A,B und D nach Raivich et al., 1999; C nach Kandel et al., 2000. A,B: 50x; D:465x.

defizienten Tieren nicht zur Ausbildung von fibrillären Astrozyten nach Trauma kommt (Klein et al., 1997) (Abb. 3B). Zwei bis vier Wochen nach der Fazialisaxotomie verdrängen reaktive Astrozyten die Mikrogliazellen von der Oberfläche der verletzten Neurone im Fazialiskerngebiet und hüllen diese mit zahlreichen zytoplasmatischen Lamellen ein (Graeber et al., 1988a). Diese zytoplasmatischen Fortsätze der Astrozyten führen zu einer Isolierung der geschädigten Zellen vom neuronalen Netzwerk und fungieren als gliale Narbe.

Bei erfolgreicher Regeneration des Neurons ziehen die Astrozyten ihre Fortsätze teilweise wieder zurück, um einen erneuten Kontakt der Axonendigungen mit dem Neuron zu ermöglichen.

1.3.5 Rekrutierung von Lymphozyten

Verletzungen des ZNS im Sinne einer Infektion, Autoimmunerkrankung oder Trauma führen zu einem verstärkten Übertritt von immunkompetenten hämatopoetischen Zellen aus dem zirkulierenden Blut ins geschädigte Nervengewebe (Übersichten in Neumann und Wekerle, 1998; Raivich et al., 1999a). Bei den meisten dieser rekrutierten Zellen handelt es sich um perivaskuläre Gehirnmakrophagen (Hickey et al., 1988) sowie aktivierte T-Lymphozyten (Hickey et al., 1991).

Die periphere Axotomie des N. facialis führt bereits einen Tag nach Trauma zu einer vermehrten Einwanderung von aktivierten T-Lymphozyten in das betroffene Gebiet, wobei die BBB intakt bleibt (Raivich et al., 1998a). Im weiteren Verlauf führt das Auftreten der Abbauprodukte der degenerierenden Neurone ungefähr 2-3 Wochen nach Trauma zu einer 100-fachen Zunahme der Invasion von aktivierten CD-3 positiven T-Lymphozyten und deren Adhäsion an die sogenannten Gliaknötchen aus phagozytischer Mikroglia (Abb. 4A, Seite 17), welches die Grundlage für die mikrogliale Antigen-Präsentation darstellt. Bei der Rekrutierung der Lymphozyten in das verletzte Nervengewebe spielen die Zytokine IL 6, IL 1 und TNF α eine wichtige Rolle (Raivich et al., 1998a). Des weiteren erleichtern verschiedene Zelladhäsionsmoleküle wie ICAM-1, VCAM-1 und Selektine, die von den Endothelzellen der im betroffenen Gebiet befindlichen Gefäße vermehrt exprimiert werden, die Adhäsion und Einwanderung der zirkulierenden Lymphozyten in das verletzte Nervengewebe (Irani und Griffin, 1996; Pryce et al., 1997). Die Bedeutung der Rekrutierung von Lymphozyten in degenerierendes neuronales Gewebe wird durch das vermehrte Auftreten bei neurodegenerativen Erkrankungen, wie der Alzheimerschen Demenz (McGeer et al., 1993)

und der amyotrophen Lateralsklerose (Troost et al., 1989; Engelhardt et al., 1993), unterstrichen.

Die direkte Verletzung des ZNS führt ebenfalls zu einer massiven Invasion von verschiedenen immunkompetenten hämatopoetischen Zellen. Obwohl auch hier die vermehrte Einwanderung von aktivierten T-Lymphozyten beobachtet werden kann, so ist doch der Influx von Makrophagen und insbesondere neutrophilen Granulozyten (Abb. 4) in das verletzte Gewebe bei weitem stärker ausgeprägt (Holmin et al., 1998). Ein ähnlich gemischtes Zellinfiltrat lässt sich auch bei der fokalen cerebralen Ischämie (Clark et al., 1995) oder bakteriellen Entzündungen des Gehirns beobachten, was auf eine gemeinsame Regulierung der auftretenden Zytokine und Adhäsionsmoleküle bei der Rekrutierung von hämatopoetischen Zellen in verschiedenen ZNS-Pathologien hindeutet.

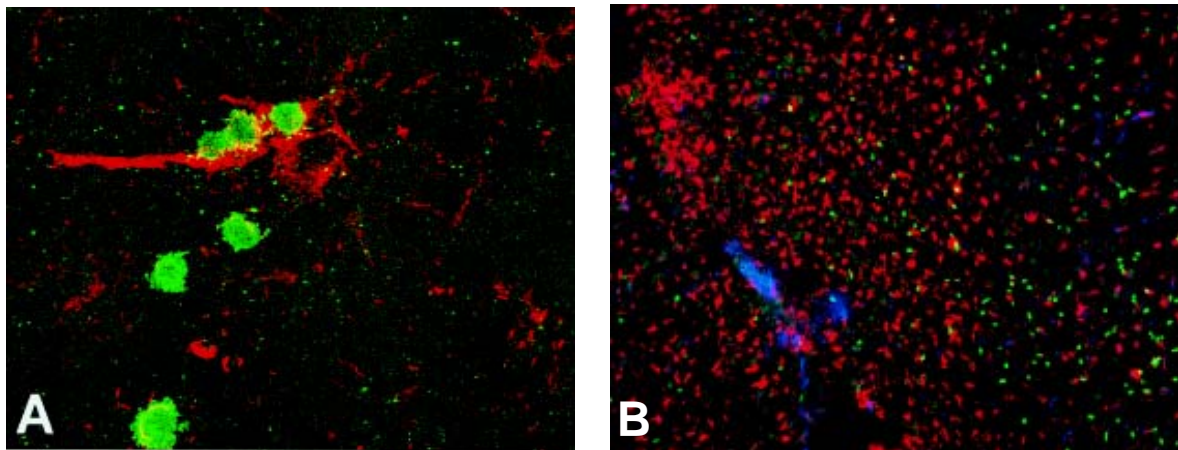


ABBILDUNG 4. Leukozyten-Rekrutierung im verletzten Nervensystem. A. Infiltration von Lymphozyten in den Ncl. facialis am Tag 14 nach Axotomie in einer normalen B6C3 Maus. Kolokalisation von CD3-positiven T-Zellen (CD-3; grün) und phagozytotischen mikroglialen Knötchen (Thrombospondin; rot). Der Untergang von verletzten Motoneuronen führt zur Ausbildung von Gliaknötchen mit Transformation in phagozytische Zellen und Adhäsion von T-Lymphozyten aus dem peripheren Blut. **B.** Leukozyten-Rekrutierung im direkten Hirntrauma in einer B6C3 Maus, 4 Tage nach parasagitaler Hemisektion des Cortex. Immunfluoreszenz-Dreifachmarkierung für Mikroglia (IBA1; rot), T-Lymphozyten (CD-3; grün) und neutrophile Granulozyten in entzündeten Gefäßen (endogene Peroxidase; blau). Deutliche Invasion der IBA1-positiven Mikroglia im Bereich der Läsion, wohingegen die Lymphozyten zahlreicher im umliegenden Gewebe auftreten, Raivich et al., 1999. A:1100x, B: 60x.

1.4 Pro-inflammatorische Zytokine im verletzten ZNS – Rolle für gliale und immunologische Aktivierung

Das verletzte ZNS ist eine reiche Quelle für viele proinflammatorische Zytokine, die je nach Grad und Muster der Schädigung in unterschiedlichem Maße auftreten (Tabelle 2, Seite 19). Bereits im normalen adulten Gehirn sind wirkungsvolle Mengen von MCSF und TGF β 1 anwesend (Kiefer et al., 1993; Raivich et al., 1998b; Streit et al., 1998). Indirektes Trauma (Phase 1), wie z.B. im Fazialismodell, führt zur Induktion von IL6 und TGF β 1 (Kiefer et al., 1993; Klein et al., 1997; Streit et al., 1998). Direkte Gehirnverletzung, Ischämie und Alzheimerdemenz (Phase 2), die in der Regel mit dem Auftreten von neuronalem Zelltod einhergehen, führen zusätzlich zur Produktion von IL1 β und TNF α . Entzündliche Läsionen des ZNS im Rahmen einer viralen oder bakteriellen Meningitis und Enzephalitis (Phase 3) führen zur weiteren Synthese von IFN γ (Frei et al., 1988; Merrill et al., 1992). Somit ergibt sich das Gesamtbild einer schrittweisen Verstärkung der Expression proinflammatorischer Zytokine in Abhängigkeit von der Schwere der Gehirnpathologie (Tabelle 2). Im Fazialismodell kommt es zu einer biphasischen Regulation einer Reihe dieser Zytokine. So ist die frühe Aktivierung der Mikroglia mit einer erhöhten Expression von IL6, TGF β 1 und dem Rezeptor für MCSF assoziiert (Kiefer et al., 1993; Raivich et al., 1998a). In der anschließenden Phase der Adhäsion und Zielfindung (Phase 2) kommt es zu einer Hochregulation von IL1 β und TNF α (Raivich et al., 1998a). Diese beiden stadiumsspezifischen Gruppen von Zytokinen spielen eine wichtige Rolle im Rahmen der zellulären und molekularen Veränderungen im Kerngebiet des Ncl. facialis nach Axotomie (Galiano et al., 2001; Raivich et al., 2002).

Insbesondere in den letzten Jahren gelang es, mit Hilfe von genetisch defizienten Tieren, sowohl mit natürlichen Mutanten, wie auch mit „Knockout“-Mäusen, erste Signalmoleküle für zelluläre Veränderungen im verletzten ZNS in vivo zu identifizieren (Raivich et al., 1999a). So führt das Fehlen von MCSF zu einer massiven Abnahme in der posttraumatischen

Proliferation der Mikroglia (Raivich et al., 1994), das von IL6 zu einer Hemmung der astrozytären Reaktion (Klein et al., 1997), und das von beiden TNF-Rezeptoren (TNFR1, 2) zum Verschwinden des posttraumatischen neuronalen Zelltods im Fazialismodell (Raivich et al., 2002). Die Untersuchung von gendefizienten Tieren erlaubt somit die Identifizierung von stadiumspezifischen Signalen, die zu Veränderungen der mikroglialen Morphologie führen.

Tabelle 2. Expression von Zytokinen nach Verletzung im ZNS

	<i>Stufe</i>	<i>Zytokin</i>
Phase0	Normales Gehirn	MCSF, TGFβ1
Phase1	Indirektes Trauma	MCSF↑, TGFβ1↑, IL6↑
Phase2	Direktes Trauma, Zelltod	MCSF↑, TGFβ1↑, IL6↑, IL1β, TNF α
Phase3	Infektion	MCSF↑, TGFβ1↑, IL6↑, IL1β, TNF α, IFNγ

Modifiziert nach Raivich et al., 1999

1.5 Mikroglia in Zellkultur

Über die molekularen Mechanismen der Transformation der Mikroglia in Makrophagen während der De- und Regeneration im verletzten ZNS ist bisher wenig bekannt. In reinen Mikrogliazellkulturen kann eine Abnahme der Ramifizierung durch eine Vielzahl von unterschiedlichen Stimuli, wie z.B. Lipopolysaccharide (LPS), IFNγ, Laminin, Aminosäuren, oder inaktiven Mikrosphären erreicht werden (Chamak and Mallat, 1991; Suzumura et al, 1991; Giulian et al, 1995; Tanaka et al, 1998; Mielke et al, 1999; Beyer et al, 2000). Fibronectin und Astrozyten-konditioniertes Medium (ACM) haben hingegen einen die Ramifikation von Mikroglia induzierenden Effekt. Die Wirkung von ACM kann durch neutralisierende Antikörper gegen TGFβ, MCSF und GMCSF (Schilling et al., 2001), und im

Falle von Fibronectin mit gewissen Blockern von Integrinrezeptoren inhibiert werden (Tanaka and Maeda, 1996).

Ein Problem in den mikroglialen Monokulturen besteht darin, dass diese häufig bereits in den Kontrollkulturen deramifizierten, aktivierten Makrophagen ähneln. So unterscheiden sich Makrophagen in ihrer enzymatischen Aktivität (Suzumura et al., 1991), den elektrophysiologischen Eigenschaften (Schmidtmayer et al., 1994; Eder et al., 2000) und dem Aufbau des Zytoskelettes (Perry und Gordon, 1988; Chamak und Mallat, 1991; Ilschner und Brandt, 1996) von der ramifizierten Mikroglia im normalen Gehirn. Eine Alternative bietet hier das Kokultursystem mit stark ramifizierten Mikrogliazellen auf einem konfluenten Astrozytenrasen (Sievers et al., 1994; Tanaka und Maeda et al., 1996; Wilms et al., 1997). So konnten verschiedene Moleküle, welche in der Monokultur zu einer mikroglialen Transformation führen, diesen Effekt nicht in der Mikroglia-Astrozyten-Kokultur reproduzieren. Die Zugabe von MCSF, GMCSF und IL3 führt im Kokultursystem zwar zu einer Zunahme der Proliferation der Mikroglia, und der Zusatz der entsprechenden Antikörper führt zur Inhibition ihrer Mitogenität, jedoch lässt sich mit beiden Strategien die mikrogliale Morphologie nicht beeinflussen (Kloss et al., 1997). Die meisten proinflammatorischen Zytokine wie IL2, IL4, IL10, TNF α , IFN γ und TGF β 1 inhibieren zwar die Proliferation, vermögen jedoch ebenfalls nicht die Morphologie der Mikroglia zu verändern (Kloss et al., 1997; Jones et al., 1998). Für LPS gilt dasselbe, was ebenso zu einer Aktivierung der Mikroglia führt, ohne jedoch eine Transformation von Mikroglia in Makrophagen in Kokulturen auszulösen (Kloss et al., 2001). Insgesamt lassen sich mit dem Modell der Astrozyten-Mikroglia-Kokultur Bedingungen schaffen, die zu einer Etablierung einer stabilen ramifizierten Form der Mikroglia führen, welche vergleichbar mit der Form in vivo ist. Somit eignet sich dieses Kokultursystem insbesondere zum Aufspüren der molekularen Signale, die zu einer Transformation von Mikroglia zu Phagozyten führen.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Die zentrale Bedeutung von Gliazellen bei Verletzungen des Nervensystems ist heute unbestritten. Im Rahmen der Schädigung kommt es zu umfangreichen morphologischen, molekularen und metabolischen Veränderungen der beteiligten Mikroglia, die soweit als möglich zu einer Wiederherstellung der Funktion beitragen sollen. Allerdings herrscht hier noch weitgehend Unklarheit über die molekularen Signale, die für die Veränderungen der mikroglialen Morphologie im verletzten Nervensystem verantwortlich sind.

In der vorliegenden Arbeit wird zunächst die Rolle von Zytokinen (MCSF, IL6) bei der Aktivierung der Mikroglia, insbesondere im Hinblick auf die Morphologie und der daran beteiligten Adhäsionsmoleküle untersucht. Zusätzlich wurde in den MCSF-defizienten Tieren das neuronale Überleben, die axonale Regeneration und die Rekrutierung von T-Zellen in Folge von neuronalem Trauma und Zelltod beurteilt. Hierfür wurde an genetisch defizienten Mäusen für MCSF und IL6 die Axotomie des N. facialis durchgeführt, um den stadienspezifischen Einfluss dieser Zytokine auf die mikrogliale Morphologie und die hiermit einhergehende Expression der verschiedenen Signalmoleküle *in vivo* zu identifizieren.

Da vorläufige Studien sehr wohl einen Effekt der MCSF- oder IL6-Defizienz auf frühe Aktivierungsstadien, aber nicht auf mikrogliale Phagozyten zeigten, wurde die spezifische Wirkung von Zelldebris auf die Transformation von Mikroglia in der Kokultur getestet. Im abschließenden Teil der Arbeit wurde die Wirkung verschiedener intrazellulärer Signale wie zyklischer Nukleotide, Ca^{2+} und Inhibitoren von G-Proteinen and Phosphatasen auf ihre Fähigkeit untersucht, diese normalerweise in Gegenwart des Zelldebris stattfindende Transformation von Mikroglia in Makrophagen zu reproduzieren. Da Phagozyten auch selber eine Reihe von Zytokinen und Proteasen produzieren, die möglicherweise mit der ramifizierenden Wirkung von Astrozyten interferieren, untersuchten wir gleichzeitig die Effekte von Proteasen, Disintegrinen und Integrininhibitoren auf die Morphologie der Mikroglia in der Kokultur.

Ziel dieser Arbeit ist letztendlich, zu einem besseren Verständnis der morphologischen Veränderungen der Mikroglia im verletzten Nervensystem beizutragen, um somit die Grundlage für die Wahrung der strukturellen und funktionellen Integrität des Gehirns, die erfolgreiche Regeneration seiner Funktion und die gezielte therapeutische Intervention bei Schädigungen zu schaffen.

2. Methoden und Materialien

2.1 Mikrogliale Antwort im verletzten Nervensystem

2.1.1 Tiermodell: Der axotomierte motorische Fazialiskern der Maus

Die meisten experimentellen Tiermodelle für Verletzungen des zentralen Nervensystems (z.B. Ischämie, Infektion oder direktes Schädelhirntrauma) gehen mit einer frühen Störung der Bluthirnschranke und der damit verbundenen frühen Einwanderung von Blutmakrophagen einher (Dickson et al., 1993; Mc Geer et al., 1993). Das Antigenprofil der Makrophagen stimmt weitgehend mit dem der residenten aktivierten Mikroglia überein, so dass keine eindeutige Differenzierung zwischen beiden Zelltypen vorgenommen werden kann (Perry und Gordon, 1988; Gräber und Streit, 1990; Kreutzberg, 1996). Dieses Problem wird durch das Tiermodell der Fazialisaxotomie umgangen. Auf Grund der großen Entfernung der Läsionsstelle vom Ncl. facialis kommt es weder zu einer Einwanderung von Makrophagen oder Granulozyten ins ZNS, noch zu einer erhöhten Durchlässigkeit der BBB für Serumproteine (Kreutzberg, 1996; Werner et al., 1998). Des weiteren lässt sich der rein motorische Fazialiskern der Maus eindeutig vom umgebenden Hirnstamm abgrenzen, enthält ausreichend viel Gewebe für quantitativ immunhistochemische Untersuchungen und bietet in jedem Gehirnschnitt mit dem kontralateralen Ncl. facialis eine unmittelbare endogene Negativkontrolle. Im weiteren Verlauf kommt es nach der Durchtrennung des N. facialis in der Maus zu einem verzögerten Untergang von Nervenzellen sowie zur spezifischen Einwanderung von Lymphozyten, die an Knötchen von phagozytierender Mikroglia adhären (Möller et al., 1996; Raivich et al., 1998a).

Vor Durchführung der Tierversuche erging eine Genehmigung der Regierung von Oberbayern (AZ 211-2531-10/93 und AZ 211-2531-37/97). Die Operation wurde unter Anästhesie mit einer intraperitonealen Injektion von 0.4 ml/g Körpergewicht Triobromethanol (Avertin; Sigma, Deisenhofen, Deutschland) an drei bis sechs Monate alten Mäusen durchgeführt. Zunächst wurde ein Teil des Felles im Bereich des rechten Ohres ausrasiert,

die darunter liegende Haut nach Desinfektion mit 70-% Alkohol eingeschnitten und das subkutane Bindegewebe stumpf gespreizt. Anschließend wurde der rechte N. facialis in seinem anatomischen Verlauf dargestellt und unmittelbar nach dem Austritt aus dem Foramen stylomastoideum durchtrennt oder wie im Falle der Regenerationsstudien unmittelbar nach Abgang des Ramus auricularis posterior mit einer feinen Pinzette für insgesamt 30 Sekunden wiederholt gequetscht, ohne die Kontinuität der Nervenhülle zu unterbrechen. Nach erfolgreicher Operation wurde die Haut geklammert und das Erwachen der Mäuse abgewartet. Postoperativ betrug die Überlebenszeiten der Mäuse 1, 4, 7, 14 und 60 Tage.

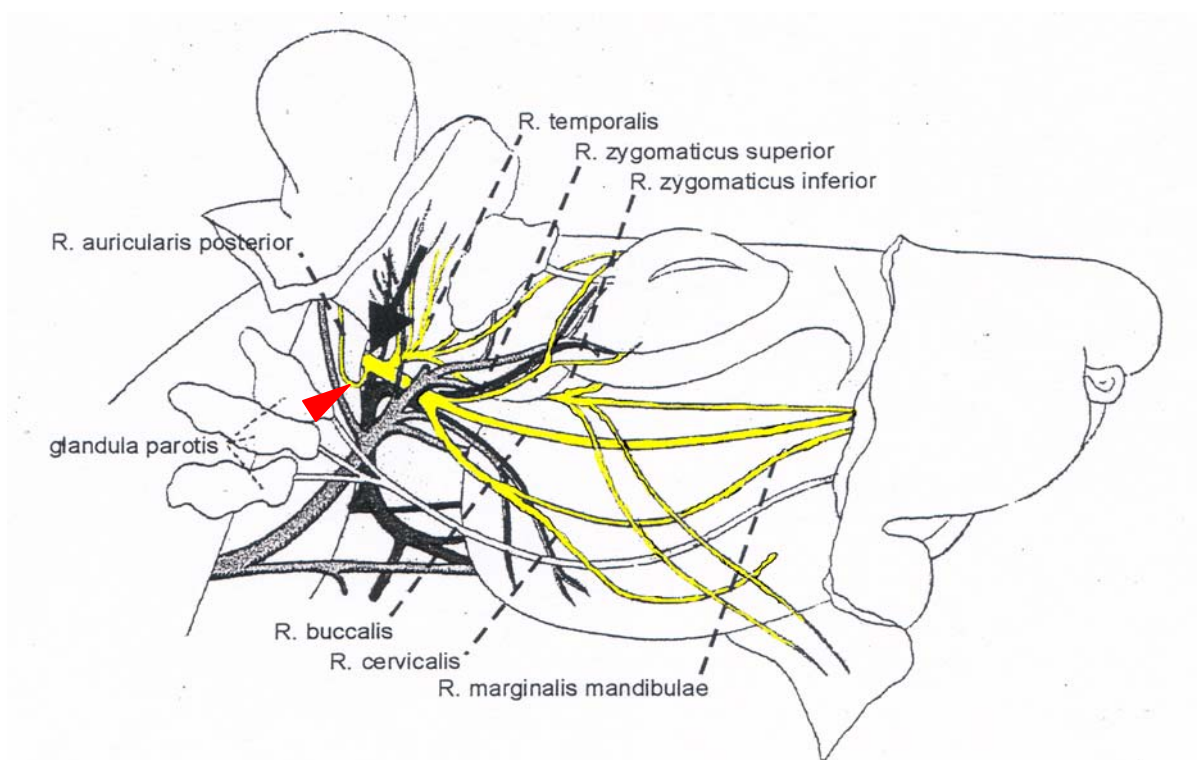


ABBILDUNG 5. Axotomie des N. facialis kurz nach seinem Austritt aus dem Foramen stylomastoideum (Pfeil, schwarz). Für die komplette Durchtrennung des Nervs wird auch der Nebenast Ramus auricularis posterior (Pfeilspitze, rot) durchtrennt. Greene, 1963; ergänzt nach Raivich, 1997.

2.1.2 Versuchstiere

Zur Untersuchung der mikroglialen Aktivierung im verletzten Nervensystem wurden drei bis sechs Monate alte osteopetrotische Mäuse von der Firma Jackson Laboratory (Bar Harbor, USA) verwendet. Die Osteopetrose (op) ist eine spontan auftretende autosomal rezessive Mutation des MCSF-Gens auf Chromosom 3, die zu einer Abwesenheit von biologisch aktiven MCSF in den homozygoten Mäusen (op/op) führt. Dies ist bedingt durch eine einzelne Baseninsertion (Thymidin) in einem frühen Abschnitt des Gens, was zur Ausbildung eines frühzeitigen Stopcodons führt (Yoshida et al., 1990). Ein wesentliches morphologisches Merkmal der homozygoten Mäuse (op/op) ist der fehlende Durchbruch der Schneidezähne (Marks and Lane, 1976). Die heterozygoten Mäuse (+/op) sind phänotypisch normal und wurden als Zuchtkolonie mit einem gemischten B6C3-Hintergrund gehalten.

Homozygote, Interleukin-6-defiziente Mäuse (IL6^{-/-}) mit einem C57Bl/6-Hintergrund (Kopf et al., 1994) wurden von der Firma BRL (Basel, Schweiz) bezogen und mit C57Bl/6-Wildtyp-Tieren (Charles River, Hannover) gekreuzt, um eine Kolonie von heterozygoten IL6^{+/-}-Mäusen herzustellen.

Die in dieser Studie verwendeten homozygoten IL6^{-/-} Mäuse sowie die IL6^{+/+} Wildtyp-Kontrollen wurden der F1-Generation von den zuvor gezüchteten heterozygoten IL6^{+/-}-Mäusen entnommen. Zur Genotypisierung der Interleukin-6-defizienten Mäuse (IL6^{-/-}) und der entsprechenden F1-Wildtyp-Kontrollen wurde eine Polymerase-Kettenreaktion durchgeführt (Galiano et al., 2001). Zur Etablierung reiner Kulturen von Astrozyten aus der Ratte und Mikroglia aus der Maus wurden Wistar-Ratten sowie FVB-Mäuse aus dem Tierhaus des MPI für Neurobiologie verwendet.

2.1.3 Lichtmikroskopische Histologie

2.1.3.1 Gewebeentnahme für lichtmikroskopische Immunhistochemie

Für die lichtmikroskopische Immunhistochemie wurden die Versuchstiere nach Überlebenszeiten von 1, 4, 7, 14 und 60 Tagen nach Fazialisaxotomie in Diethylether

getötet. Unmittelbar nach Eintritt des Todes wurde der Herzbeutel eröffnet, die linke Herzkammer kanüliert und das rechte Herzohr für den Austritt der Perfusionslösung aufgeschnitten. Die Tiere wurden zunächst mit 200 ml isotoner Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS) transkardial mit einer peristaltischen Pumpe perfundiert (40ml/min). Daraufhin wurden die Tiere zur weiteren Fixierung mit 200 ml 4-% Paraformaldehyd (in PBS) perfundiert, das Gewebe herauspräpariert (Hirnstamm, Milz, Abdominalorgane) und in 1 % Paraformaldehyd bei 4°C auf einem Rotator für zwei Stunden nachfixiert. Zur Fixierung des N. facialis wurden die Versuchstiere im Anschluss an die Spülung mit 200 ml 4% Paraformaldehyd für weitere 60 min mit 1 % Paraformaldehyd perfundiert, der periphere Nerv auf einer Länge von 15 bis 20 mm vorsichtig freipräpariert und mit dem Eindeckmedium OCT überdeckt. Zum Gefrierschutz wurden Hirnstamm, Milz und Abdominalorgane bei 4°C über Nacht in 30% Saccharose auf dem Drehrad eingelegt und schließlich auf Trockeneis eingefroren und im Gefrierschrank bei -80°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt. Weiterhin wurden in einem Kryostaten (Reichert-Jung, Med. 2700, Frigocut) bei einer Kammertemperatur von -20°C und einer Objekttemperatur von -10°C der gefrorene Hirnstamm auf der Höhe des Ncl. facialis in 20 µm dicke Schnitte verarbeitet. Der N. facialis wurde in Längsrichtung mit einer Schnittdicke von 10 µm geschnitten. Die Schnittpräparate wurden auf einem warmen, mit 0.5%-Gelatine beschichteten Objektträger aufgenommen, sofort auf Trockeneis eingefroren und bei -80°C bis zum weiteren Gebrauch gelagert.

2.1.3.2 Immunhistochemie mit Diaminobenzidin (DAB)

Die Gewebsschnitte mit einer Dicke von 20 µm wurden mit bidestilliertem Wasser rehydriert und auf dem Objektträger ausgebreitet. Alle Präparate wurden für 5 Minuten an der Luft getrocknet und dann für 5 Minuten mit 4-% Paraformaldehyd (Merck, Darmstadt, Deutschland) auf dem Objektträger mittels kovalenter Bindungen fixiert. Je nach verwendetem Antikörper wurden die Schnitte für jeweils 2 Minuten in 50-%, 100-%, 50-%

Aceton/H₂O entfettet und jeweils für zwei Minuten in PB, in PB/0.1%-Rinder-Serum-Albumin (PB/BSA) und nochmals in PB gewaschen. Zur Absättigung von unspezifischen Bindungsstellen im Gewebe wurden die Präparate für 30 Minuten mit 5% Ziegenserum/PB (Vector, Wiesbaden, Deutschland) inkubiert und mit dem in PB/BSA optimal verdünnten primären Antikörper (Kapitel 2.3, Seite 47) über Nacht bei 4°C inkubiert und im Anschluss daran einmal in PB/BSA, zweimal in PB und wieder in PB/BSA gewaschen. Um unspezifische Bindungsstellen der Antikörper gegen Maus-Immunglobuline zu blockieren, wurden die entsprechenden sekundären Antikörper (Kapitel 2.3, Seite 48) zunächst unverdünnt mit der doppelten Menge Maus-Normalserum für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die präinkubierten sekundären Antikörper in PB/BSA mit Ziegenserum 1:100 verdünnt und für eine Stunde auf den Schnitten bei RT inkubiert, dann zweimal in PB/BSA und zweimal in PB gewaschen, um anschließend das gesuchte Antigen mit dem Avidin-Biotin-Peroxidasystem sichtbar zu machen. Hierbei wird an den biotinierten sekundären Antikörper über eine Avidin-Biotin-Avidin Brücke eine biotinierte Peroxidase gebunden, welche das zugefügtes 3.3'-Diaminobenzidin (DAB) unter Reduktion von H₂O₂ oxidiert. Das oxidierte DAB polymerisiert und bildet einen unlöslichen bräunlichen Niederschlag (Graham und Karnovsky, 1965; Sternberger, 1986). Für die ABC-DAB-Reaktion wurden die Schnitte für eine Stunde mit ABC-Reagenz (Vector, Lösung A 1:125 und Lösung B 1:125 in PB, 30 Minuten vor Gebrauch angesetzt) bei RT inkubiert, wieder in PB und PBS gewaschen, und schließlich wurde die enzymatische Reaktion durch Zusatz von Diaminobenzidin (0.5 mg/ml; filtriert) mit H₂O₂ (1:3000) gestartet und nach 5 Minuten in Aqua dest. abgestoppt. Zur Intensivierung der Färbung von CD3 wurden dem Reaktionsgemisch 0,25 g/l CoCl₂ und 0,2 g/l NiSO₄ zugesetzt. Dabei kommt es zu einem Einbau dieser Cobalt und Nickel-Ionen in die Chromophoren des polymerisierten DAB mit blau-schwarzer Tönung der Niederschlagsfarbe des entsprechenden Produkts (Hsu und Soban, 1982). Anschließend wurden die Schnitte in einer Alkoholreihe (jeweils 1 Minute in

Ethanol 70%, 70%, 90%, 95%, 100%, 100%; Isopropanol 100%, 100%; Xylol 100%, 100%) dehydriert und in DEPEX (BDH, Poole, England) eingebettet. Zur weiteren Darstellung wurden die gefärbten Schnitte an einem Zeiss Axiophot Mikroskop mit einem Leica SilverFast 4.1 Scanner (Leica, Stuttgart, Deutschland) digital aufgenommen und in dem Bildanalyse-Programm OPTIMAS 6.2 (Bothell, WA) weiter verarbeitet.

2.1.3.3 Quantifizierung lichtmikroskopischer Immunhistochemie

Zur Quantifizierung der Gesamtimmunreaktivität wurden die DAB-Färbungen in einem Zeiss Axiophot Mikroskop (2.5x-Objektiv) bei konstanter Beleuchtungsspannung mit einer Sony 89B CCD Kamera (Model CX-77CC) aufgenommen. Diese Kamera liefert eine Auflösung von 640 x 400 Bildpunkten, wobei jeder Bildpunkt (Pixel) einen optischen Lichtwert (OLW) von 0-255 erhielt. Das digitalisierte Bild wurde in das Bildverarbeitungsprogramm OPTIMAS 6.2 importiert und der Ncl. facialis für jeden Schnitt als Auswertungsgebiet (region of interest, ROI) markiert, in dem für die Gesamtheit der Pixel des ROI der Mittelwert (MEAN) und die Standardabweichung (SD) der OLW ermittelt wurde. Als Maß für die Stärke der Färbung wurde die Färbeintensität (Fi) mit dem MEAN-SD-Algorithmus berechnet. Dieser Algorithmus bildet eine Differenz aus Absorption (MEAN) und Standardabweichung (SD) der OLW im ROI und zudem von leerem Objektträgerglas. Dieser Algorithmus liefert besonders zuverlässige Ergebnisse für die Quantifizierung von Immunhistochemien (Möller et al., 1996). Eine OLW von 0 bedeutet minimale Lichtintensität mit maximaler Färbung und eine OLW von 255 maximale Lichtintensität mit minimaler Färbung des Schnittpräparates. Ein gleichmäßiger Anstieg der Stärke der Färbung macht sich in einem gleichmäßigen Abfall der mittleren OLW bemerkbar. Wenn nur wenige Pixel einen deutlichen Färbeanstieg zeigen, so sinkt zwar der Mittelwert aufgrund der geringen Anzahl der beteiligten Pixel nur minimal ab, aber der starke Färbeanstieg bewirkt einen deutlichen Anstieg der Standardabweichung der OLW. Da sich also Mittelwert und Standardabweichung bei ansteigender Färbung gegenläufig verhalten, dient der Mittelwert (MEAN) der OLW minus Standardabweichung

(SD) als Maß für die Färbung. Die Differenz von MEAN-SD wird von dem maximalen OLW-Wert (255) subtrahiert und als Farbintensität (Fi) bezeichnet. Folgende Formel beschreibt diesen Zusammenhang:

$$\text{Farbintensität (Fi)} = 255 - (\text{Mittelwert (MEAN)} - \text{Standardabweichung (SD)})$$

2.1.3.4 Messung der Regenerationsrate im Nervus facialis

Die lichtmikroskopische Analyse der peripheren Regenerationsrate im N. facialis erfolgte an den osteopetrotischen Mäusen 96 Stunden nach Fazialisaxotomie. Nachdem die fixierten Nerven herauspräpariert (siehe Kap. 2.1.4.1) und mit einem Durchmesser von 10 µm geschnitten worden waren, wurde jeder fünfte Schnitt mit einem entsprechenden Abstand von 50 µm gegen die Neuropeptide Galanin und CGRP gefärbt, welche axonal in den Wachstumskegeln transportiert werden. Die Distanz zwischen dem am weitesten distal von der Läsionsseite gelegenen Wachstumskegel und der morphologisch bestimmten Läsionsstelle wurde im Lichtmikroskop (Zeiss Axiophot) bestimmt. Schließlich wurde für jedes Tier der Mittelwert der axonalen Regenerationsgeschwindigkeit aus 4 bis 5 Nervenschnitten festgestellt.

2.1.3.5 Anfärbung von Granulozyten und Makrophagen im N. facialis

Zur Beurteilung der Rekrutierung von zirkulierenden Leukozyten bei Verletzungen des peripheren Nervensystems wurden neutrophile Granulozyten und Makrophagen im Bereich der Läsionsstelle nach Fazialisaxotomie untersucht. Zum Nachweis der infiltrierenden Granulozyten diente der Nachweis der Aktivität der endogenen Peroxidase (EP) in den Granulozyten. Die mit 4% Paraformaldehyd fixierten Schnitte wurden hierfür mit biotiniertem Tyramin (3% in PB) und 0,01% H₂O₂ für 10 Minuten inkubiert. Das durch die Peroxidase oxidierte Tyramin bindet kovalent an das Schnittgewebe und wird durch das

daran konjugierte Biotin im anschließenden ABC/DAB-Verfahren detektiert und gefärbt (Adams et al., 1992). Der Nachweis von Makrophagen erfolgte mit dem gegen das α M β 2-Antigen gerichteten Antikörper. Die Anzahl beider Zelltypen wurde für jeweils fünf Schnittpräparate des jeweiligen Nervs sowohl an der Läsionsstelle als auch zwei und vier mm distal hiervon bestimmt.

2.1.4 Fluoreszenzimmunhistochemie

Die Untersuchung der zellulären Lokalisation von zellspezifischen Antigenen auf Neurone, Astrozyten, Oligodendroglia, Mikroglia, Endothelien oder Leukozyten durch fluoreszierende Antikörper bietet gegenüber der konventionellen DAB-Immunhistochemie eine Reihe wichtiger Vorteile. Die simultane Markierung mehrerer Antigene durch verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe ermöglicht die zweifelsfreie Zuordnung von verschiedenen Zellen, selbst wenn sich Ihre Morphologie entsprechend des Aktivierungszustandes lichtmikroskopisch ähnelt. Als zelltypspezifische Marker dienten in dieser Arbeit GFAP zur Markierung der Astrozyten, ionisiertes Ca-bindendes Adapterprotein 1 (IBA 1) und intrinsisches Maus-Immunglobulin (IgG) als Mikrogliamarker, und Galanin oder CGRP als Marker für axotomierte Motoneurone (Raivich et al., 1995; Klein et al., 1997). Des Weiteren ermöglichen Doppelmarkierungen eine besonders hohe Aufnahmeempfindlichkeit im konfokalen Lasermikroskop. Darüber hinaus lässt sich die Menge eines Antigens selektiv mit Hilfe der bestimmten Zelltypmasken semiquantitativ abschätzen.

2.1.4.1 Immunfluoreszenz-Doppelmarkierungen

Für immunhistochemische Doppelmarkierungen wurden die fixierten, 20 μ m-dicken Schnitte zunächst wie unter 2.1.3.2 beschrieben behandelt, jedoch erfolgte die Präinkubation mit 5% Esel-Normalserum in PB. Die Schnitte wurden simultan mit primären monoklonalen und polyklonalen Antikörpern, die aus unterschiedlichen Tieren stammten, über Nacht bei 4°C

inkubiert (siehe Tabelle 6, Seite 49) und dann in PB/BSA, PB, PB und PB/BSA gewaschen. Anschließend erfolgte erneut eine simultane Inkubation mit einem entsprechenden Fluoreszein-5-Isothiocyanat (FITC)-konjugierten Antiserum gegen Ratten- oder Hamster-IgG (1:100 in PB/BSA) aus der Ziege und einem biotin-konjugierten Antiserum gegen Kaninchen- oder Ratten-IgG (1:00 in PB/BSA) aus dem Esel für eine Stunde bei RT (siehe Tabelle 7, Seite 50) und waschen die Schnitte in PB/BSA, PB, PB und PB. Schließlich wurden die Schnitte mit einem tertiären FITC-konjugierten Antiserum gegen Ziegen-IgG (1:100 in PB/BSA) aus dem Esel in Kombination mit Cy3-Avidin (1:1000 in PB/BSA; Dianova) für 2 Stunden bei RT inkubiert. Nach dem Waschen in PB/BSA, PB, PB und PB wurden die Schnitte mit Vectashield eingedeckelt und bei 4⁰C in der Dunkelheit bis zum weiteren Gebrauch aufbewahrt.

2.1.4.2 Doppelmarkierungen mit intrinsischem IgG

Im Hirnparenchym der Maus finden sich an den Mikrogliazellen bereits unter physiologischen Bedingungen über Fc-Rezeptoren gebundene Immunglobuline (Fishman und Savitt, 1989; Werner et al., 1998), die hier als spezifische Marker für ruhende und aktivierte Mikrogliazellen dienen. Hierzu wurden die Schnitte nach der oben beschriebenen Vorbehandlung und Präinkubation in 5%-ES mit einem Peroxidase-konjugiertem Antikörper gegen Maus-IgG aus dem Pferd (1:400 in PB/BSA) für 1 Stunde bei RT inkubiert, dann sorgfältig in PB/BSA, PB, PB und PB/BSA gewaschen und für weitere 10 Minuten mit biotiniliertem Tyramin (1:3000 in PB) und H₂O₂ (1:10000 in PB) bei RT inkubiert. Bei dieser enzymatischen Reaktion oxidiert die Peroxidase das biotinilierte Tyramin unter Reduktion von H₂O₂ und bewirkt dessen kovalente Bindung an den Gewebeschnitt (Bobrow et al., 1989; Bobrow et al., 1991). Mit Hilfe des konjugierten Biotins kann das zuvor gebundene Tyramin nun nachgewiesen werden (Adams, 1992). Nach dem Waschen in PB, PB/BSA und PB/BSA

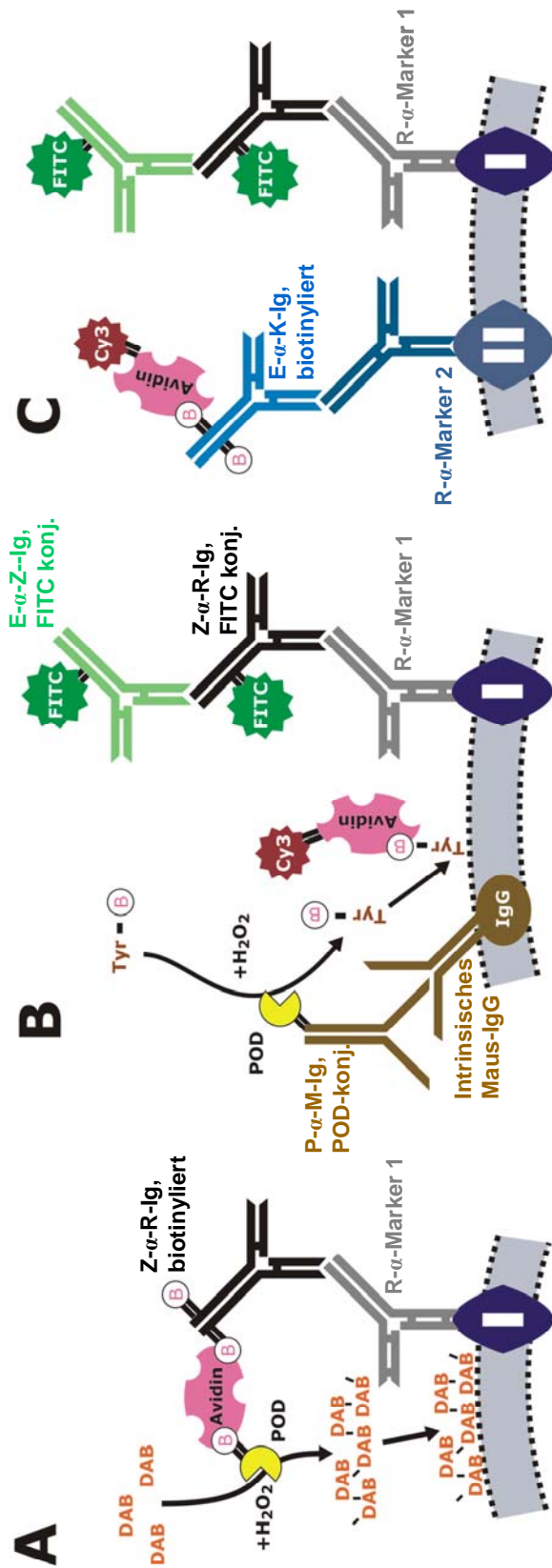


Abbildung 6. Schema immunhistochemischer Nachweismethoden. Gezeigt ist der Nachweis von Zellmarkern mit einem monoklonalen Antikörper aus der Ratte. **A. Diaminobenzidin (DAB)-Methode.** Der Zellmarker wird von dem primären Antikörper aus der Ratte (R-α-Marker 1) erkannt, mit einem biotinylierten Ziegenantikörper gegen Ratten-Ig (Z-α-R-Ig) markiert und schließlich über den Niederschlag der ABC/DAB-Reaktion sichtbar gemacht. **B. Fluoreszenzdoppelfärbung mit intrinsischem 1gG.** Der Marker 1 wird mit einer Kette von Antikörpern aus Ratte gegen Marker 1 (R-α-Marker 1), Ziege gegen Ratten-Ig (Z-α-R-Ig) und Esel gegen Ziegen-Ig (E-α-Z-Ig) markiert und durch konjugiertes FITC sichtbar gemacht. Das im Gehirn der Maus konstitutiv an Mikroglia gebundene IgG wird mit einem Pferdeantikörper gegen Maus-IgG (P-a-M-Ig) markiert, die daran konjugierte Peroxidase verankert dann biotinyliertes Tyramin kovalent im Gewebe, das über den Cy3-Avidin-Komplex detektiert wird. **C. Fluoreszenzdoppelfärbung mit zwei Zellmarkern.** Der Marker 1 wird wie bei B mit FITC markiert. Die Doppelmarkierung erfolgt mit einem Kaninchen-Antikörper gegen den Zellmarker 2 (K-α-Marker 2), der mit einem biotinylierten Esel gegen Kaninchen-IgG (E-α-K-Ig) und dem Cy3-Avidin-Komplex detektiert wird. **Abkürzungen:** B Biotin, DAB Diaminobenzidin, E Esel, FITC Fluoreszsin-5-Isothiozyanate, K Kaninchen, konj. konjugiert, Ig Immunglobulin, M Maus, P Pferd, POD Peroxidase, R Ratte, Tyr Tyramin, Z Ziege.

wurden die Schnitte erneut mit 5-% Eselserum zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen für 30 Minuten bei Raumtemperatur (RT) präinkubiert und mit dem entsprechenden primären Antikörper über Nacht bei 4⁰C inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte mit einem sekundären FITC-konjugierten Antikörper gegen Ratten-IgG (1:100 in PB/BSA) aus der Ziege (siehe Tabelle 7, Seite 50) für eine Stunde bei RT inkubiert und dann in PB/BSA, PB, PB und PB gewaschen. Schließlich wurden die Schnitte mit einem tertiären FITC-konjugierten Antiserum gegen Ziegen-IgG (1:100 in PB/BSA) aus dem Esel in Kombination mit Cy3-Avidin (1:1000 in PB/BSA) für 2 Stunden bei RT inkubiert. Nach dem Waschen in PB/BSA, PB, PB und PB wurden die Schnitte mit Vectashield eingedeckelt und bei 4⁰C in der Dunkelheit bis zum weiteren Gebrauch aufbewahrt.

2.1.4.3 Digitalisierung der Fluoreszenz im konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop

Die weitere Darstellung und Verarbeitung der Immunfluoreszenz-Doppelmarkierungen erfolgte mit einem konfokalen Laser-Mikroskop (TCS 4D, Leica). Zur Identifikation der sich grünlich darstellenden FITC-Fluoreszenz wurde eine Anregungswellenlängen von 488 nm verwendet. Die Cy3-Fluoreszenz stellte sich bei einer Anregungswellenlänge von 568 nm rot dar. Die verschiedenen Emissionsspektren der FITC- und Cy3-Fluoreszenz wurden durch entsprechende Filter aufgetrennt und ihre Intensität von getrennten Fotodetektoren simultan gemessen (Lichtwerte 0-255). Die resultierenden Mikrographien hatten eine Größe von 1024 x 1024 Pixel pro Bild. Für quantitative Untersuchungen wurde ein 10x-Objektiv bei konstanter Laserspannung benutzt, wobei hier eine Fläche von 1 mm x 1 mm erfasst wurde. Für höher auflösende Darstellungen wurde ein 20x-, 40x- oder 100x-Objektiv gewählt. Es wurden gleichmäßig 11 aufeinanderfolgende Bilder über eine Gesamtdicke von 30 µm aufgenommen und mit dem Max-Intens-Algorithmus zu einem Bild kondensiert. Dieser Algorithmus wählt aus jedem der 11 korrespondierenden Pixel, mit den jeweils gleichen x-y Koordinaten (insgesamt 1024x1024 Pixel per Bite), den hellsten (mit dem höchsten OLVV) aller 11 Schnittebenen aus und setzt sie zu einem neuen kondensierten Bild wieder zusammen. Ein

solches, nach dem Camera-lucida-Prinzip entstandenes Bild wurde dann im Tagged Image File Format (TIFF) auf einer magnetooptischen Diskette gespeichert.

Aufgrund der zusätzlich auftretenden unspezifischen Autofluoreszenz wurde jeweils an derselben Bildstelle eine zusätzliche Aufnahme bei einer Anregungswellenlänge von 647 nm (Cy5) aufgenommen. Diese Bilddaten wurden in gleicher Weise wie die der FITC- und Cy3-Färbungen kondensiert und im TIFF-Format gespeichert. Die so gewonnenen Cy5-Bilder zeigen die autofluoreszenten Strukturen, welche dann aus den FITC- und Cy3-Aufnahmen extrahiert wurden.

2.1.4.4 Zelltypspezifische Quantifizierung der Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen

Zur Beurteilung der Immunreaktivität der Aktivierungsmarker im Ncl. facialis nach Fazialisaxotomie in IL6- und MCSF-defizienten Mäusen wurden Fluoreszenz-Doppelmarkierungen mit nachfolgender digitaler Bildanalyse unter Verwendung des RISC-Algorithmus (Raivich et al., 1998b) durchgeführt. Bei diesem Algorithmus werden zuerst die gesuchten zellulären Profile in der Mikrographie mit der zellulären Maske (IgG, IBA1 im Cy3-Bild) definiert, um diese dann auf die Mikrographie der Zellart mit der zu quantifizierenden Färbung zu übertragen (FITC-Bild). Dann wurde das Verhältnis des Mittelwertes der Pixel innerhalb der Maske zum Mittelwert aller Pixel im Bild bestimmt. Der Logarithmus dieses Verhältnisses liefert den relativen Färbekoeffizienten. Die Durchführung der Auswertung der Präparate nach dem RISC-Algorithmus erfolgte in OPTIMAS und EXCEL. Im folgenden werden die Rechenschritte im Einzelnen beschrieben.

Für die Quantifizierung der jeweils spezifischen Immunreaktivität (FITC-Bild) auf den Immunglobulin-positiven Mikrogliazellen (Cy3-Bild) wurden die um die Autofluoreszenz korrigierten FITC- und Cy3-Bilder als TIFF in OPTIMAS importiert und mit der „Local Smoothing and Averaging“-Funktion bei einer 100 x 100 Pixel großen Boxgröße geglättet und jeweils die Fläche des Ncl. facialis individuell markiert. Nun wurde im korrigierten Cy3-Bild der Mittelwert (MEAN) und die Standardabweichung (SD) der optischen Lichtwerte

(OLV) der Pixel, die den Ncl. facialis repräsentieren, berechnet. Die zu markierenden zellulären Cy3-Profilen wurden anhand eines Schwellenwertes von $MEAN + SD$ bestimmt. Diese Profil-Maske wurde auf das korrigierte und ebenfalls geglättete FITC-Bild übertragen und hier der Mittelwert der OLV aller Pixel im Ncl. facialis ($MEAN-Ncl. facialis$) und der Mittelwert von den Pixeln innerhalb der Maske ($MEAN-zelluläre Maske$) berechnet. Daraus ergab sich der relative Färbekoeffizienten (RISC), der sich wie folgt berechnet:

$$RISC = \log (MEAN-zelluläre Maske : MEAN-Nucleus facialis)$$

Anschließend wurde die Differenz der relativen Färbekoeffizienten zwischen der jeweils operierten Seite (RISC-Operiert) und der kontralateralen, gesunden Seite als endogene Kontrolle (RISC-Kontrolle) bestimmt. Diese ist ein Maß für die Veränderung der Immunreaktivität des jeweilig getesteten spezifischen Aktivierungsmarkers nach Fazialisaxotomie.

$$DIFF-RISC = (RISC-Operiert) - (RISC-Kontrolle)$$

Die statistische Auswertung der zellulären Immunreaktivität der spezifischen Aktivierungsmarker erfolgte an vier definierten Zeitpunkten nach Fazialisaxotomie (Tage 1, 3, 4, 14). Die relativen Färbekoeffizienten (RISC) der operierten und der kontralateralen Ncl. faciales wurden bei 5 Schnitten von jeweils 3 bis 8 Tieren pro Gruppe nach dem RISC Algorithmus bestimmt, wobei die jeweiligen Berechnungsschritte der Koeffizienten teilautomatisiert durch Programmierung in OPTIMAS und EXCEL erfolgten. Dann wurden die Mittelwerte der Färbeintensitäten getrennt für die operierten und die kontralateralen Seiten errechnet, graphisch aufgetragen und mit einem gepaarten t-Test bei einem Signifikanzniveau von 5% auf statistisch signifikante Unterschiede getestet.

2.1.4.5 Autofluoreszenzextraktion im konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop

Die Anregung der Fluoreszenz im konfokalen Laser-Mikroskop führt in fixiertem Gewebe und hier besonders in phagozytischen Mikrogliazellen und Lipofuszin-körpern der Neurone (Raivich et al., 1998a) auch zur Emission von unspezifischer Fluoreszenz oder Autofluoreszenz. Diese hat ein sehr breitbandiges Spektrum, so dass sie sich zu der spezifischen FITC- und Cy3-Fluoreszenz hinzuaddiert. Die Korrektur der Autofluoreszenz erfolgte entsprechend der Anwendung der linearen Extraktion (Raivich et al., 1998a). Hierbei wurde zur Detektion der autofluoreszenten Strukturen das Präparat mit einer Wellenlänge von 647 nm (Cy5) angeregt, einem Bereich, in welchem die hier verwendeten Farbstoffe FITC und Cy3 nicht mehr emittieren und in dem autofluoreszierende Strukturen gut angeregt werden. Diese Strukturen wurden mit den korrespondierenden Stellen im FITC- und Cy3-Bild in Bezug gesetzt, woraus sich lineare Extraktionskoeffizienten berechneten. Zur Korrektur der Autofluoreszenz wurden unter Berücksichtigung der jeweiligen Extraktionskoeffizienten die optischen Lichtwerte (OLV) der jeweils korrespondierenden Pixel im FITC- und Cy3-Bild abgezogen. Die einzelnen Rechenschritte sollen im folgenden dargestellt werden.

Zunächst wurden die TIFF-Bilder mit der FITC-, Cy3- und der Autofluoreszenz (AF) in Optimas importiert und der Mittelwert ($MEAN_{AF}$) und die Standardabweichung (SD_{AF}) aller Pixel eines AF-Bildes (OM_{AF}) bestimmt. Nun wurden hochautofluoreszente Strukturen (HAFS) im OPTIMAS-Programm durch einen OLV-Schwellenwert aus $MEAN_{AF} + (SD_{AF} \times 2)$ markiert. Der Mittelwert der OLV innerhalb dieser markierten Strukturen wurde als $MEAN_{AF-HAFS}$ berechnet. Die markierten Profile der fluoreszenten Strukturen wurden als Maske in das FITC- und Cy3-Bild (OM_{FITC} , OM_{Cy3}) übertragen, wobei ihre Position dort den hochautofluoreszenten Strukturen im AF-Bild entsprach. Innerhalb dieser Profile wurde nun der OLV-Mittelwert getrennt für das FITC-Bild ($MEAN_{FITC-HAFS}$) und das Cy3-Bild ($MEAN_{Cy3-HAFS}$) berechnet. Anschließend wurde der Mittelwert aller OLV für FITC ($MEAN_{FITC}$) und Cy3 ($MEAN_{Cy3}$) berechnet. Die linearen Extraktionskoeffizienten für FITC (LEK_{FITC}) und Cy3 (LEK_{Cy3}) berechneten sich dann wie folgt:

$$LEK_{FITC} = (MEAN_{FITC-HAFS} - MEAN_{FITC}) / (MEAN_{AF-HAFS} - MEAN_{AF})$$

$$LEK_{Cy3} = (MEAN_{Cy3-HAFS} - MEAN_{Cy3}) / (MEAN_{AF-HAFS} - MEAN_{AF})$$

Die korrigierten FITC- und Cy3-Bilder (KOR_{FITC} und KOR_{Cy3}) wurden dann berechnet, indem auf alle Pixel der originalen FITC- und Cy3-Dateien folgende Formel angewandt wurde:

$$KOR_{FITC} = OM_{FITC} - LEK_{FITC} \times OM_{AF}$$

$$KOR_{Cy3} = OM_{Cy3} - LEK_{Cy3} \times OM_{AF}$$

Die korrigierten Bilder KOR_{FITC} und KOR_{Cy3} wurden als TIFF-Dateien zur weiteren Analyse gespeichert. Die Autofluoreszenzextraktion im konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop wurde durch Programmierung in OPTIMAS und EXCEL halbautomatisch durchgeführt (Kloss et al., 1999).

2.1.5 Immunelektronenmikroskopie

2.1.5.1 Gewebentnahme und -behandlung für Immunelektronenmikroskopie

Zur weiteren Untersuchung der ultrastrukturellen Veränderungen der terminalen Neuritenendigungen an den axotomierten Motoneuronen wurden die Mäuse 7 Tage nach Durchtrennung des N. facialis wie unter 2.1.1 beschrieben in Diethylether getötet. Anschließend wurden die Tiere (n=4 pro Gruppe) mit 150 ml PBS/ 10mM MgCl₂ (Mg-PBS), danach mit 200 ml 2-% Paraformaldehyd und 3.0-% Glutaraldehyd (in Mg-PBS) transkardial perfundiert, der Hirnstamm entnommen, für 2 Stunden in 1-% Paraformaldehyd (in Mg-PBS) bei 4°C nachfixiert, in Agarose eingebettet und mit einem Vibratom in 80 µm dicke Schnitte geschnitten und sofort weiterbehandelt.

Für die elektronenmikroskopische Untersuchung der mikroglialen Nodule wurden die Mäuse 14 Tage nach Durchtrennung des N. facialis in Diethylether getötet und diesmal mit 40 ml PBS/ 10mM MgCl₂ (Mg-PBS), danach mit 200 ml 4-% Paraformaldehyd und 3.0-%

Glutaraldehyd (in Mg-PBS) transkardial perfundiert und entsprechend der oben beschriebenen Schritte weiterverarbeitet.

2.5.1.2 Immunhistochemie für die Elektronenmikroskopie

Die immunhistochemischen Färbungen erfolgten ähnlich wie in der Lichtmikroskopie (siehe 2.1.4.2), jedoch mit einigen Unterschieden. Die Vorbehandlung mit Azeton entfiel. Die Schnitte wurden dann für 4 Stunden bei Raumtemperatur in 5-% Ziegen Serum (in PB) vorinkubiert, um unspezifische Bindungsstellen im Schnitt abzusättigen, und anschließend mit einem primären, monoklonalen Antikörper gegen ICAM1 aus der Ratte (Verdünnung 1:1.000 in PB/BSA) über Nacht bei 4⁰C inkubiert. Die Schnitte wurden nicht an einen Objektträger fixiert, sondern schwammen frei in den Lösungen. Die Lagerung erfolgte auf einem Schütteltisch bei minimaler Umdrehungszahl. Der primäre Antikörper wurde dann in PB/BSA, PB, PB und PB/BSA ausgewaschen und das sekundäre, biotinierte Ziegen Serum gegen Ratten-IgG (Vector) für 8 Stunden bei 4⁰C zugesetzt. Nach erneutem Waschen der Schnitte in PB/BSA, PB/BSA, PB und PB wurden die Schnitte über Nacht mit ABC-Reagenz bei 4⁰C inkubiert. Bei Verwendung des Peroxidasystems mit 3,3'-Diaminobenzidin (DAB), H₂O₂, CoCl₂ und NiSO₄ als Substrate wurde zunächst mit DAB für 20 Minuten bei Raumtemperatur ohne H₂O₂ präinkubiert, anschließend wurde die Peroxidasereaktion in DAB mit 0,25 g/l CoCl₂, 0,2 g/l NiSO₄ und H₂O₂ (1:3000 verdünnt) gestartet und schließlich nach 15 Minuten in Aqua dest. wieder gestoppt. Für weitere 7 Tage wurde das Gewebe bei 4⁰C in 2-% Paraformaldehyd und 3.0% Glutaraldehyd (in Mg-PBS) nachfixiert, dann in Dalton-Lösung 1 (1.1 g K₂Cr₂O₄, 0.9 g NaCl und 1 g OsO₄ in 100 ml Aqua dest., mit 1N KOH auf pH 7 eingestellt) osmiert, in einer Alkoholreihe dehydriert und in Araldit (Fluka) eingebettet. Semidünnschnitte (80 µm) wurden zur lichtmikroskopischen Orientierung mit Toluidin-Blau-Lösung für 4 Minuten gegengefärbt. Des Weiteren wurden der axotomierte sowie der kontralaterale Ncl. facialis aus dem umliegenden Gewebe herausgeschnitten, in Agarose eingebettet und mit einem Vibratom in ultradünne 100 nm dicke Präparate

geschnitten und mit Uranylazetat und Bleizitrat nachkontrastiert. Schließlich wurde das Gewebe mit einem Elektronenmikroskop (Zeiss EM 10 und EM 109) untersucht und fotografiert.

2.1.6 Quantifizierung der Leukozyten im Nucleus facialis

Die immunhistochemische Färbung von infiltrierenden Lymphozyten in den Ncl. facialis nach Axotomie erfolgte mit einem Antikörper gegen CD3 mit der ABC/DAB-Technik (siehe Kapitel 2.1.4.2). Für den Tag 1 wurden pro Versuchstier sieben Schnitte mit einem Abstand von 20 μm (Abstand zwischen den Schnitten jeweils 120 μm) und für den Tag 14 zwei Schnitte (Abstand zwischen den beiden Schnitten jeweils 340 μm) verwendet. Die Verwendung einer höheren Zahl an Gewebsschnitten für den Tag 1 lag an der viel niedrigeren Zahl von T-Zellen zu diesem Zeitpunkt nach Axotomie (5.4 \pm 0.6 von CD3 Zellen pro Gewebeschnitt am Tag 1, 19.0 \pm 1.5 am Tag 14).

2.1.7 Messung von neuronalem Überleben im Nucleus facialis

Zur Quantifizierung der Zahl der überlebenden Motoneurone wurde 60 Tage nach Fazialisaxotomie der ipsi- und kontralaterale Ncl. facialis entnommen (Kapitel 2.1.4.1) und es wurden jeweils 45 Gewebsschnitte mit einer Dicke von 20 μm in caudo-rostraler Schnittrichtung angefertigt. Hierbei wurde das Kerngebiet auf seiner gesamten antero-posterioren Länge von ungefähr 640-700 μm erfasst sowie zusätzlich 100 μm an den sich anschließenden kaudalen und rostralen Schnittenden. Zur histologischen Färbung wurden die Präparate über Nacht an der Luft getrocknet, anschließend über Nacht mit 4-% Paraformaldehyd (Merck, Darmstadt, Deutschland) auf dem gelatinierten Objektträger mittels kovalenter Bindungen fixiert und dann für 24 Stunden in 70-% Alkohol entfettet. Die Schnitte wurden dann für 10 Minuten mit Toluidinblau (Nissl) gefärbt, durch die Alkoholreihe und Xylol

entfettet und nach Bedarf auch mehrmals beim entsprechenden Alkoholschritt in 95% Alkohol/0.1% Eisessig differenziert. Die fertig gefärbten Schnitte wurden in Eukitt eingebettet. Die Zahl der neuronalen Profile (n) wurde in jedem angefertigten Schnitt mit einer angenommenen Schnittdicke von $25\mu\text{m}$ (D) bestimmt und mit der Korrektur nach Abercrombie (Abercrombie, 1946) die Gesamtzahl der Neurone (N) entsprechend des mittleren Zelldurchmessers (d) nach folgender Formel korrigiert:

$$N = n \times D / (D + d)$$

Der mittlere neuronale Zelldurchmesser wurde zuvor aus jeweils drei Schnittpräparaten des Ncl. facialis mit einem Abstand von jeweils $100\mu\text{m}$ und einer Gesamtzahl von 140 bis 220 Neurone auf der operierten Seite und 280 bis 340 Neurone auf der nicht-operierten Seite bestimmt. Hierzu wurden die mit einer Sony 3 CCD Videokamera (AVT-Horn, Aachen, Germany) im 24-bit-RGB-Format digitalisierten Bilder in das Bildverarbeitungsprogramm OPTIMAS 6.2 importiert und die neuronalen Zellprofile unter Verwendung von *Mean - 1.5 x SD-Schwellenwertes* detektiert. Der mittlere Zelldurchmesser wurde dann unter Einbeziehung der mittleren Fläche (Area) mit folgender Formel berechnet:

$$d = \sqrt{(4 \times \text{Area} / \pi)}$$

2.2 Mikroglia in Zellkultur

Eine Verminderung der mikroglialen Ramifizierung ist eine Erscheinung, die in vielen krankhaften Prozessen des Gehirns in Erscheinung tritt und zu einer Transformation in kleine abgerundete Phagozyten in Anwesenheit von neuronalem Debris führt. Die Methode der Wahl besteht hier in der Kultur von stark ramifizierten Mikrogliazellen auf einem konfluenten Astrozytenrasen. Hierdurch lässt sich eine hohe Anzahl von ramifizierten Mikrogliazellen

kultivieren, ohne den hierbei nicht stimulierten Kontrollkulturen unphysiologische Substanzen (DMSO) oder bekannte Makrophagen-Mitogene (MCSF, GMCSF) beifügen zu müssen. Diese Methode wurde erstmals von Sievers beschrieben (Sievers et al., 1994; Schmidtmayer et al., 1994; Tanaka und Maeda, 1996). In den so angelegten Zellkulturen wurden die molekularen Mechanismen untersucht, die an der Regulation der Deramifizierung aktivierter Mikrogliazellen beteiligt sind.

In der folgenden Arbeit wurden Maus-Mikroglia auf Ratten-Astrozyten kultiviert. Im Falle der Verwendung der ursprünglichen Mikroglia aus der Ratte (3%) in Kokultur mit Astrozyten aus der Ratte, werden diese von den proliferierenden Astrozyten überwuchert und auf den Boden der Kulturflasche gedrückt, wodurch Ihre Gestalt dem eines Spiegeleis ähnelt (Kloss et al., 1997, 2001). Bei der Verwendung von Mikroglia aus der Maus auf einem konfluenten Astrozytenrasen hingegen kommt es zum Verbleiben der Mikroglia auf der Oberfläche des Rasens. Die Zellen können sich ramifizieren und mit Antikörper (z.B. 5C6) gegen spezielle Mausantigene (α M β 2 Integrin) selektiv markiert werden. Hierdurch lassen sich Differenzierung und Deramifikation einer einzelnen Zellgruppe, die zu einem bestimmten Zeitpunkt ausgesät wurden, sehr gut erfassen.

2.2.1 Anlage der Zellkultur

2.2.1.1 Primäre Astrozytenkultur aus der Ratte

Für die Kultivierung der Astrozyten wurde die Methode von McCarthy und de Vellis (McCarthy und de Vellis, 1980) mit leichten Veränderungen verwendet. Neugeborene Wistar-Ratten wurden geköpft und das Gehirn entnommen. Die Meningen wurden mit einem Wattetupfer entfernt. Die Kortizes wurden abpräpariert und in Kulturmedium (DMEM, 15-% FCS, 100 IU/ml Penizillin, 100 μ g/ml Streptomycin) aufgenommen. Die Präparation der Tiere und Handhabung der Zellen erfolgte unter sterilen Bedingungen. Hierbei wurden nur sterilisierte oder autoklavierte Instrumente eingesetzt und alle Medien wurden steril filtriert. Als Kulturmedium wurde DMEM mit 15-% FCS verwendet, dem 100 IU/ml Penizillin und 100

$\mu\text{g/ml}$ Streptomycin zur Infektionsprophylaxe der Zellkulturen zugesetzt wurde. Anschließend wurden die Gehirne durch mehrfaches Aufziehen in einer Pasteurpipette homogenisiert. Diese Zellsuspension wurde in einer 75 cm^3 unbeschichteten NUNC (Naperville, IL) Kulturflasche mit Kulturmedium (DMEM, 15-% FCS, 100 IU/ml Penizillin und 100 $\mu\text{g/ml}$ Streptomycin) bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ in einem Gasgemisch aus Raumluft und 5-% CO_2 für 14 Tage in einem Inkubator kultiviert. Alle 2 Tage erfolgte ein Medienwechsel.

Nach 14 Tagen hatten die Astrozyten einen konfluenten Zellrasen gebildet. Die noch vereinzelt auf dem Zellrasen vorhandenen Mikrogliazellen, Oligodendrozyten und Neurone wurden durch mehrfaches Waschen in DMEM und kräftiges Schütteln entfernt. Die so gereinigten Astrozyten wurden mit Trypsin (0,25-prozentig in PBS) abgelöst, in einer Neubauer-Kammer gezählt und auf eine Vier-Kammer-Platte (NUNC) mit einer Einzelkammergröße von $2,2 \times 1,1\text{ cm}$ in einer Dichte von 85.000 Astrozyten/Kammer ausgesät. Die Zellen wurden in Kulturmedium bei 5-% CO_2 gehalten und alle 2 Tage erfolgte ein Mediumwechsel. Nach 4 Tagen waren die Astrozyten zu einem konfluenten Zellrasen zusammengewachsen und standen für Kokulturen mit Mikrogliazellen bereit. Die Reinheit der Astrozytenkulturen wurde immunzytochemisch bestimmt, indem möglicherweise kontaminierende Oligodendrozyten und Mikroglia aus der Ratte sichtbar gemacht wurden. Zum Nachweis von Ratten-Mikroglia wurde der OX42-Antikörper (Serotec, Wiesbaden) aus der Maus in einer Verdünnung von 1: 1000 benutzt. Zur Darstellung der Oligodendrozyten wurde ein Antikörper gegen Galaktozerebroside (GalC, 1:100) (Sigma, Deisenhofen) aus dem Kaninchen verwendet. Es fanden sich in den Astrozytenkulturen aus der Ratte regelmäßig weniger als 3% Mikroglia und weniger als 1,5% Oligodendrozyten.

2.2.1.2 Primäre Mikrogliakultur aus der Maus

Für die Kultivierung der Mikroglia wurde die Methode von Giulian und Baker (Giulian und Baker, 1986) in leicht modifizierter Form verwendet. Neugeborene FVB-Mäuse wurden dekapitiert, das gesamte Gehirn entnommen, in Kulturmedium (DMEM, 15-% FCS, 100 IU/ml

Penizillin, 100 µg/ml Streptomycin) gebracht und durch mehrfaches Aufziehen mit einer Pasteurpipette homogenisiert. Die Zellsuspension wurde in einer 25 cm³ unbeschichteten NUNC Kulturflasche in Kulturmedium (DMEM, 15-% FCS, 100 IU/ml Penizillin, 100 µg/ml Streptomycin) bei 37°C in einem Gasgemisch aus Raumluft und 5-% CO₂ für 14 Tage inkubiert. Ein Mediumwechsel fand an den Tagen 7 und 12 statt.

Anschließend konnte die Mikroglia nach zweistündigem Schütteln auf dem Rotator bei 200 rpm als Überstand abgeerntet werden. Die Zahl der Mikroglia wurde in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Schließlich wurden die Mikrogliazellen auf den konfluenten Astrozytenrasen ausgesät und für weitere 10 bis 14 Tage kultiviert.

2.2.1.3 Ramifizierte Mikroglia in Kokultur

Ein konfluent Astrozytenrasen wurde, wie unter 2.2.1.1 beschrieben angelegt, und hierauf wurde ramifizierte Mikroglia nach einer leicht modifizierten Methode von Sievers kultiviert (Sievers et al., 1994). Hierfür wurden Mikrogliazellen in einer Dichte von 10.000 Zellen pro Zellkammer ausgesät. Die Kokulturen wurden 10 Tage lang in Kulturmedium (DMEM, 15% FCS, 100 IU/ml Penizillin, 100 µg/ml Streptomycin) bei 37 °C in einem Gasgemisch aus Raumluft und 5-%-CO₂ inkubiert und für 14 Tage kultiviert. Das Kulturmedium wurde alle 2 Tage gewechselt.

2.2.1.4 Präparation der Zellmembranen

Für die Zellmembranpräparation von Gehirn, Niere, Leber, Milz und Skelettmuskel aus der Maus wurden die entsprechenden Organe von insgesamt zehn erwachsenen FVB Mäusen mit Hilfe eines Mörsers im Reagenzglas mit dem 10-fachen Volumen eines hypotonischen Phosphatpuffers (10mM Na₂HPO₄, pH 7.4) homogenisiert. Anschließend konnte das Zelldebris nach zweimaligem Abzentrifugieren für jeweils 10 Minuten bei 600 x g verworfen werden, und der Überstand erneut für zwei Stunden bei 50,000 x g zentrifugiert und dann in 4 ml PBS resuspendiert werden. Schließlich wurde die Proteinkonzentration der jeweiligen

Membranpräparation mittels BioRad-Proteinassay (Burlingame, CA) auf 2.5 mg/ ml eingestellt. Zur Identifizierung der Zellen, welche die präparierten Zellmembrane phagozytieren, wurden die jeweiligen Organpräparationen noch für weitere zwei Stunden mit Rhodamine B Isothiocyanate (100 µg/ml) bei 4⁰C inkubiert und dann für mindestens 4x im Wechsel eine Stunde bei 50,000 x g zentrifugiert und dann in PBS resuspendiert, bis der Überstand keine rötliche Tönung mehr zeigte. Dieser Verarbeitungsprozess führt zur Ausbildung von kovalenten Bindungen zwischen dem Fluoreszenzfarbstoff und den Zellmembranen. Schließlich wurden die mit Fluoreszenzfarbstoff konjugierten Zellmembrane mit den unkonjugierten Membranpräparationen in ein 1:1 Mischungsverhältnis gebracht und über einen 5-µm Miliporefilter filtriert.

2.2.1.5 Stimulation der Kokulturen mit Zellmembranen

An den Tagen 10 bis 12 wurden die Kokulturen mit filtrierten Zellmembranen (siehe Kapitel 2.2.3) aus dem Gehirn in einer Konzentration von 0.7-300 µg /ml für eine Dauer zwischen 1 bis 72 Stunden inkubiert. Dies erfolgte zur Bestimmung der Dosis-Wirkungsbeziehung hinsichtlich der deramifizierenden Wirkung der Gehirnmembrane auf die Mikroglia. Zur Kontrolle erhielten parallele Kulturen nur Kulturmedium.

In den Versuchen zur Reramifikation der Mikroglia wurde diese zunächst mit 20 µg/ml Gehirnmembrane für 48 Stunden inkubiert, dann erfolgte ein zweimaliger Mediumwechsel (DMEM/FCS) für jeweils 5 Minuten und eine nochmalige Inkubationsdauer der Kokulturen zwischen 1 bis 96 Stunden in diesem Medium.

In einem weiteren Versuch wurde die deramifizierende Wirkung von nicht-biologischen Stimuli untersucht. Hierfür wurden die Kulturen mit Fluorobeads (FluoroB), bei welchen es sich um 1 µm große Latexkügelchen handelt, bis hin zu einer maximalen Dosis von $10^6 \times 10^6$ pro Zellkulturkammer inkubiert. Einen Teil der mit FluoroB inkubierten Kokulturen wurde

zeitgleich Gehirnmembrane in aufsteigender Dosis zugesetzt, um eine mögliche gegenseitige Hemmung zu untersuchen.

2.2.1.6 Stimulation der Kokulturen mit pharmakologisch wirksamen Substanzen

An den Tagen 10 bis 12 wurden die Kokulturen für 48 Stunden mit Calcium-Ionophore Calcimycine (A-23187/Sigma), Dibutyryl-cAMP (Sigma), Dibutyryl-cGMP (Sigma), Okadaic Acid (Sigma), Pertussis toxin (Sigma), Prostaglandin D2 (Sigma), Forskolin (Sigma), Fibronectin (Sigma), Thrombin (Sigma), Keratansulfat (Sigma), Kistrin (Sigma), Echistatin (Sigma), Flavoridin (Sigma), UTP (Sigma) oder den zyklischen Peptiden CRGDSPASSC/FR-1,cyclic RG-DdFV, GRGDSP, GRADSP oder GRGDTP (alle von Calbiochem) mit einem Volumen von 0.5 ml pro Zellkammer inkubiert. Diese Moleküle wurden auf ihre Fähigkeit untersucht, als mögliche Vermittler in der Umwandlung von Mikroglia in Makrophagen zu fungieren.

2.2.2 Immunzytochemie

2.2.2.1 Immunzytochemie mit Diaminobenzidin (DAB)

Zur immunhistochemischen Darstellung der spezifischen Antigene auf der Zelloberfläche der Mikroglia wurde das Kulturmedium durch -20°C kaltes 50%-Methanol (in H_2O bidest.) ersetzt und die Kulturen wurden für 30 Minuten bei 4°C fixiert und in Phosphat-Puffer (PB) gewaschen. Währenddessen wurden die Kammeraufbauten von den Objektträgern der verwendeten Vier-Kammer-Platten entfernt. Dann wurden die Zellen 5 Minuten durch Fixation in 4% Paraformaldehyd (in PB gelöst) kovalent an den Objektträger gebunden und für weitere 30 Minuten bei Raumtemperatur in 5% Ziegen Serum inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Anschließend wurde das Serum abgenommen und den Kulturen zur Detektion der $\alpha\text{M}\beta 2$ -Integrine der primäre Antikörper 5C6 (Serotec, Wiesbaden, Deutschland) aus der Ratte verdünnt in PB/BSA (PB mit 1 g/L BSA) zugesetzt. Die Kulturen wurden über Nacht bei 4°C inkubiert, dann in PB/BSA, PB und PB gewaschen und

schließlich in PB/BSA gesammelt. Zur weiteren Markierung wurde ein biotinierter, sekundärer Antikörper aus Ziege gegen Ratten-IgG zugegeben (1:100 in PB/BSA; Vector, Wiesbaden, Deutschland). Nach 1 Stunde Inkubation bei Raumtemperatur wurden dann die Antikörper gründlich in PB/BSA, PB/BSA, PB und PB ausgewaschen um schließlich das gesuchte Antigen mit dem Avidin-Biotin-Peroxidasesystem sichtbar zu machen. Dazu wurden die Kulturen mit ABC (1:125 verdünnt) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Das ABC wurde dann in PB, PB und PB ausgewaschen und die Kulturen wurden in PBS gesammelt. Jetzt wurde die Reaktion durch Zusatz von gelösten 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) als Substrat unter Reduktion von H_2O_2 (0.01 % für 5 Minuten) gestartet, nach 5 Minuten durch Aqua dest. abgestoppt und die Schnitte in Aqua dest. gewaschen. Hierbei wurde ein unlöslicher rot-bräunlicher Niederschlag sichtbar. Alle Kulturen wurden abschließend in einer Alkoholreihe (Ethanol 70%, 70%, 90%, 95%, 100%, 100%; Isopropanol 100%, 100%; Xylol 100%, 100%) entfettet und mit KAISERS Glyceringelatine eingebettet. Die Präparate wurden dann mit einem Zeiss Axiophot Mikroskop mit einem 20 x Objektiv und einem Leica Silverscan 3.1 Scanner aufgenommen. Die Auflösung beträgt 2,570 x 2,570 Bildpunkte und liefert pro Bildpunkt (Pixel) einen Farbwert im 8-Bit RGB-Format. Das digitalisierte Bild wurde mit Hilfe eines Computers und einer Image Technology OFG Karte (VP-1 100-768) in das Bildverarbeitungsprogramm OPTIMAS eingelesen.

2.2.2.2 Immunzytochemische Fluoreszenz-Doppelmarkierungen

Zur zellulären Darstellung der Fluorobeats oder der mit Rhodamin markierten Gehirnmembrane kamen Fluoreszenz-Doppelmarkierungen zum Einsatz. Hierfür wurden Antikörper gegen das $\alpha\beta_2$ -Integrin als Marker für die Mikroglia und Antikörper gegen das saure Gliafaserprotein (GFAP) als Astrozytenmarker verwendet. Für immunhistochemische Doppelmarkierungen wurden die Zellkulturkammern zunächst wie unter 2.2.2.1 beschrieben

behandelt, jedoch erfolgte die Präinkubation mit 5% Esel-Normalserum in PB. Die Schnitte wurden simultan mit den primären monoklonalen Antikörpern über Nacht bei 4°C inkubiert (siehe Tabelle 6) und dann in PB/BSA, PB, PB und PB/BSA gewaschen. Anschließend erfolgte eine Inkubation mit dem entsprechenden Fluoreszein-5-Isothiocyanat (FITC)-konjugierten Antiserum gegen Ratten- oder Hasen-IgG (1:100 in PB/BSA) aus der Ziege für eine Stunde bei RT (siehe Tabelle 7). Nach erneutem Waschen in PB/BSA, PB, PB und PB wurden die Schnitte mit einem tertiären FITC-konjugierten Antiserum gegen Ziegen-IgG (1:100 in PB/BSA) aus dem Esel für 2 Stunden bei RT inkubiert und nochmals in PB/BSA, PB, PB und PB gewaschen. Schließlich wurden die Schnitte mit Vectashield eingedeckelt und bei 4°C in der Dunkelheit bis zum weiteren Gebrauch aufbewahrt. Die resultierenden digitalen Mikrographien mit einer Größe von 1024 x 1024 Pixel pro Bild wurden mit einem konfokalen Laser-Mikroskop (TCS 4D, Leica) unter Verwendung eines 40x, 63x oder 100x Objektivs gemacht. Die Identifikation der sich grünlich darstellenden FITC-Fluoreszenz erfolgte bei einer Anregungswellenlängen von 488 nm. Die Rhodamin-Fluoreszenz stellte sich bei einer Anregungswellenlänge von 568 nm rot dar. Die Emissionsspektren der FITC- und Rhodamin-Fluoreszenz wurden durch entsprechende Filter aufgetrennt und ihre Intensität von getrennten Fotodetektoren simultan gemessen (Lichtwerte 0-255).

2.2.3 Quantifizierung der Deramifikation der Mikroglia

Die Mikroglia konnte anhand der $\alpha\beta 2$ -Immunzytochemie identifiziert werden. Als ramifizierte Mikroglia wurden Zellen mit wenigstens zwei Fortsätzen gewertet, die wenigstens einen halben Zellkörper lang sein mussten, wobei mindestens ein Fortsatz länger war verglichen mit dem Durchmesser des Zellkörpers (Tanaka und Maeda, 1996; Kloss et al., 1997). Als nicht-ramifizierte Zellen wurden die Zellen gewertet, welche diese Kriterien nicht erfüllten. Für jede Kammer eines Objektträgers wurde die Zahl der nicht-ramifizierten Zellen in wenigstens vier zufällig gewählten Gesichtsfeldern mit insgesamt wenigstens 120 5C6-positiven Zellen und einer Objektivvergrößerung von 20x ausgewertet. Das Verhältnis der

Zahl aller ramifizierten Mikrogliazellen zu den nicht-ramifizierten Mikrogliazellen wurde mit Mittelwert und Standardabweichung von jeweils drei identisch behandelten Zellkulturkammern bestimmt und graphisch aufgetragen.

2.3 Material

2.3.1 Antikörper, Seren, Immunreagentien

Tabelle 5. Primäre monoklonale Antikörper

<i>Antigen</i>	<i>Wirt</i>	<i>Spezifität/ Klon</i>	<i>Verd.</i>	<i>Azeton</i>	<i>Hersteller, Herkunft</i>
$\alpha 5$ Integrin	Maus	Ratte BMA5	1:2.000	-	Chemicon, Temecula, CA, USA
$\alpha 5$ Integrin	Maus	Ratte 5H10-27	1:2.000	-	Pharmingen, San Diego, CA, USA
$\alpha 6$ Integrin	Maus	Ratte MA6	1:1.000	+	Chemicon, Temecula, CA, USA
$\alpha 6$ Integrin	Maus	Ratte GoH3	1:3.000	+	Serotec, Kidlington, England
αL Integrin	Ratte	Maus/M 1714	1:300	-	Pharmingen; San Diego, CA, USA
αM Integrin	Ratte	Maus/5C6	1:6000	+	Serotec; Kidlington, England
$\alpha M\beta 2$ Integrin	Ratte	Maus/OX42	1:1000	-	Serotec; Kidlington, England
αX Integrin	Hamster	Maus/N418	1:100	+	Endogen; Woburn, CA, USA
B7-2	Ratte	Maus/GL-1	1:3000	+	Pharmingen; San Diego, CA, USA
CD3	Ratte	Maus/28001D	1:2000	+	Pharmingen; San Diego, CA, USA
GFAP	Ratte	Maus/zym13-0300	1:100	+	Zymed, Bad Homburg, BRD
ICAM-1	Ratte	Maus/KAT-1	1:6000	+	Serotec; Kidlington, England
MHC-1	Ratte	Maus/ER-HR52	1:100	+	Dianova; Hamburg, BRD

Tabelle 6. Primäre polyklonale Antikörper

<i>Antigen</i>	<i>Wirt</i>	<i>Spezifität/ Klon</i>	<i>Verd.</i>	<i>Azeton</i>	<i>Hersteller, Herkunft</i>
CGRP	Kaninchen	Ratte	1:400	+	Peninsula; Belmont CA, USA
Galanin	Kaninchen	Ratte	1:400	+	Peninsula; Belmont CA, USA
GalC	Kaninchen		1:100		Sigma, Deisenhofen, BRD
GFAP	Kaninchen	Rind	1:5000	+	Dako; Hamburg, BRD
IBA1	Kaninchen	Maus	1:400	+	Dr. Imai, Tokyo, Japan
Laminin	Kaninchen	Maus	1:1000	+	Dianova; Hamburg, BRD
MCSFR	Kaninchen	Maus	1:6000	+	UBI, Lake Placid, NY, USA
TSP	Kaninchen	Maus	1:6000	+	Alexis, Grünewald, BRD

Tabelle 7. Sekundäre Antikörper

Spezifität	Wirt	Konjugat	Verd.	Hersteller,- Herkunft
Ig, Hamster	Ziege	Biotin	1:100	Dianova; Hamburg, BRD
Ig, Hamster	Ziege	FITC	1:100	Dianova; Hamburg, BRD
Ig, Kaninchen	Ziege	Biotin	1:100	Vector; Wiesbaden, BRD
Ig, Kaninchen	Esel	Biotin	1:100	Dianova; Hamburg, BRD
IgG, Maus	Pferd	Peroxidase	1:400	Vector; Wiesbaden, BRD
Ig, Ratte	Ziege	Biotin	1:100	Vector; Wiesbaden, BRD
Ig, Ratte	Ziege	FITC	1:100	Sigma; Deisenhofen, BRD
Ig, Ziege	Esel	FITC	1:100	Dianova; Hamburg, BRD

Normalseren

Wirt	Hersteller,- Herkunft
Esel	Vector; Wiesbaden, BRD
Ziege	Vector; Wiesbaden, BRD
Maus	Sigma; Deisenhofen, BRD
Pferd	Vector; Wiesbaden, BRD

Weitere Reagentien

Produkt	Firma	Herkunft
DePeX (Gurr®)	BDH Lab.S.	Pool, England
DMEM	Life Tech.	Eggenstein, BRD
DTT	Merck	Darmstadt, BRD
KAISERS Glyzeringelatine	Merck	Darmstadt, BRD
OCT	Sakura	Zoechterwoude,NL
Tyramin, biotiniliert	Dupont	
VectaShield	Vector	Wiesbaden, BRD
Vectorstain® ABC Kit	Vector	Wiesbaden, BRD

2.3.2 Lösungen, Puffer

Barnett-Fixativ:

0,5% Gluteraldehyd, 50 mM Na-Cacodylat, 250 mM D-Glucose Monohydrat, Mit H_3PO_4 auf pH 7,4 titriert

Diaminobenzidin/ H_2O_2 (DAB/ H_2O_2):

0,5 g/l Diaminobenzidin, 0,01% H_2O_2

Elektronen-Mikroskopie-Phosphat- gepufferte Salz Lösung (EM-PBS):

10 mM Na_2HPO_4 , 10 mM MgCl_2 , 8,4 g/l NaCl, Mit H_3PO_4 auf pH 7,4 titriert

EM-Perfusionsfixativ (EM-FA):

40 g/l Paraformaldehyd, warm in in NaOH gelöst, mit H_3PO_4 auf pH 7,4 titriert, 10 mM Na_2HPO_4 , 10 mM MgCl_2 , 8,4 g/l NaCl, gefiltert

Gefrierschutz-Saccharose Lösung:

30% Saccharose, 10 mM Na_2HPO_4 , mit H_3PO_4 auf pH 7,4 titriert

Gelatine Lösung:

0,5 g/l Gelatine in bi-distilliertem Wasser

Kulturmedium:

Dulbeccos Modifiziertes Eagle Medium (DMEM) mit 15% fötales Kälberserum (FCS), 100 IU/ml Penizillin, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Streptomycin

PB / BSA:

1 g/l Rinderserum-Albumin in PB

Perfusionsfixativ (FA):

40 g/l Paraformaldehyd, warm in NaOH gelöst, mit H_3PO_4 auf pH 7,4 titriert, 10 mM Na_2HPO_4 , 8,4 g/l NaCl gefiltert

Phosphat-Puffer (PB):

100 mM Na_2HPO_4 , mit H_3PO_4 auf einen pH von 7,4 titriert

Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS):

10 mM Na_2HPO_4 , 8,4 g/l NaCl, Mit H_3PO_4 auf pH 7,4 titriert

Post-Fixierung:

1 Teil Perfusionsfixativ, 3 Teile PBS (1 % FA Final-Konzentration)

2.3.3 Kulturmedien und –zusätze

Produkt	Firma	Herkunft
ATP (Adenosintri-phosphorsäure)	Sigma	Deisenhofen, BRD
Calcium Ionophore Calcimycine (A-23187)	Sigma	Deisenhofen, BRD
cyclic RG-DdFV (Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val)	Calbiochem	Bad Soden, BRD
Dibutyryl-cAMP (N ⁶ :2'-O-Dibutyryl-adenosin-3':5'-zyklisches Monophosphat)	Sigma	Deisenhofen, BRD
Dibutyryl-cGMP	Sigma	Deisenhofen, BRD
Dulbeccos Modifiziertes Eagle Medium	GIBCO	Tulsa, OK, USA
Echistatin	Sigma	Deisenhofen, BRD
Fibronectin	Sigma	Deisenhofen, BRD
Flavoridin	Sigma	Deisenhofen, BRD
Fluorosphere Latex Beads	Molecular Probes	Eugene, OR, USA
Forskolin	Sigma	Deisenhofen, BRD
FR-1 (H-Cys-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro-Ala-Ser-Ser-Cys-OH)	Calbiochem	Bad Soden, BRD
GRADSP (H-Gly-Arg-Ala-Asp-Ser-Pro-OH)	Calbiochem	Bad Soden, BRD
CRGDSPASSC (=cyclo-1)	Calbiochem	Bad Soden, BRD
GRGDTP (H-Gly-Arg-Gly-Asp-Thr-Pro-OH)	Calbiochem	Bad Soden, BRD
GRGDSP (H-Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro-OH)	Calbiochem	Bad Soden, BRD
Kälberserum, fötales	GIBCO	Tulsa, OK, USA
Keratansulfat	Sigma	Deisenhofen, BRD
Kistrin	Sigma	Deisenhofen, BRD
Kulturflaschen	NUNC	Naperville, IL, USA
Okadaic Acid	Sigma	Deisenhofen, BRD
Penizillin	Sigma	Deisenhofen, BRD
Pertussistoxin	Sigma	Deisenhofen, BRD
Petrischalen	NUNC	Naperville, IL, USA
Prostaglandin D2	Sigma	Deisenhofen, BRD
Rhodamine B Isothiocyanate	Sigma	Deisenhofen, BRD
Streptomycin	Sigma	Deisenhofen, BRD
Thrombin	Sigma	Deisenhofen, BRD
UTP (Uridintriphosphat)	Sigma	Deisenhofen, BRD
Vier-Kammer-Kulturobjektträger, Permanox	NUNC	Naperville, IL, USA

2.3.4 Chemikalien

Produkt	Firma	Herkunft
ABC-Kit	Vector	Wiesbaden, BRD
Araldit	FLUKA	Basel, Schweiz
Azeton	Merck	Darmstadt, BRD
Azur 11	Merck	Darmstadt, BRD
Bleizitrat	Leica	Bensheim, BRD
D-19 Entwickler	Eastman Kodak	Rochester, NY, USA
Diaminobenzidin (3-3'-Diaminobenzidin)	Sigma,	Deisenhofen
Diethylether	Merck	Darmstadt, BRD
Ethanol	Merck	Darmstadt, BRD
Paraformaldehyd	Merck	Darmstadt, BRD
Gelatine	Merck	Darmstadt, BRD
Glutaraldehyd	Merck	Darmstadt, BRD
Isopropanol	Merck	Darmstadt, BRD
Perhydrol (H ₂ O ₂)	Merck	Darmstadt, BRD
Kobaltchlorid (CoCl ₂)	Merck	Darmstadt, BRD
Kochsalz (NaCl)	Merck	Darmstadt, BRD
Methylenblau	Merck	Darmstadt, BRD
Natriumdihydrogenphosphat	Merck	Darmstadt, BRD
Natriumhydrogenphosphat	Merck	Darmstadt, BRD
Nickelsulfat (NiSO ₄)	Merck	Darmstadt, BRD
NTB2 Filmemulsion	Eastman Kodak	Rochester, NY, USA
Tribromethanol	Sigma	Deisenhofen, BRD
Rinderalbumin	Sigma	Deisenhofen, BRD
Saccharose	Merck	Darmstadt, BRD
Tetanal fixative	Eastman Kodak	Rochester, NY, USA
Uranyl-Azetat	Leica	Bensheim, BRD
Xylol	Merck	Darmstadt, BRD

3. Ergebnisse

3.1 MCSF im verletzten Nervensystem

Das Glykoprotein MCSF, ein Homodimer mit einem Molekulargewicht von 45-90 kDA, ist ein potentes Mitogen für monozytäre Vorläuferzellen (Roth et al., 1992), amöboide Makrophagen des Gehirns (Giulian et al., 1988; Sawada et al., 1990) sowie für ramifizierte Mikroglia (Kloss et al., 1997). Während der posttraumatischen Zellproliferation der Mikroglia im Rahmen von verschiedenen pathologischen Veränderungen des Gehirns kommt es zu einer selektiven und starken Induktion des MCSF-Rezeptors (MCSFR) auf diesen Zellen (Raivich et al., 1998b; Du Yan et al., 1997; Hulkover et al., 1993).

MCSF-defiziente osteopetrotische Mäuse gewähren wichtige Einblicke für die Rolle dieses Zytokins im verletzten ZNS. Hier kommt es durch eine natürliche „frame shift“-Mutation im Anfangsteil des kodierenden Bereiches im MCSF-Gen auf dem Chromosom 5q33.1 (Yoshida et al., 1990) zu einem vollständigen Fehlen dieses Wachstumsfaktors (Wiktor-Jedrzejczak et al., 1990). Nach Fazialisaxotomie führt diese Defizienz bei den homozygoten op/op-Tieren zu einer 70 bis 80% Reduktion der mikroglialen Proliferation, verglichen mit den phänotypisch normalen Kontrollen (Raivich et al., 1994). Bisher war jedoch unklar, wie die Regulation dieses proinflammatorischen Zytokines an den morphologischen Veränderungen der Mikroglia nach Verletzungen des ZNS beteiligt ist.

3.1.1 Morphologische Veränderungen der Mikroglia bei MCSF-defizienten Tieren

Das Fehlen von MCSF in den homozygoten, osteopetrotischen Mäusen (op/op) führte zu einer Reihe von Veränderungen der Mikroglia im normalen Gehirn und in der frühen mikroglialen Antwort nach Verletzung. In den phänotypisch normalen Mäusen kam es nach Axotomie des N. facialis zu einer schnellen Zunahme der Zahl von Mikroglia im axotomierten Kerngebiet. Im Vergleich zu der unoperierten Seite gab es eine starke, ungefähr dreifache Zunahme der mikroglialen Zellzahl am Tag 3 (Abb. 7), bei Nachweis der Immunreaktivität

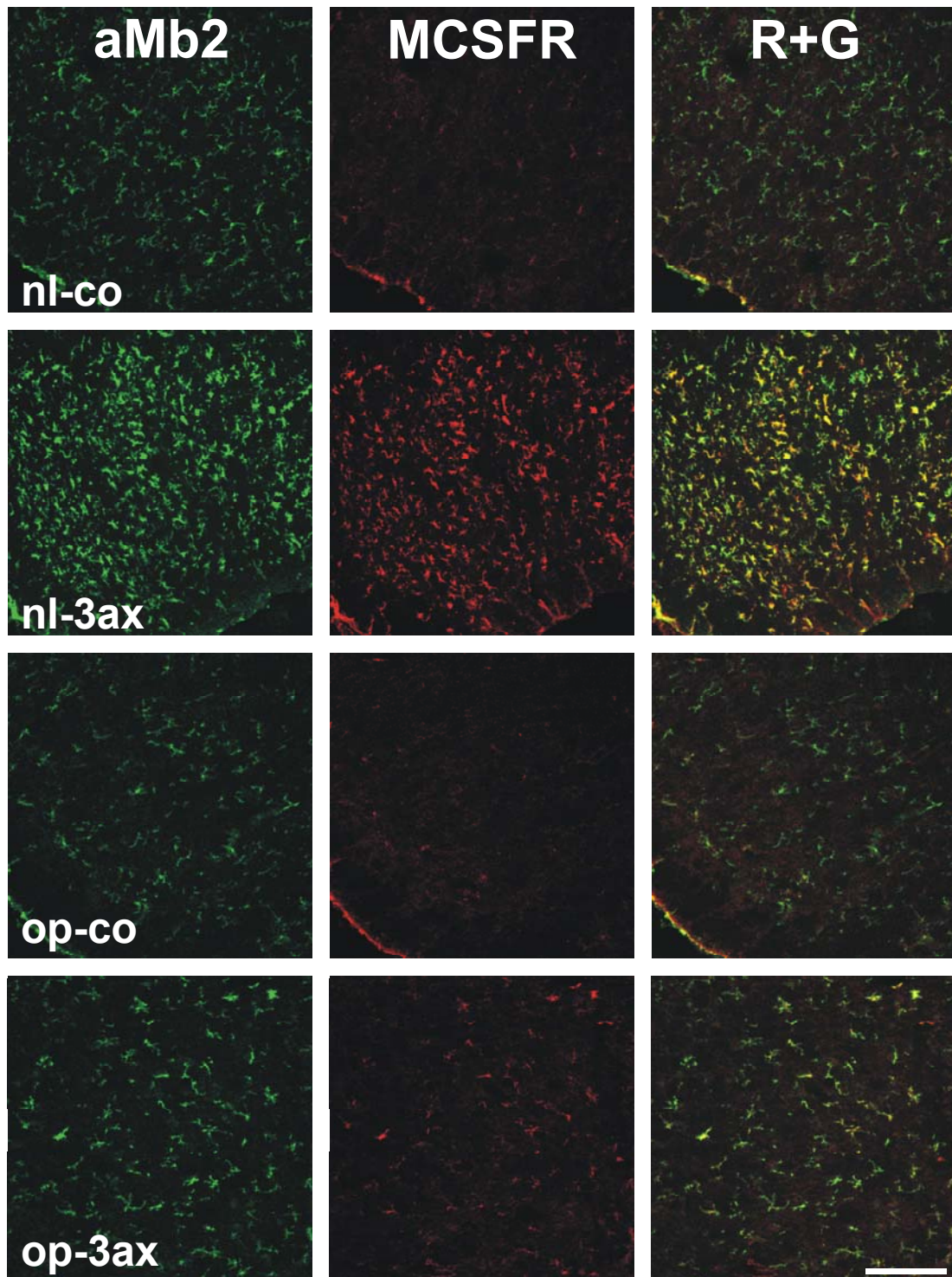


ABBILDUNG (7). Immunfluoreszenz-Doppelmarkierung gegen das $\alpha M\beta 2$ -Integrin ($\alpha M\beta 2$; grün) und den Rezeptor für MCSF (MCSFR; rot). Mikrogliale Antwort im motorischen Fazialiskern der Maus 3 Tage nach Axotomie (3ax) in normalen (nl) und in MCSF-defizienten Mäusen (op/op), im Vergleich zum unoperierten, kontralateralen Fazialiskern (co). Die Kolokalisation beider Marker stellt sich in gelber Farbe dar (R+G; rechte Spalte). In normalen Mäusen führt die Fazialisaxotomie (nl-3ax) zur deutlichen Proliferation der $\alpha M\beta 2$ -positiven-Mikroglia und zu einer starken Zunahme der MCSFR und $\alpha M\beta 2$ -Immunreaktivität, verglichen mit der kontralateralen Seite (nl-co). Die op/op Tiere zeigen eine verminderte $\alpha M\beta 2$ -Immunreaktivität der Mikroglia im gesamten Gehirn, und ebenfalls im kontralateralen Nucleus facialis (op-co). In den MCSF-defizienten Mäusen zeigt sich nach Axotomie eine verminderte Zunahme der Immunreaktivität für den MCSFR und der Zahl an Mikroglia (op-3ax). Maßstabsbalken = 200 μm .

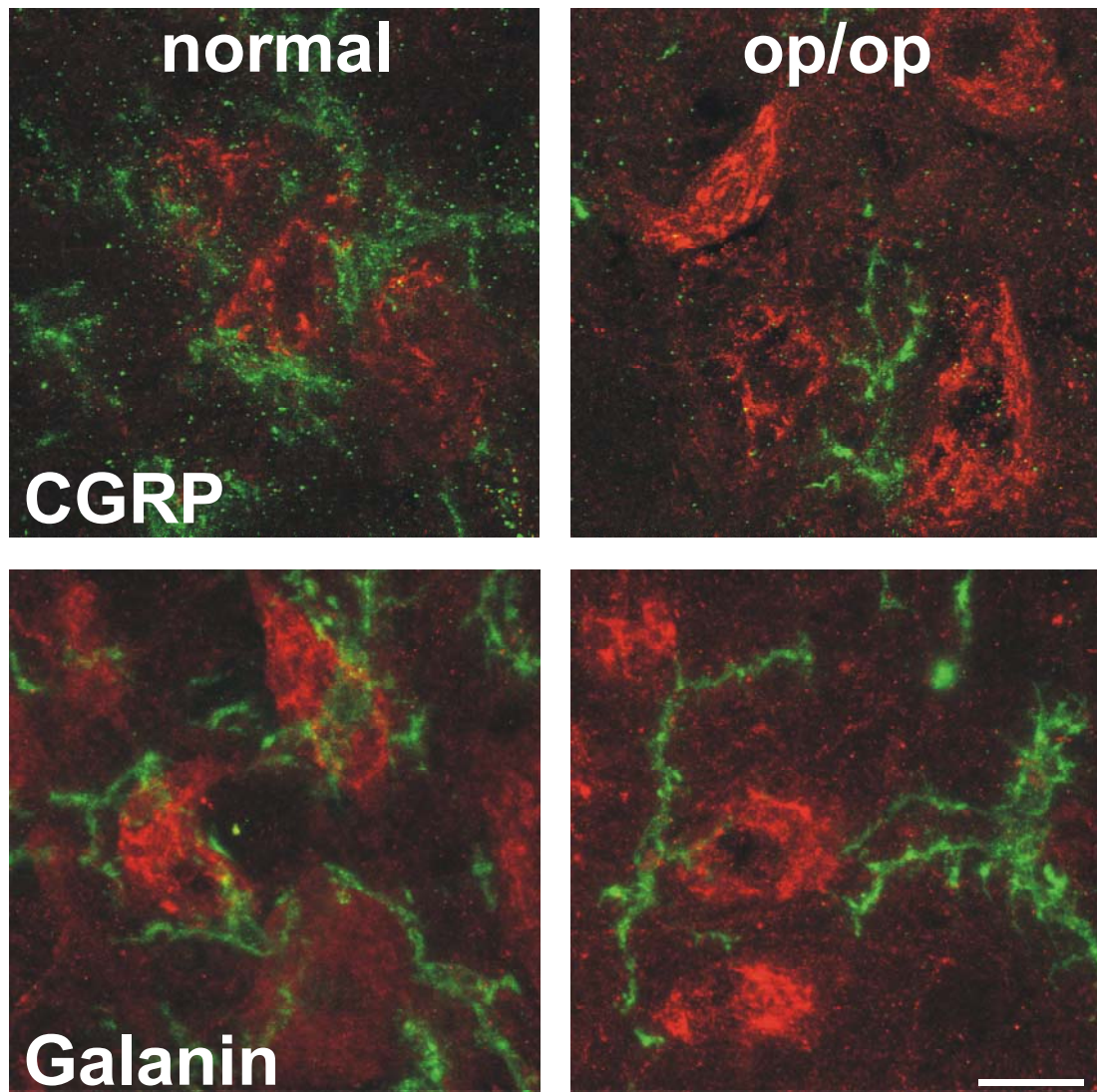


ABBILDUNG (8). Immunfluoreszenz-Doppelmarkierung gegen das $\alpha M\beta 2$ -Integrin ($\alpha M\beta 2$; grün) und CGRP oder Galanin (rot). Mikrogliale Bindung an die axotomierten Neurone (CGRP/Galanin; rot) im motorischen Fazialiskern der Maus 4 Tage nach Axotomie in normalen (nl) und in MCSF-defizienten Mäusen (op/op). In normalen Mäusen kommt es zur ausgedehnten breitbasigen Bindung der zahlreich aktivierten $\alpha M\beta 2$ -positiven-Mikroglia an die axotomierten Neurone. Die op/op Tiere zeigen nur vereinzelte Kontakte zu den Neuronen und keine Ausdehnung auf deren Oberfläche. Maßstabsbalken = 10 μm .

für das $\alpha M\beta 2$ -Integrin, einem konstitutiv exprimierten Zellmarker für Mikroglia (Perry et al., 1985; Raivich et al., 1994). Im Vergleich zu den normalen Tieren war die Zahl der $\alpha M\beta 2$ -positiven Mikroglia in den op/op Mäusen geringer und wies größere zelluläre Ausläufer im unverletzten Gehirn auf, mit einer deutlich geringeren Zunahme der mikroglialen Zellzahl nach Axotomie (Abb. 7). Beide Beobachtungen sind in Einklang mit einer vorhergehenden Studie, die bei MCSF-defizienten Tieren eine 40% Verringerung der mikroglialen Zellezahl im

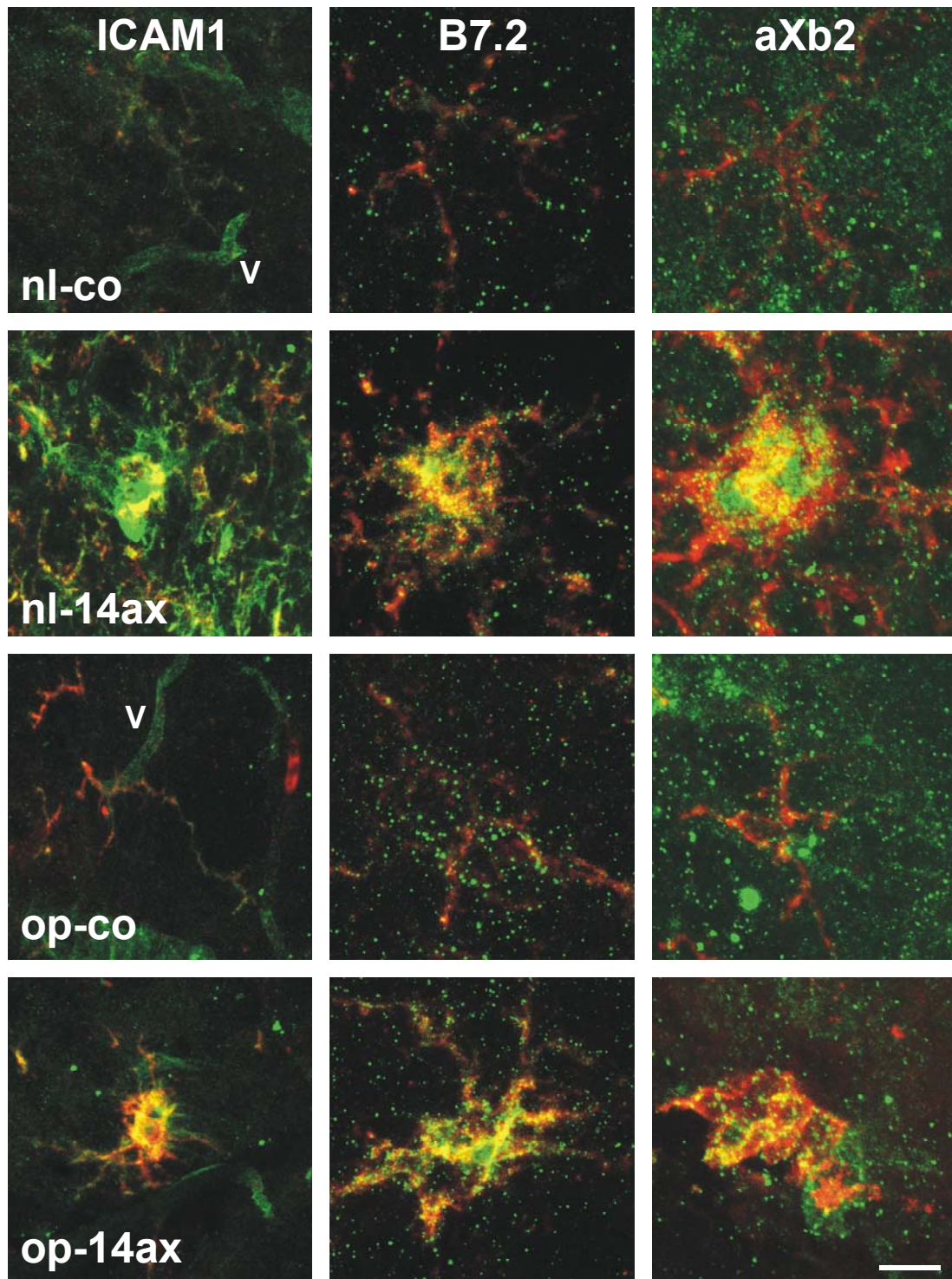


ABBILDUNG (9). Immunfluoreszenz-Doppelmarkierung für die kostimulatorischen Faktoren ICAM-1, B7.2, $\alpha X\beta 2$ -Integrin (ICAM-1, B7.2, $\alpha X\beta 2$; grün) und IgG-positiver Mikroglia (IgG; rot). Mikrogliale Antwort im motorischen Fazialiskern der Maus 14 Tage nach Axotomie (14ax) in normalen (nl) und in MCSF-defizienten Mäusen (op/op), im Vergleich zum unoperierten, kontralateralen Fazialiskern (co). Die Kolokalisation der jeweiligen Marker mit IgG-positiver Mikroglia stellt sich in gelb-oranger Farbe dar. Die op/op Tiere zeigen keine veränderte Expression dieser späten mikroglialen Aktivierungsmarker. Im kontralateralen Ncl. facialis findet sich nur eine sehr niedrige Expression der kostimulatorischen Faktoren. Zusätzlich findet sich ICAM-1 Immunreaktivität auf dem Gefäßendothel (V). Maßstabsbalken = 10 μm .

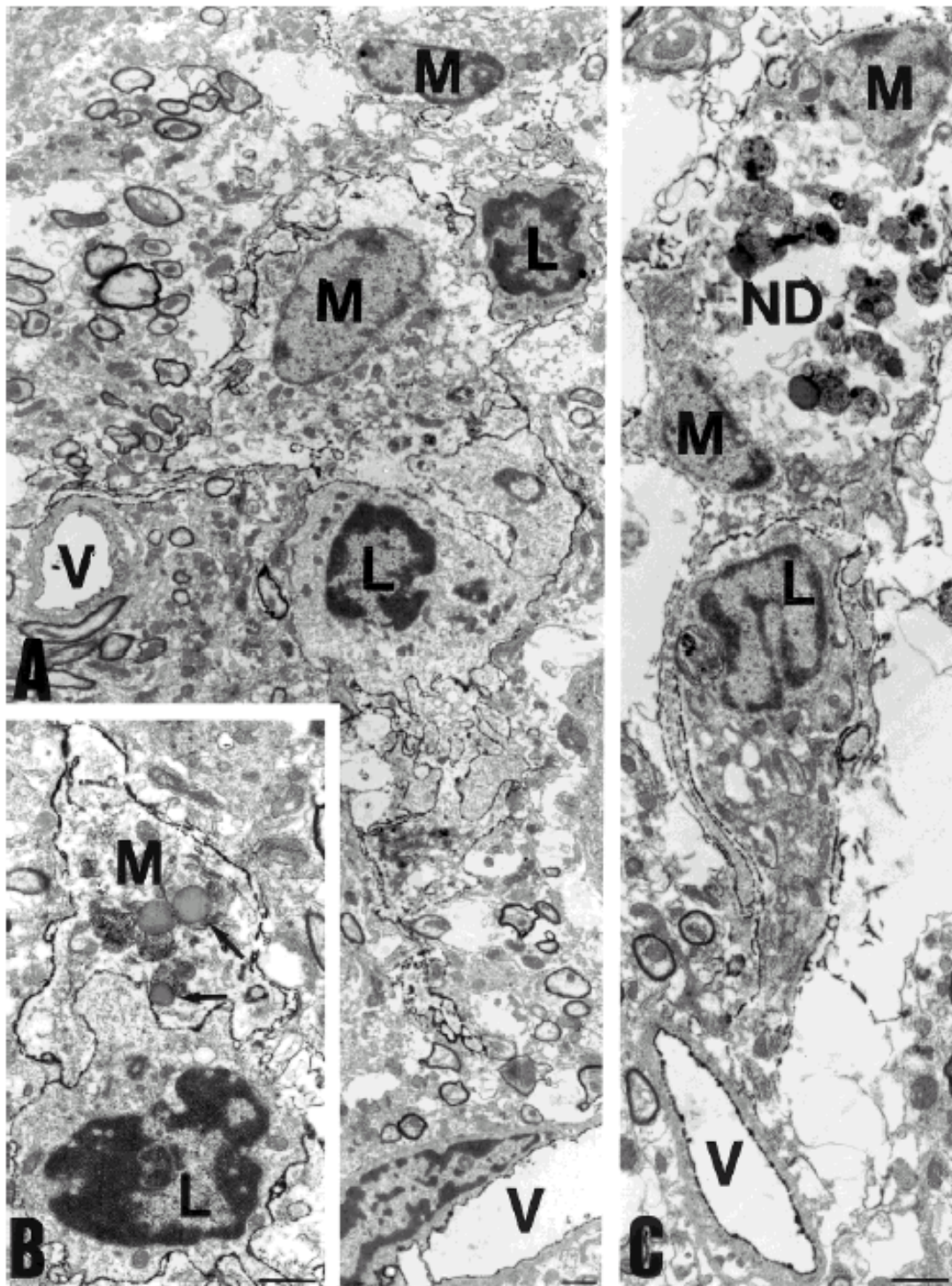


ABBILDUNG (8). Ultrastrukturelle Lokalisation der ICAM-1-Immunoreaktivität auf mikroglialen Nodulen im regenerierenden Ncl. facialis bei MCSF-defizienten (A,B) und normalen Mäusen (C). Die Elektronenmikrographie zeigt 14 Tage nach Axotomie eine starke membranöse ICAM-1-Immunoreaktivität auf mikroglialen Zellen (M), adhärenz Lympozyten (L) und der luminalen Oberfläche der Gefäßendothelzellen (V). B: Ausgeprägte Kontakte zwischen einem Lympozyten und einem mikroglialen Prozess, welcher zahlreiche phagosomale Nukleolen enthält (Pfeile). C: In der normalen Maus zeigen die von Mikroglia umgebenden Nodulen ebenfalls eine große Menge an neuronalem Debris (ND). Die Lympozyten zeichnen sich durch einen eingefalteten Zellkern und ein elektronendurchlässiges Zytoplasma aus. Maßstabsbalken = 1.0 μm .

normalen Fazialiskern und eine 70-80% Abnahme der Proliferation der Mikroglia nach Verletzung zeigen konnte (Raivich et al., 1994).

Besonders auffällig waren die Unterschiede im Adhäsionsverhalten zwischen den MCSF-normalen und MCSF-defizienten Mikroglia nach Fazialisaxotomie. Normale aktivierte mikrogliale Zellen adhärten an verletzte Motoneurone und brachten ihren Zellkörper an die Oberfläche dieser CGRP- oder Galanin-positiven Neurone (Abb. 8). Das Maximum dieser Mikroglia-neuronalen Adhäsion lag zwischen Tag 4 und Tag 7 nach Axotomie. Auch bei den MCSF-defizienten Tieren, konnte man Mikroglia-neuronale Kontakte beobachten (Abb. 8). Allerdings brachte die Mikroglia ihren Zellkörper nicht in direkte Apposition zu der Oberfläche der verletzten Neurone. Statt dessen beschränkte die MCSF-defiziente Mikroglia ihre neuronalen Kontakte auf eine kleine Anzahl von fokalen Adhäsionsstellen.

Im Rahmen des neuronalen Zelltodes, mit einem Maximum am Tag 14, kommt es zu einer Umwandlung der benachbarten Mikroglia in phagozytotische Zellen, die neurales Debris entfernen und so genannte mikrogliale Knötchen ausbilden (Abb. 9, 10). Zu diesem und späteren Zeitpunkten sah man hier keinen auffallenden Unterschied in der Zahl oder Form der phagozytotischen mikroglialen Knötchen zwischen den MCSF-defizienten, op/op Tieren und den phänotypisch normalen Mäusen.

3.1.2 Quantitative Veränderungen der mikroglialen Adhäsionsmoleküle und anderer Aktivierungsmarker

Mikrogliale Aktivierung im axotomierten Fazialiskern erfolgt durch eine Reihe von Schritten (siehe Abbildung 2, Seite 8) aus der ruhenden Mikroglia (Stadium 0), mit der initialen Aktivierung (Stadium 1, Alarm), Zielfindung und Adhäsion (Stadium 2), Phagozytose in Anwesenheit von neuralem Debris (3a) und Aktivierung der umgebenden, nicht-phagozytischen Mikroglia (3b). Wie in vorhergehenden Studien gezeigt werden konnte, werden diese verschiedenen Aktivierungszustände durch verschiedene spezifische Antigene auf der Mikroglia definiert, die mit Hilfe der Immunreaktivität gegen α M β 2, Maus IgG oder

IBA1 und einer doppelten Immunfluoreszenz für die passende Aktivierungsmarker quantitativ bestimmt werden können (Werner et al., 1998; Kloss et al., 1999).

Bei der ruhenden nicht-aktivierten Mikroglia kam es in den MCSF-defizienten op/op-Tieren, verglichen mit den phänotypisch normalen Kontrollen, bei IBA1 zu einer deutlichen, 50% Abnahme der quantitativen Immunreaktivität im unverletzten, kontralateralen Fazialskern (Abbildung 11), wie auch in benachbarten Teilen des Gehirns. Alle anderen hier gemessenen mikroglialen Marker zeigten keine signifikanten Veränderungen im unverletzten Fazialskern zwischen den MCSF-defizienten und normalen Tieren (Abbildungen 11,12).

Die frühe mikrogliale Aktivierung nach Fazialisaxotomie ist durch die Induktion von α M β 2, TSP und IBA1 innerhalb der ersten 24 Stunden nach Verletzung gekennzeichnet. Wie in Abbildungen 11A-C und 12 gezeigt, weist die quantitative Immunfluoreszenz für diese drei Marker deutlich niedrigere Werte im axotomierten Kerngebiet der op/op Mäuse auf.

Nach der initialen Aktivierung kommt es zu der Adhäsion der Mikroglia an die verletzten Neuronen 3-4 Tage nach Axotomie. Dieser Vorgang wird durch die Expression der mikroglialen Adhäsionsmoleküle α 5 β 1-Integrin, α 6 β 1-Integrin und des MCSF-Rezeptors begleitet (Raivich et al., 1998a; Kloss et al., 1999). Die meisten dieser mikroglialen Marker waren im axotomierten Kerngebiet der op/op Mäuse verringert.

Wie in Abbildung 11 gezeigt wird, gab es eine statistisch signifikante Verminderung in der Zunahme der Zahl der MCSF-Rezeptoren am Tag 3 (Abb. 11F) und des α 5 β 1-Integrins am Tag 4 (Abb. 11H). Das mikrogliale α 6 β 1-Integrin war ebenfalls reduziert, wobei die Abnahme nicht statistisch signifikant war (Abb. 11I). Die Abnahme der Immunreaktivität für TSP (Tag 3) und Maus IgG (Tag 4) war in den MCSF-defizienten Tieren signifikant (Abb. 11D,11G).

Der Untergang von verletzten Motoneuronen, mit einem Maximum am Tag 14 nach Verletzung (Möller et al., 1996), führt zu einer weiteren Umwandlung der benachbarten Mikroglia in phagozytotische Zellen, die mikrogliale Knötchen bilden (Abb. 9, 10). Dies ist von einer Umgebungsaktivierung der umliegenden nicht-phagozytotischen Mikroglia begleitet, die große Mengen von TSP, B7.2, ICAM1 und des α M β 2-Integrins exprimieren (Raivich et al.,

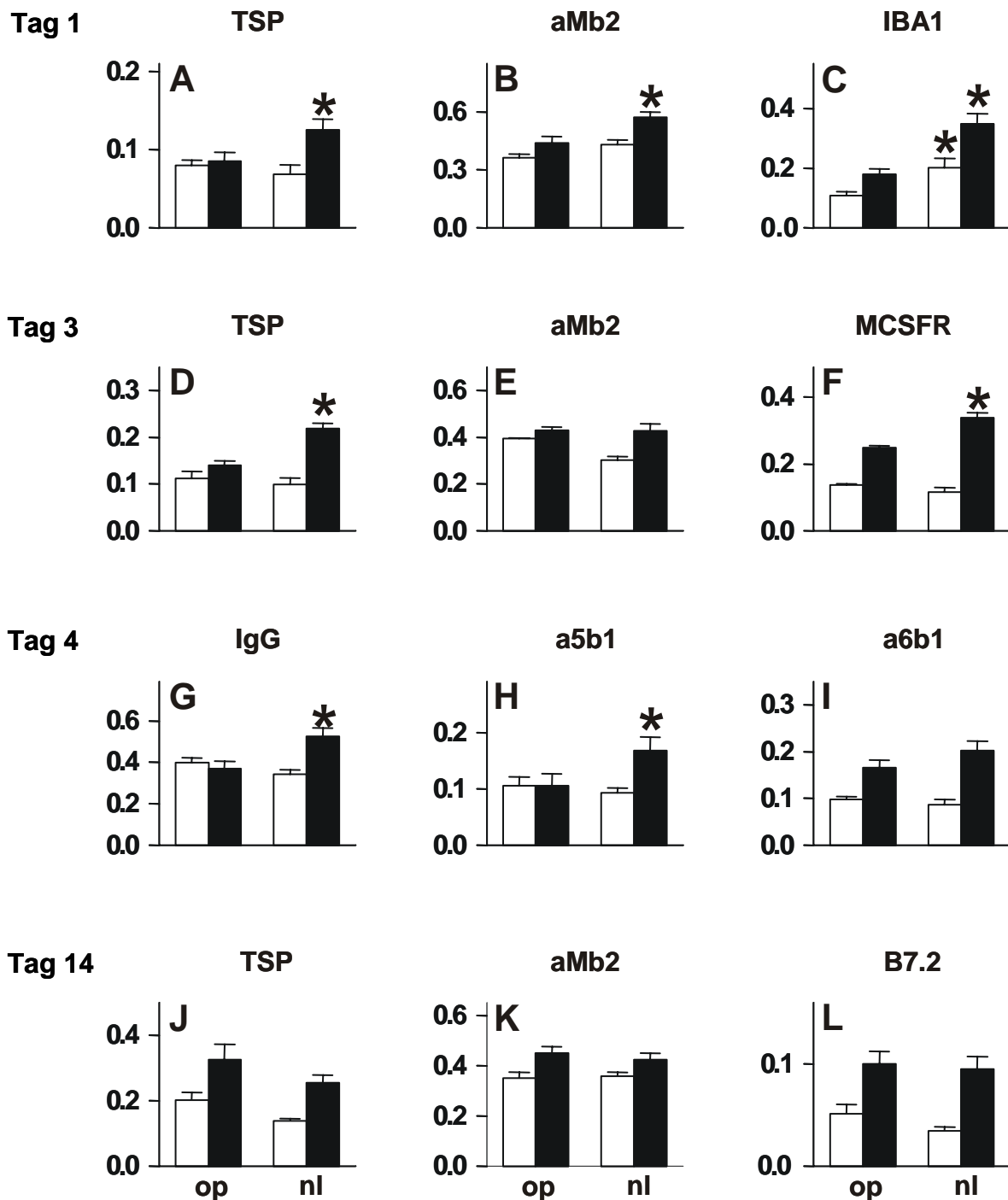


Abbildung 11). Quantitative Einflüsse von MCSF-Defizienz auf mikrogliale Aktivierungsmarker am Tag 1 (A-C), Tag 3 (D-F), Tag 4 (G-I) und Tag 14 (J-L). Verglichen wurden normale (nl) und MCSF-defiziente Mäuse (op/op) nach Fazialisaxotomie. Es zeigt sich am Tag 1 ein statistisch signifikanter Anstieg der Immunoreaktivität für TSP, α M β 2 und IBA1 (*; P < 0,05, ungepaarter t-test; n = 3-8 Tiere pro Gruppe). Am Tag 3 und 4 ein statistisch signifikanter Anstieg der Immunoreaktivität für die mikroglialen Marker (TSP, MCSFR, IgG, α 5 β 1). Ein nicht signifikanter Anstieg zeigte sich für α M β 2 und α 6 β 1 am Tag 3 und 4, sowie für die Marker α M β 2, TSP, B7.2 am Tag 14. Der Färbefaktor wurde mit dem DIFF-RISC-Algorithmus bestimmt. Dargestellt sind jeweils der axotomierte Ncl. facialis (schwarzer Balken) und die contralaterale Seite (weißer Balken).

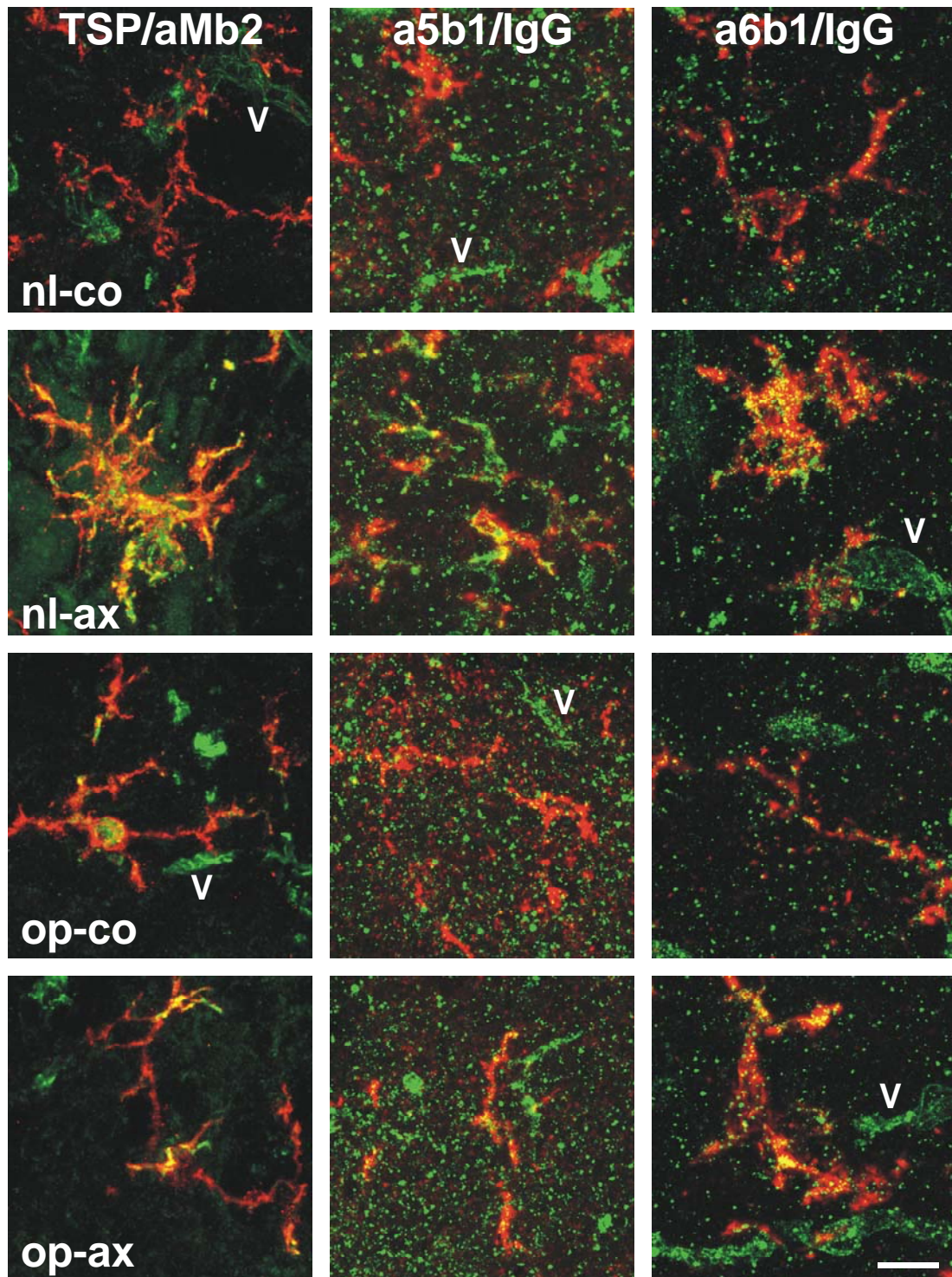


ABBILDUNG (12). Adhäsionsmoleküle in der frühen Phase der mikroglialen Aktivierung.

Immunfluoreszenz-Doppelmarkierung auf Mikroglia für TSP (grün) mit α Mb2 (rot) am Tag 1 sowie für α 5 β 1 und α 6 β 1 (grün) mit mikroglialer Maus-IgG (rot) am Tag 4. Die mikrogliale Antwort im motorischen Fazialiskern der Maus an den Tagen 1 und 4 Tage nach Axotomie (ax) führt in den normalen (nl) Tieren zu einer deutlichen Zunahme der Immunoreaktivität für die Adhäsionsmoleküle TSP, α 5 β 1 und α 6 β 1 auf der aktivierten Mikroglia. In MCSF-defizienten Mäusen (op/op) sind die Zunahme und morphologischen Veränderung dieser Marker deutlich schwächer ausgeprägt. Alle drei Adhäsionsmoleküle (TSP, α 5 β 1, α 6 β 1a) finden sich auch in der Regel auf den Gehirngefäßen (V). Maßstabsbalken = 10 μ m.

1999). Mit ungefähr 50 Zellen in den op/op-Tieren und 200 Zellen in den Kontrolltieren pro Gewebeschnitt am Tag 14, sind diese aktivierten Zellen bei weitem zahlreicher als die mikroglialen Knötchen (2-3 pro Gewebeschnitt) und bilden somit einen Großteil der gesamten mikroglialen Immunreaktivität. Im Gegensatz zur frühen und mittleren Aktivierung (Phase 1,2) war die quantitative Zunahme in der Immunreaktivität der mikroglialen Marker für TSP, B7.2, und $\alpha\text{M}\beta\text{2}$ im axotomierten Ncl. facialis am Tag 14 in den MCSF-defizienten Tieren nicht signifikant verschieden von der in den phänotypisch normalen Kontrollen (Abb. 11J-L).

3.1.3 Zelluläre Lokalisation des MCSF-Rezeptors

Um die möglichen Ziele von MCSF im verletzten zentralen Nervensystem zu prüfen, wurde eine Doppelimmunofluoreszenzfärbung des MCSF-Rezeptors (MCSFR) im axotomierten Fazialiskern 14 Tage nach Durchtrennung des Nerv mit unterschiedlichen, Zelltyp-spezifischen Markern durchgeführt. Mikrogliale Zellen wurden mit $\alpha\text{M}\beta\text{2}$, Astrozyten mit GFAP und T-Zellen mit CD3 markiert. In der Abbildung 13 A,B zeigt sich, dass nur auf der $\alpha\text{M}\beta\text{2}$ -positiven Mikroglia eine Immunreaktivität für den MCSFR nachgewiesen werden konnte. Die meisten mikroglialen Knötchen waren stark MCSFR-positiv, aber es gab auch eine Unterklasse von $\alpha\text{M}\beta\text{2}$ -positive Knötchen, die keine Immunreaktivität für den MCSFR zeigten (Abb. 13A). Neurone und GFAP-positive Astrozyten waren durchgehend MCSFR-negativ (Abb. 13B, C). Dieses Fehlen der MCSFR Immunoreaktivität traf auch auf die CD3-positiven T-Zellen zu, die an den MCSFR-positiven mikroglialen Knötchen hafteten (Abb. 13D).

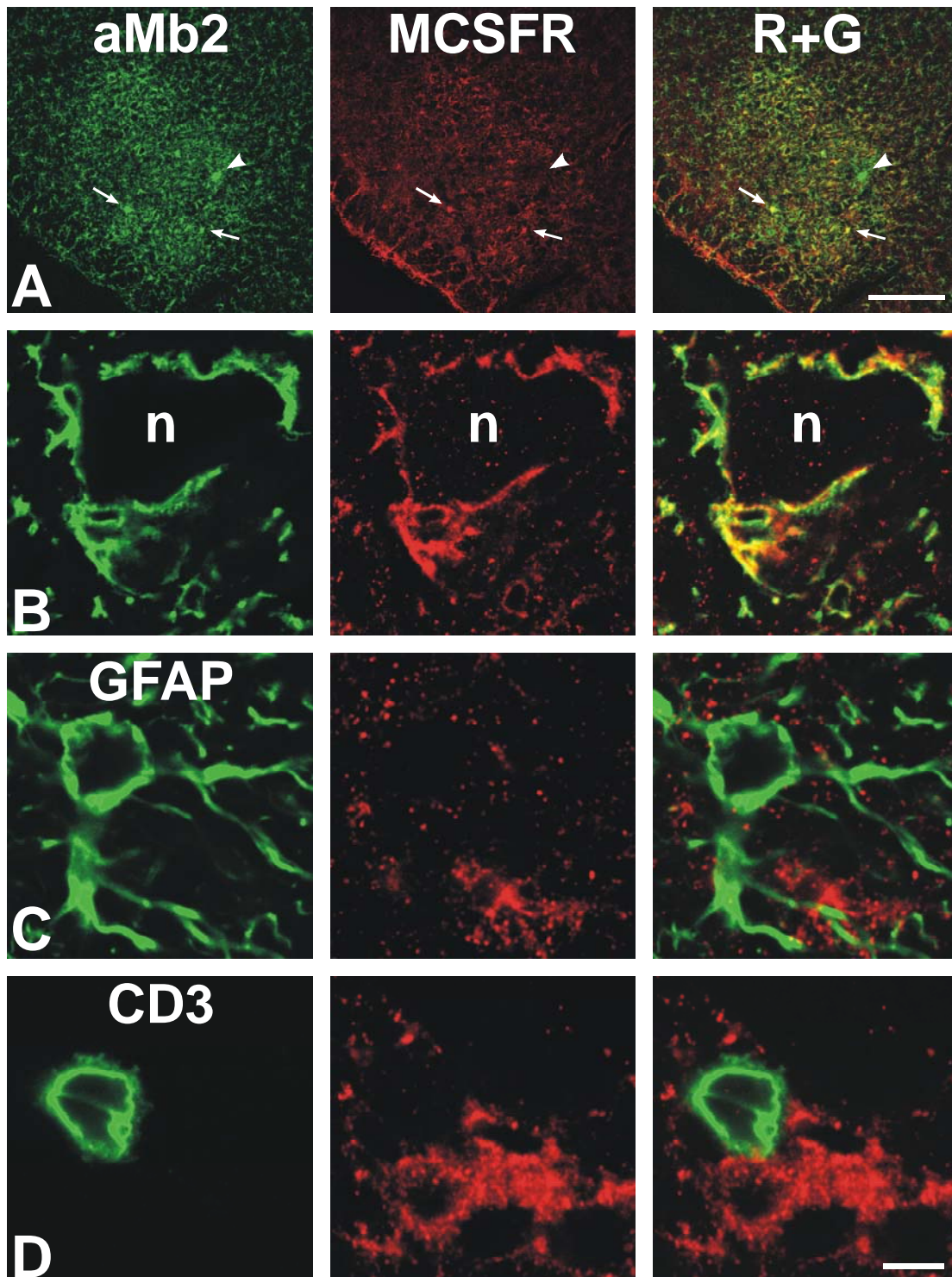


ABBILDUNG (13). Zelluläre Lokalisation der MCSF-Rezeptor-Immunreaktivität (MCSFR; rot) im Nucleus facialis 14 Tage nach Axotomie. Immunfluoreszenz-Doppelmarkierung für Mikroglia (α M β 2), Astrozyten (GFAP), und T-Zellen (CD3) in grüner Farbe. Die Kolokalisation der Mikroglia (A,B) mit der MCSF-Immunreaktivität stellt sich in gelber Farbe dar (R+G; rechte Spalte). Astrozyten (C) und T-Zellen (D) weisen keine Immunreaktivität für den MCSF-Rezeptor auf. Die Mehrheit der mikroglialen Nodule ist stark MCSFR-positiv (A; Pfeile), wobei einige keine MCSFR-Immunreaktivität aufweisen (A; Pfeilkopf). CD3-positive Lymphozyten adherieren an MCSFR-positive Nodule (D). Maßstabsbalken = 250 μ m (A). Maßstabsbalken = 5 μ m (B-D).

3.1.4 Rekrutierung von Lymphozyten nach Fazialisaxotomie

Die Fazialisaxotomie führt zu zwei unterschiedlichen Phasen der Infiltration von T-Lymphozyten in das verletzte Kerngebiete. In der ersten Phase kommt es 1-4 Tage nach Verletzung zu einer mäßigen Erhöhung der Lymphozytenzahl; um in einer zweiten Phase zu einer viel stärkeren Zunahme mit einem Maximum am Tag 14 zu führen (Raivich et al., 1998b).

Wie in Abbildung 14 gezeigt wird, führte der MCSF Mangel in den op/op Mäusen zu einer geringeren Zunahme der Zahl an CD3-positiven T-Zellen am Tag 1, mit einer 60% Verringerung der Differenz zwischen axotomierter und kontralateraler Seite ($P < 0.01$ im zweiseitig-ungepaarten T-Test). Die Infiltration der CD3-positiven Zellen auf der unoperierten, kontralateralen Seite wurde durch den MCSF Mangel nicht beeinflusst.

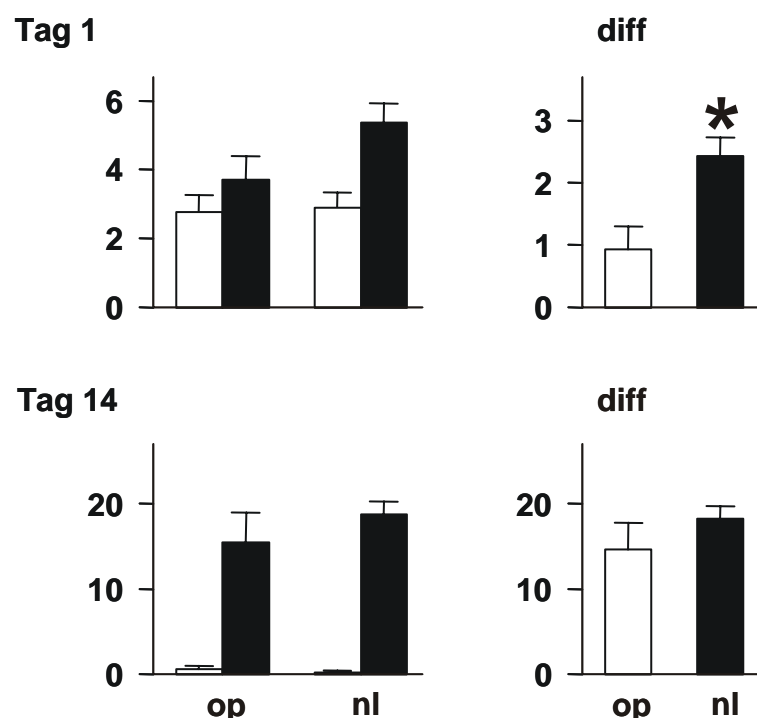


Abbildung (14). Leukozyten-Rekrutierung im Nucleus facialis an den Tagen 1 und 14 nach Axotomie bei MCSF-defizienten Tieren (op) und Kontrollen (nl). Links: Gesamtzahl der CD3-positiven T-Zellen pro Schnittpräparat des Ncl. facialis. Dargestellt sind jeweils der axotomierte Ncl. facialis (schwarzer Balken) und die kontralaterale Seite (weißer Balken). **Rechts:** Differenz (=diff) zwischen axotomierter Nucleus facialis (schwarzer Balken) und der kontralateralen Seite (weißer Balken). In den MCSF-defizienten Mäusen (op/op), zeigt sich am Tag 1 eine 60% Reduktion der Invasion der CD3-positiven T-Zellen verglichen mit normalen Mäusen (nl). Am Tag 14 besteht kein statistisch signifikanter Unterschied in der Rekrutierung von Leukozyten zwischen MCSF-defizienten Tieren und Kontrollen ($P < 0.01$, ungepaarter t-test; n (Tag 1) = 9 Tiere pro Gruppe, n (Tag 14) = 9 Tiere pro Gruppe).

Am Tag 14 kam es zu einer weiteren Zunahme der Zahl an infiltrierenden CD3-positiven Zellen in den axotomierten Fazialiskern (ungefähr 3.5x größer als am Tag 1). Hier kam es allerdings zu keiner statistisch signifikanten Verringerung der T-Lymphozyten in den op/op Tieren, verglichen mit den phänotypisch normalen Kontrollen (Abb. 14).

3.1.5 Neuronale und astrozytäre Antwort nach Fazialisaxotomie

3.1.5.1 Entfernung präsynaptischer Endigungen durch Astrozyten

Die Axotomie des N. facialis verursacht eine Reihe biochemische Änderungen in den sich regenerierenden Neuronen und in den benachbarten Astrozyten. In den betroffenen Neuronen kam es zu einer Zunahme der Neuropeptide CGRP und Galanin (Abb. 15).

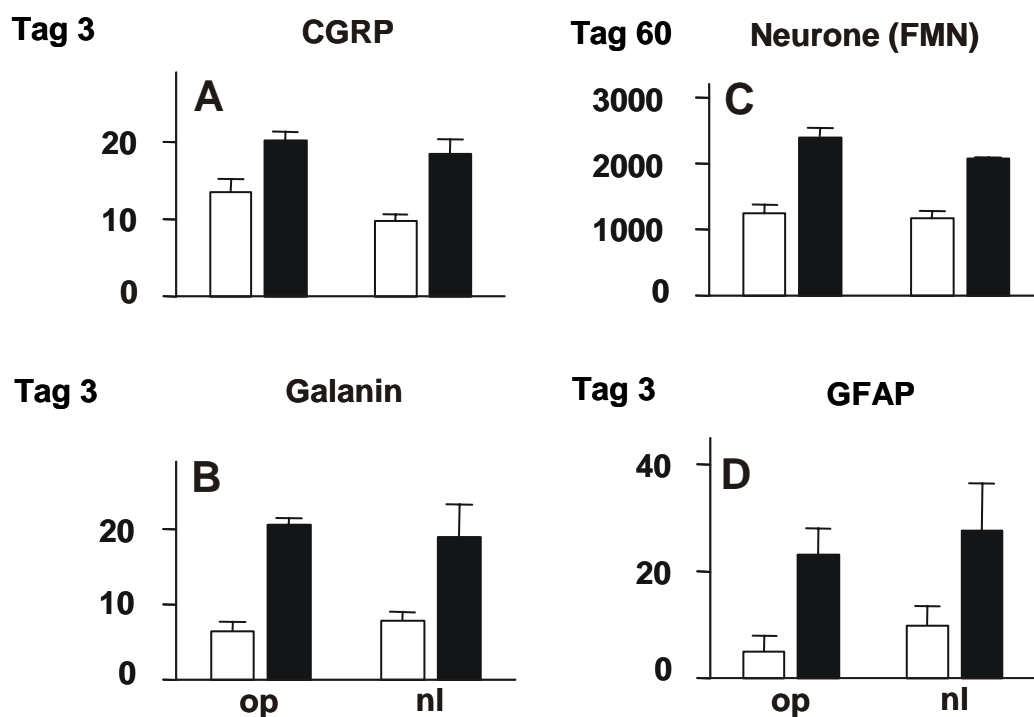


Abbildung (15). Quantifizierung von biochemischen Markern im Ncl. facialis an den Tagen 3 und 60 nach Axotomie bei MCSF-defizienten Tieren (op) und Kontrollen (nl) für neuronale Aktivierung (A, B), astrozytäre Aktivierung (D) und neuronales Überleben (C). Fazialisaxotomie führt zu einer Zunahme der Immunreaktivität für CGRP und Galanin in den axotomierten Neuronen, sowie zu einer vermehrten GFAP-Immunreaktivität in den aktivierten Astrozyten (Tag 3; n=3 Tiere pro Gruppe). In den MCSF-defizienten Mäusen (op/op), zeigt sich am Tag 60 eine 45% Reduktion der Neurone (=FMN; 5 Tiere pro Gruppe), wobei dies im Vergleich zu den Kontrollen nicht statistisch signifikant ist. Dargestellt sind jeweils der axotomierte Ncl. facialis (schwarzer Balken) und die kontralaterale Seite (weißer Balken).

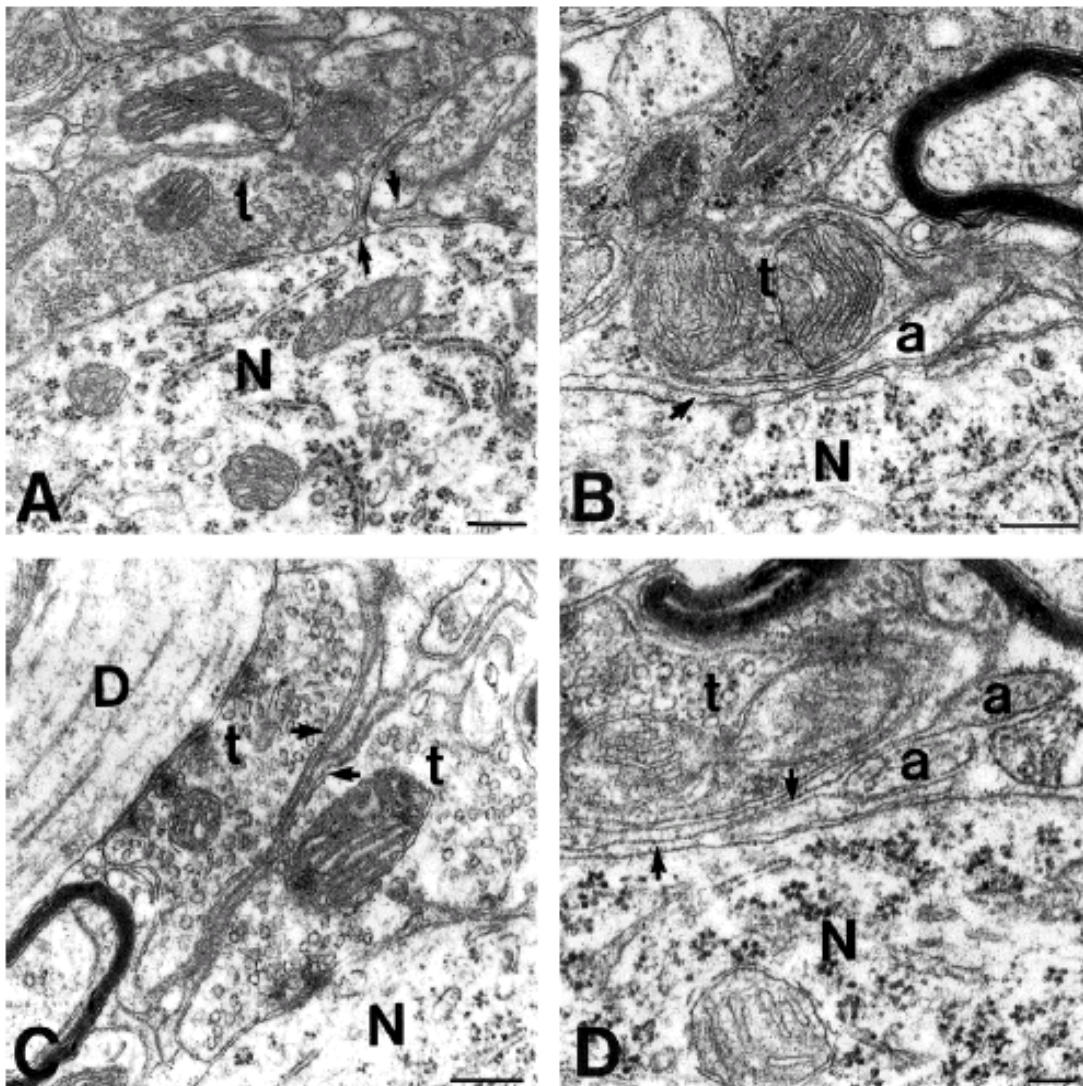


ABBILDUNG (16). Ultrastrukturelle Veränderungen an der neuronalen Oberfläche 7 Tage nach Axotomie im regenerierenden Ncl. facialis bei normalen (A,B) und MCSF-defizienten Mäusen (C,D). A,C: Auf der unoperierten Seite des Ncl. facialis zeigen sich in der Elektronenmikrographie dünne Astrozytenlamellen (Pfeile), welche häufig zwischen Neuritenendigungen (t) zu finden sind, jedoch nicht zwischen Neuronen (N) und Endigungen von Neuriten. B,D: Im regenerierenden Ncl. facialis kommt es zu einem Loslösen der Neuritenendigungen von der neuronalen Zelloberfläche und einer Insertion von Astrozytenendigungen (a) und – Lamellen (Pfeile). Diese Veränderungen finden sich gleichermaßen in normalen und op/op-Tieren. Maßstabsbalken = 250 nm (A-C),. 100 nm (D).

Die benachbarten Astrozyten zeigen eine erhöhte Immunreaktivität für das Zytoskelettprotein GFAP (Abb. 15), einem Marker für reaktive Astrozyten der grauen Substanz. Keine dieser Markierungen wurde durch den MCSF Mangel in den op/op Mäusen beeinflusst.

In der Frühphase der mikroglialen Aktivierung kommt es 1-4 Tage nach der Axotomie zur Adhäsion der Mikroglia an die geschädigten neuronalen Zellkörper und zur Reduktion des synaptischen Input der Motoneurone durch Besetzung perineuronaler Positionen („synaptic stripping“, Blinzinger und Kreuzberg, 1968; Werner et al., 1998). Im weiteren Verlauf werden die aktivierten Mikrogliazellen von Astrozyten verdrängt, die nun die Oberfläche der Neurone mit mehreren feinen Lamellen bedecken (Graeber und Kreuzberg, 1988).

In den op/op Mäusen, wie auch in normalen Mäusen, zeigte sich 7 Tage nach Durchtrennung des N. facialis jeweils das Bild des „synaptic stripping“, welches durch mikrogliale Zellausläufer oder astrozytäre Lamellen bedingt ist (Abb. 16). Das Loslösen der Neuritenendigungen von der neuronalen Zelloberfläche ist in normalen und MCSF-defizienten op/op Mäusen gleich (Abb. 16B und D). In Abbildung 16A und 16C erkennt man den regulären Kontakt zwischen Neuronen und Neuritenendigungen auf der unverletzten kontralateralen Seite des Ncl. facialis in beiden Gruppen.

3.1.5.2 Neuronales Überleben nach Fazialisaxotomie

Die Fazialisaxotomie führt zu einer verzögerten Form des neuronalen Zelltodes, mit einem Maximum am Tag 14 (Raivich et al., 1998b), obgleich einige sterbende Neuronen auch noch 9 Wochen nach Verletzung beobachtet werden können (Möller et al., 1996). Die nach Abercrombie korrigierte Zahl von Motoneuronen auf der unoperierten Seite in den normalen Tieren war 2.078 ± 55 ($n = 5$; Mittelwert \pm SEM), welche mit bereits publizierten Daten bezüglich der Zahl der Neurone im Fazialiskern übereinstimmt (Sendtner et al., 1997). In den op/op Mäusen zeigte sich eine 16% höhere Zahl von Motoneuronen auf der unoperierten Seite, wobei dies nicht statistisch signifikant war ($P = 0.06$, ungepaarter T-Test). Im axotomierten Kerngebiet kam es zu einem Verlust von 48.1% der Motoneurone in den op/op-Tieren und von 43.3% in den normalen Mäusen 60 Tage nach Verletzung. Dieser Unterschied war wiederum nicht statistisch signifikant ($P = 0.54$). Auch wenn die Zahl der

Motoneurone nicht nach Abercrombie korrigiert wurde, ergab sich hier kein signifikanter Unterschied.

3.1.6 Axonale Regeneration im axotomierten N. facialis

Die axonale Regeneration im verletzten N. facialis wurde 96 Stunden nach Verletzung in longitudinalen 10 μm dicken Nervschnitten bestimmt. Wie aus der Abbildung 17A ersichtlich wird, zeigten die MCSF-defizienten op/op Tiere keinen Unterschied bezüglich des Wachstumsabstandes von Galanin- und CGRP-positiven Axonen, verglichen mit normalen Mäusen. Die Zahl der $\alpha\text{M}\beta\text{2}$ -positiven Makrophagen im Bereich der Läsion, sowie 2 und 4 Millimeter distal der Verletzung wurden nicht durch den MCSF Mangel beeinflusst (Abb. 17C). Es gab auch keinen Unterschied bezüglich der Zahl der einwandernden Granulozyten, die durch ihre endogene Peroxydaseaktivität ermittelt wurden (Abb. 17B).

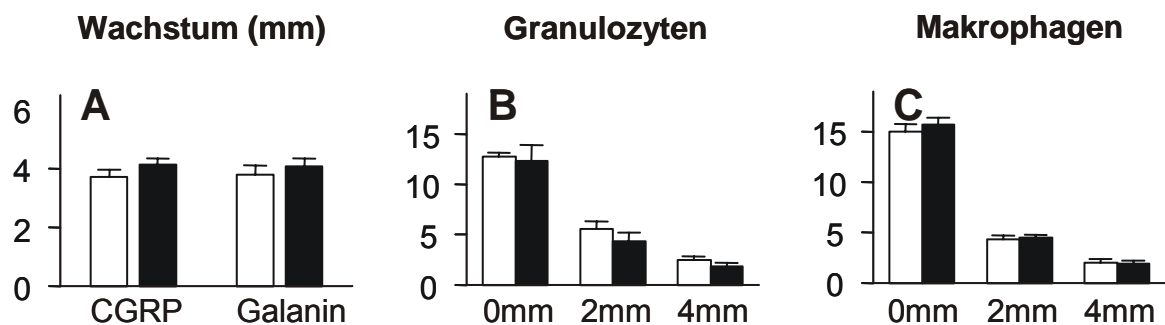


Abbildung (17). Axonale Regeneration (A) und Rekrutierung von Granulozyten (B) und Makrophagen (C) nach Quetschung des Nervus facialis. A: Die Wachstumsstrecke von Galanin- und CGRP-positiven, regenerierenden Axonen zeigt am Tag 4 nach Durchtrennung des N. facialis zwischen den MCSF-defizienten Mäusen (schwarzer Balken) und normalen Mäusen (weißer Balken) keinen Unterschied. B/C: Infiltrierende Makrophagen wurden durch αM -Immunoreaktivität und Granulozyten durch ihre endogene Peroxidase markiert und 2 bzw. 4 mm von der Läsionsstelle gezählt. Der Vergleich beider Gruppen zeigt keinen signifikanten Unterschied. Angegeben ist jeweils die Anzahl der Leukozyten pro Gesichtsfeld. Für jede Seite wurden pro Nerv fünf Gesichtsfelder bei einer 40-fachen Vergrößerung (0.37 mm^2) ausgezählt.

3.2 Interleukin-6 (IL6) im verletzten Nervensystem

Das Zytokin IL6, ein 26 kDA schweres Glykoprotein, ist ein früher Marker bei verschiedenen Verletzungsformen des Gehirnparenchyms. Es tritt sowohl nach peripherer Axotomie im Ncl. Facialis, als auch nach direkten Hirntrauma, Ischämie, Infektion oder neurodegenerativen ZNS-Erkrankungen wie Alzheimer Demenz oder Morbus Parkinson (Hopkins et al., 1995; Raivich et al., 1996) auf. In IL6-defizienten Tieren kommt es nach Trauma zu einer deutlich verminderten Induktion von GFAP-positiven Astrozyten, sowie zu einer verspäteten neuronalen Expression von Galanin (Klein et al., 1997). Beide Zellarten exprimieren Rezeptoren für IL6. Interessanterweise beeinträchtigt diese genetische Ausschaltung von IL6 auch die posttraumatische mikrogliale Proliferation, obwohl diese Zellen keine Rezeptoren für dieses Zytokin tragen (Klein et al., 1997). In der hier durchgeführten Arbeit wurden die dabei stattfindenden Veränderungen der mikroglialen Morphologie in den IL6-defizienten (IL6^{-/-}) Tieren und IL6^{+/+} Kontrollen nach Fazialisaxotomie untersucht und mit dem Expressionsmuster der mikroglialen Adhäsionsmoleküle verglichen.

3.2.1 Morphologische Veränderungen bei IL6-defizienten Tieren nach Axotomie

Das Fehlen von IL6 in den homozygoten, IL6^{-/-} Mäusen führte zu eine Reihe morphologischer Veränderungen nach Fazialisaxotomie. In den IL6^{+/+} Tieren konnte man eine ausgedehnten Bindung der zahlreich aktivierten $\alpha 5\beta 1 + / \alpha 6\beta 1 +$ Mikroglia an die axotomierten Neurone beobachten (Abb. 18). Dabei kam es zu einem Anschwellen des Zellkörpers und einer Deramifizierung der peripheren Zellausläufer.

Die Mikroglia von IL6-defizienten Mäusen vermochte in dieser Frühphase (1-4 Tage) zwar auch Kontakte zu den Neuronen auszubilden und mit ihrem Zellkörper an die Oberfläche des Motoneurons zu adhären. Gleichzeitig kam es aber nicht zu einem Anschwellen der mikroglialen Zellkörper, diese Zellkörper blieben so schlank wie auf der unoperierten Seite (Abb. 18). Auch die ramifizierten Zellausläufer blieben weitgehend erhalten. Die Ausbildung

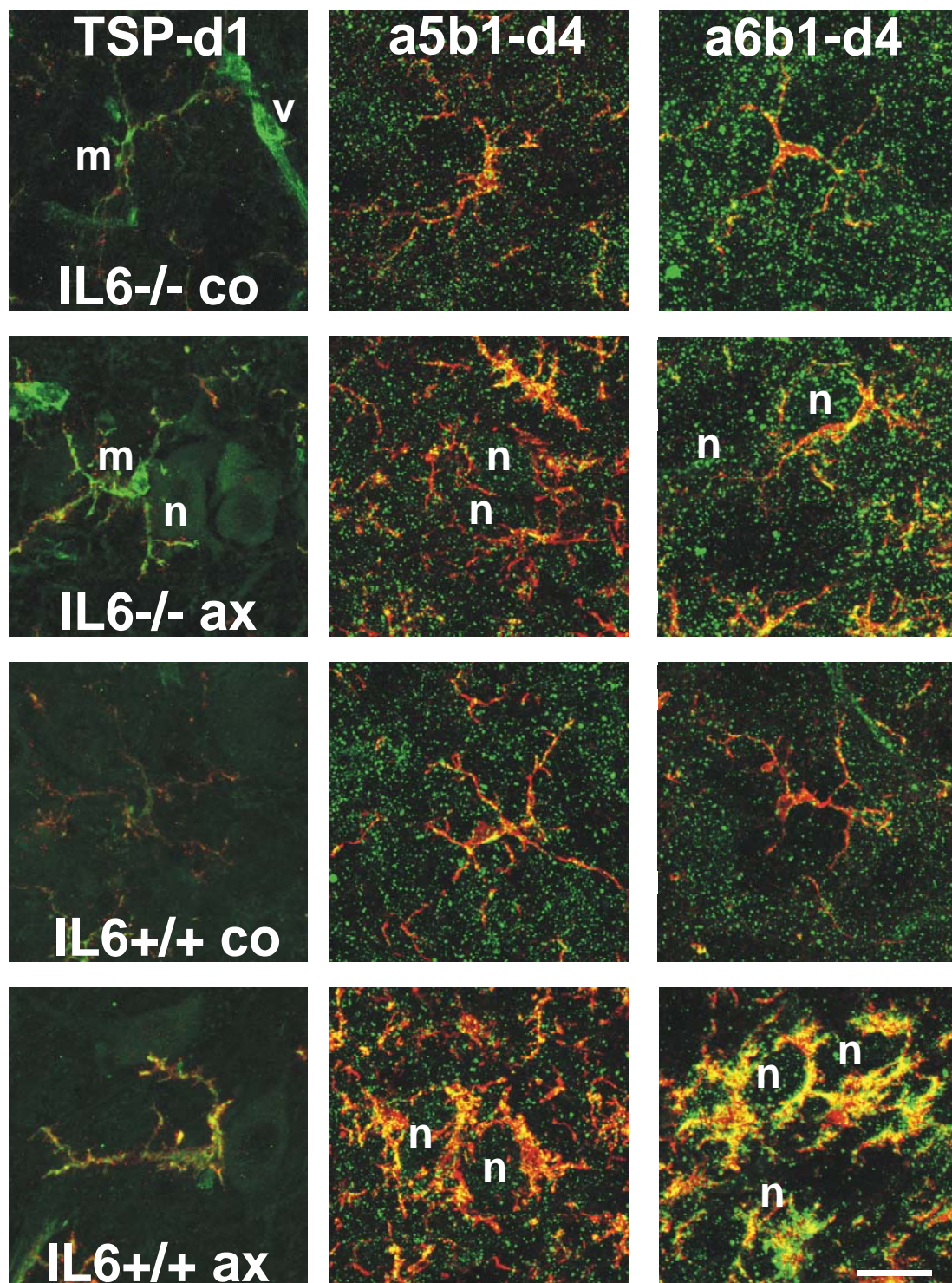


Abbildung (18). Immunfluoreszenz-Doppelmarkierung gegen das $\alpha 5\beta 1$ -Integrin, $\alpha 6\beta 1$ -Integrin, Trombospondin (grün) und IBA1 (IBA1; rot). Mikrogliale Antwort im motorischen Fazialiskern der Maus 1 und 4 Tage nach Axotomie (ax) in IL6-Wildtyp ($IL6^{+/+}$) und in IL6-defizienten Mäusen ($IL6^{-/-}$) im Vergleich zum unoperierten, kontralateralen Fazialiskern (co). Die Kolokalisation der Marker stellt sich in gelber Farbe dar. In $IL6^{-/-}$ Tieren sieht man eine Zunahme der TSP-Immunreaktivität auf der ruhenden Mikroglia. In normalen Mäusen führt die Axotomie zu einer starken Zunahme der $\alpha 5\beta 1 / \alpha 6\beta 1$ -Immunreaktivität, verglichen mit der kontralateralen Seite (nl-co). Die $IL6^{-/-}$ Tiere zeigen hingegen eine deutlich verminderte Zunahme der $\alpha 5\beta 1$ -Immunreaktivität der Mikroglia im axotomierten N. facialis ($IL6^{-/-}$ ax). In IL6-Wildtyp Mäusen kommt es zur ausgedehnten Bindung der zahlreich aktivierten $\alpha 5\beta 1 / \alpha 6\beta 1$ -positiven-Mikroglia an die axotomierten Neurone sowie zu einem Anschwellen des Zellkörpers. Die Mikroglia von IL6-defizienten Mäusen vermag zwar Kontakte zu den Neuronen auszubilden, jedoch bleibt die Zunahme des Zellkörpers aus. Maßstabsbalken = 25 μm .

von mikroglialen Knötchen am Tag 14 war durch das Fehlen von IL6 nicht beeinträchtigt (Abb. 20).

Zusammenfassend waren die IL6-abhängigen, morphologischen Veränderungen der Mikroglia nur während der frühen Antwort nach Verletzung des ZNS deutlich ausgeprägt. Dagegen konnte bei den IL6-defizienten Tieren keine entsprechende Beeinträchtigung der mikroglialen Transformation in Phagozyten beobachtet werden. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit dem fehlenden Einfluss der IL6-Defizienz auf das neuronale Überleben nach Fazialisaxotomie (Galiano et al., 2001).

3.2.2 Quantitative Veränderungen der mikroglialen Aktivierungsmarker

Im normalen ZNS zeigten die IL6^{-/-} Tieren nur bei der TSP- Immunreaktivität eine statistisch signifikante Zunahme auf der ruhenden Mikroglia (Abb. 18). Wie in Abbildungen 19A gezeigt wird, zeigt sich ein 2-facher Anstieg der Immunreaktivität für TSP in IL6^{-/-} versus IL6^{+/+} Mäusen ($P < 0.001$, ungepaarter t-test; $n = 4-8$ Tiere pro Gruppe). Alle anderen Marker waren im unoperierten Ncl. facialis nicht betroffen.

Die frühe mikrogliale Aktivierung in IL6-defizienten Mäusen (IL6^{-/-}) ist durch die Induktion von TSP und α M β 2 innerhalb der ersten 24 Stunden nach Verletzung gekennzeichnet. Für α M β 2 zeigte sich hier ein verminderter Anstieg für die Differenz zwischen axotomierter und kontralateraler Seite zwischen IL6^{+/+} und IL6^{-/-} Mäusen am Tag 1. Die Immunreaktivität für TSP auf der axotomierten Seite zeigte tendenziell höhere Werte in den IL6^{-/-} Mäusen, wobei dies jedoch nicht statistisch signifikant war ($P = 0.24$).

Nach der initialen Aktivierung der Mikroglia werden 3 bis 4 Tage nach Axotomie insbesondere die Adhäsionsmoleküle α 5 β 1-Integrin und α 6 β 1-Integrin auf der mikroglialen Zelloberfläche exprimiert (Raivich et al., 1998a; Kloss et al., 1999). In normalen Mäusen führte die Axotomie, verglichen mit der kontralateralen Seite, zu einer starken Zunahme dieser Immunreaktivität für α 5 β 1 und α 6 β 1. Die IL6^{-/-} Tiere zeigten eine deutlich verminderte Zunahme dieser mikroglialen Adhäsionsmoleküle (Abb. 18, IL6^{-/-}-ax). Wie in Abbildung 19C

und D für Tag 4 nach Fazialisaxotomie gezeigt wird, gab es hier eine statistisch signifikante Reduktion in der Zunahme des $\alpha\beta 1$ -Integrins (-73%, $p < 0.025$) und des $\alpha 5\beta 1$ -Integrins (-55%, $p < 0.001$).

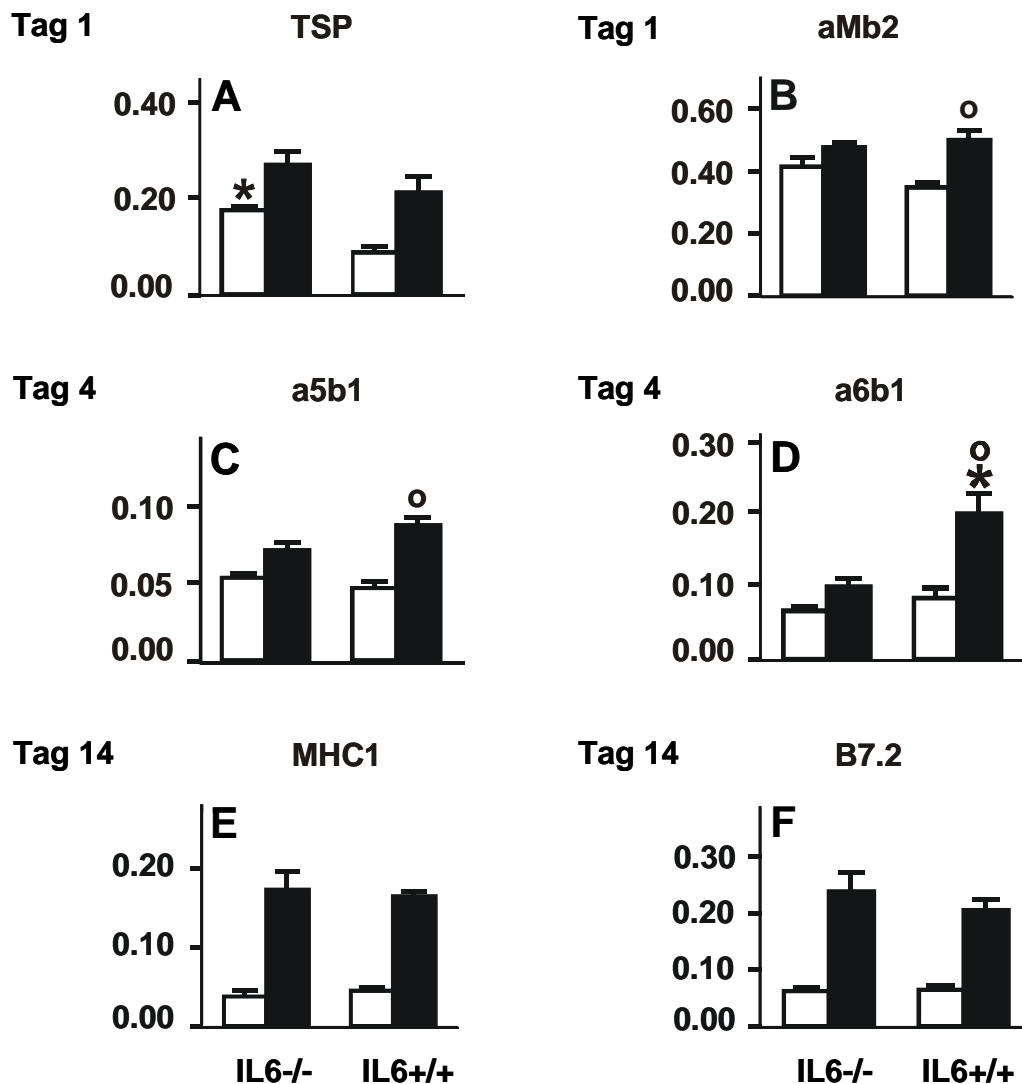


Abbildung (19) Quantitative Einflüsse von IL6-Defizienz auf mikrogliale Aktivierungsmarker am Tag 1 (A,B), Tag 4 (C,D), und Tag 14 (E,F) in IL6-Wildtyp (IL6^{+/+}) und in IL6-defizienten Mäusen (IL6^{-/-}) nach Fazialisaxotomie. (★) Es zeigt sich hier ein statistisch signifikanter Anstieg der Immunoreaktivität des entsprechenden Markers für dieselbe Seite (axotomierte oder kontralaterale Seite) in IL6^{+/+} versus IL6^{-/-} Mäusen ($P < 0.05$, ungepaarter t-test; $n = 4-8$ Tiere pro Gruppe). (o) Es zeigt sich hier ein statistisch signifikanter Anstieg für die Differenz zwischen axotomierter und kontralateraler Seite zwischen IL6^{+/+} und IL6^{-/-} Mäusen. Der Färbefaktor wurde mit dem DIFF-RISC-Algorithmus bestimmt. Dargestellt sind jeweils der axotomierte Ncl. facialis (schwarzer Balken) und die kontralaterale Seite (weißer Balken).

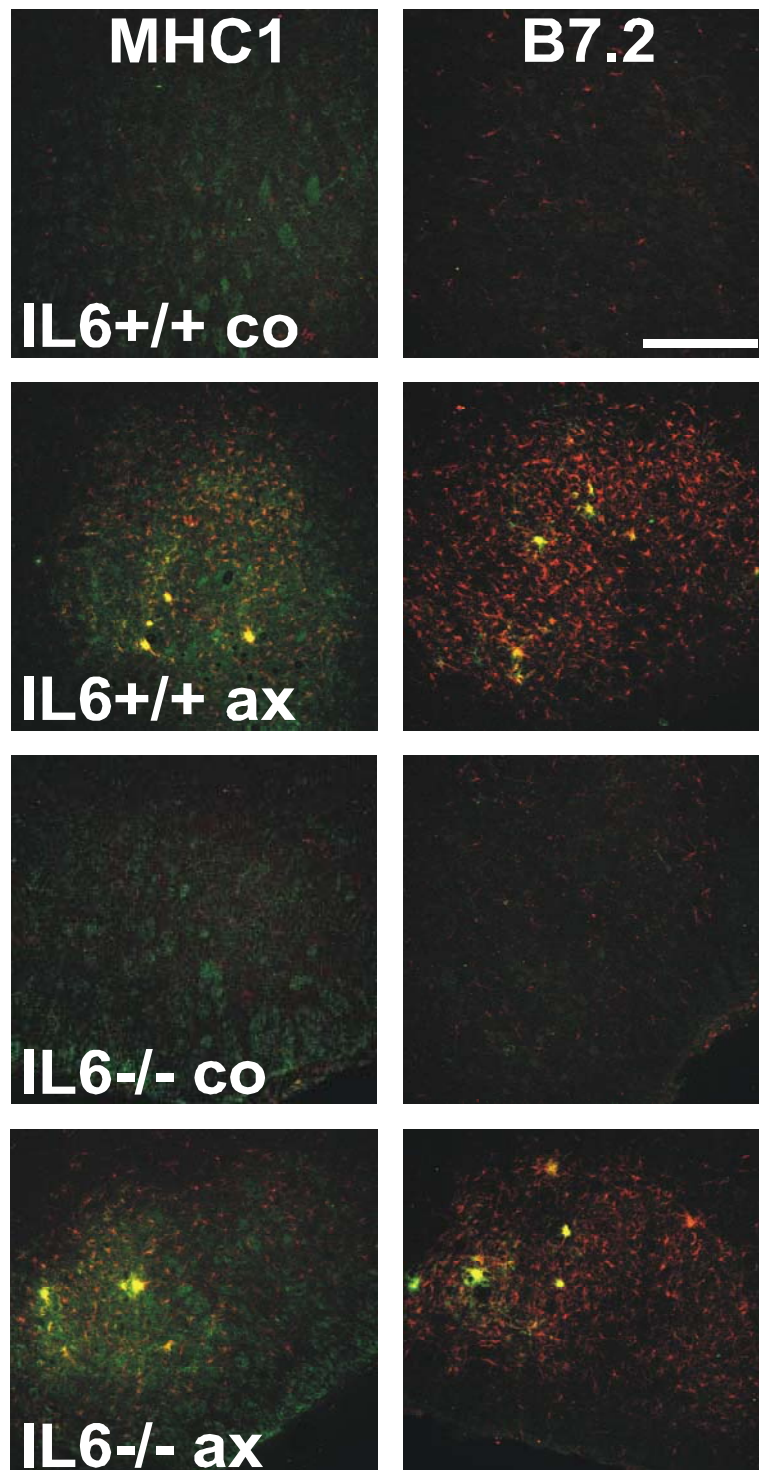


ABBILDUNG (20) Immunfluoreszenz-Doppelmarkierung gegen MHC1 oder B7.2 (grün) und IBA1 (IBA1; rot). Mikrogliale Antwort im motorischen Fazialiskern der Maus 14 Tage nach Axotomie (ax) im IL6-Wildtyp ($IL6^{+/+}$) und in IL6-defizienten Mäusen ($IL6^{-/-}$), im Vergleich zum unoperierten, kontralateralen Fazialiskern (co). Die Kolokalisation beider Marker stellt sich in gelber Farbe dar. In normalen und immundefizienten Mäusen führt die Fazialisaxotomie zur deutlichen Ausbildung von mikroglialen Knötchen und zu einer starken Zunahme der MHC1/B7.2-Immunreaktivität, verglichen mit der kontralateralen Seite. Maßstabsbalken = 200 μ m.

Der verzögerte neuronale Zelltod führte auch in den IL6-defizienten Mäusen zu einer weiteren Umwandlung der Mikroglia in phagozytotische Zellen mit dem Auftreten von mikroglialen Knötchen (Abb. 20). Dies ist von einer Umgebungsaktivierung der umliegenden nicht-phagozytotischen Mikroglia begleitet, die große Mengen B7.2 und MHC1 exprimieren (Raivich et al., 1998a.b). So kam es zu einer starken Zunahme der MHC1/B7.2-Immunreaktivität sowohl in den IL6^{+/+} als auch in den IL6^{-/-} Mäusen (Abb. 19 E,F; 20). Insgesamt war die mikrogliale Aktivierung am Tag 14 in den IL6-defizienten Tieren nicht anders als in den IL6^{+/+} Wildtyp-Tieren.

3.3 Mikroglia in Zellkultur

Wie diese Arbeit bisher zeigte, führte die Defizienz der Zytokine MCSF und IL6 nicht zu einer Veränderung im Transformationsverhalten der Mikroglia in Phagozyten. In vivo führt neuronaler Zelltod und das entstehende Zelldebris zu einer solchen Transformation, wie z.B. im Fazialismodell am Tag 14 nach der Axotomie. Allerdings werden diese Veränderungen von einer Induktion einer Vielzahl der Zytokine (Interleukin-1 beta, Tumor Nekrosis Faktor-alpha, Interferon gamma) und der Einwanderung von Lymphozyten begleitet, so dass eine kausale Zuordnung von Debris und mikroglialer Transformation nicht eindeutig möglich war. Aus diesen Gründen wurde hier die Auswirkung des Zelldebris auf die mikrogliale Morphologie unter vereinfachten Bedingungen in der Zellkultur untersucht.

3.3.1 Wirkung des Zelldebris auf Mikroglia in vitro

3.3.1.1. Ruhender Phänotyp: Ramifizierung der Mikroglia

Die Veränderungen der mikroglialen Morphologie wurde unter Verwendung der DAB-Immunozytochemie mit dem monoclonalen Antikörper 5C6 aus der Ratte, der gegen das Maus α M β 2 Integrin gerichtet ist, sichtbar gemacht. Bei diesem Integrin handelt es sich um einen spezifischen Oberflächenmarker von Monozyten und Mikroglia (Perry et al., 1985;

Raivich et al., 1994). Mikrogliazellen, die auf einem konfluenten Astrozytenrasen ausgesät werden, erscheinen zunächst klein und abgerundet (Sievers et al., 1994; Kloss et al., 1997), und entwickeln innerhalb von 10 Tagen in Kokultur ein ramifiziertes Aussehen (Abb. 21, oben links). Unter diesen Zellkulturbedingungen ist der Anteil der nicht-ramifizierten Zellen verhältnismäßig niedrig, zwischen 4% und 8% aller $\alpha\text{M}\beta 2$ positiven Mikroglia (Abb. 22A, C).

3.3.1.2. Effekt von Gehirnzellmembranen der Maus auf ramifizierte Mikroglia-Kokulturen

Die Zugabe von Gehirnzellmembranen in der Kokultur für 48 Stunden, führte bei der Mikroglia zu einem stufenweisen Verlust der ramifizierten Morphologie und der Anzahl an ramifizierten Zellen in Abhängigkeit von der Menge der zugegebenen Membranen (Abb. 21, 22A). Die Zugabe von 2.22 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Proteinkonzentration von Gehirnzellmembranen führte zu einem ersten starken Effekt auf die Morphologie, mit Verringerung der mikroglialen Ramifizierung. Zahlreiche kleine gerundete Makrophagen wurden bei 6.67 $\mu\text{g}/\text{ml}$ sichtbar, deren Form bei 20 und 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ überwog. Völlig ramifizierte Mikroglia waren bei diesen Konzentration selten, wobei sich in hohem Grade frei bewegliche mikrogliale Zellen mit einem großen Wachstumskegel insbesondere bei 20 mg/ml häufig finden ließen.

Um den zeitlichen Verlauf dieser Transformation festzustellen, wurden die Zellkulturen 1-72 Stunden nach Zugabe der Gehirnzellmembranen bei einer Proteinkonzentration von 20 mg/ml fixiert. Unbehandelte Zellkulturen dienten als Kontrolle (Abb. 22C, 23, 0h).

Nach 3 Stunden verloren die meisten mikroglialen Zellen ihre distalen Zellausläufer, was zu einem stangenförmigen Aussehen der Zellen führte, gefolgt von einem Anschwellen des Zellekörpers nach 6-12 Stunden, sowie einer Umwandlung der meisten Zellen in kleine, abgerundete Makrophagen nach 24-48 Stunden. Ein kleiner Anteil der Mikroglia, ungefähr

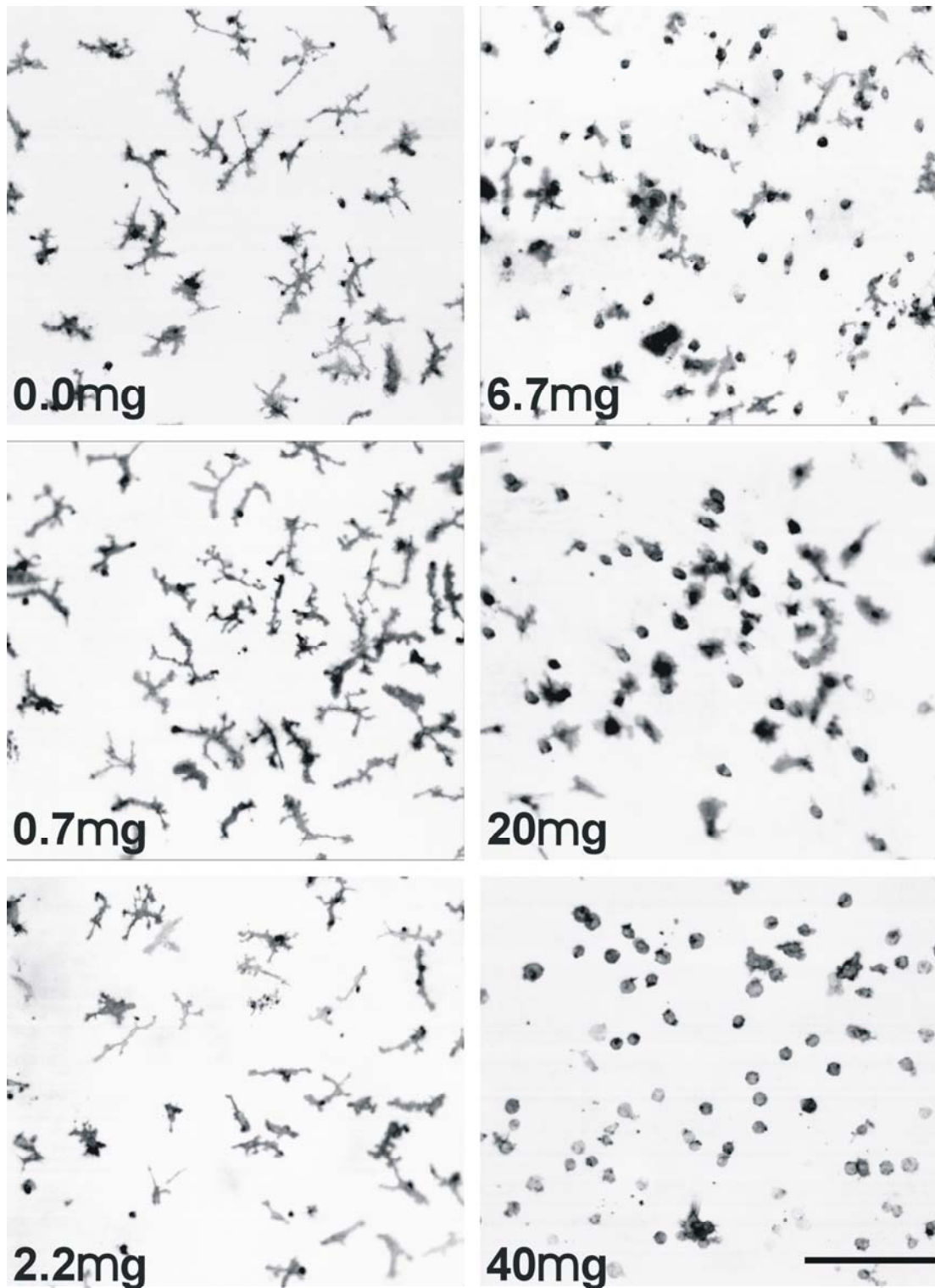
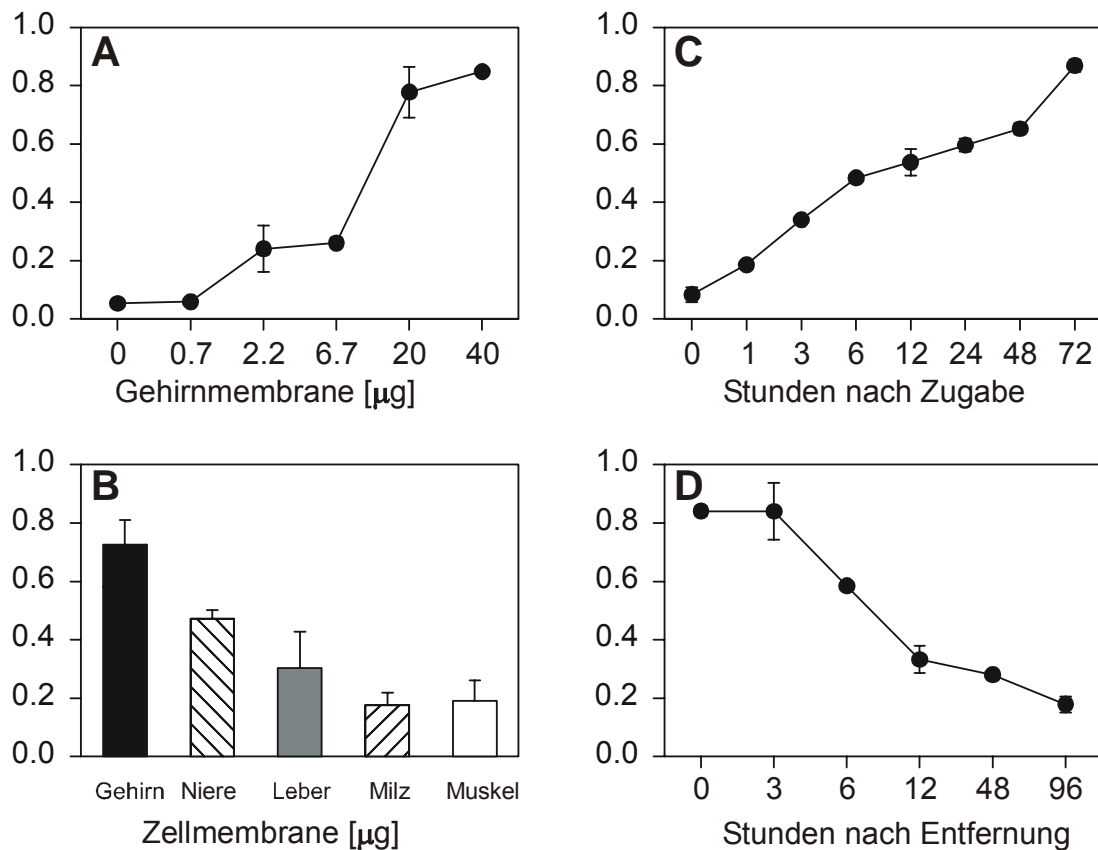


ABBILDUNG (21). Dosisabhängiger Effekt von Gehirnzellmembranen auf ramifizierte Mikroglia-Kokulturen. Mikroglia auf einem konfluenten Astrozytenrasen nach 2-tägiger Stimulation mit Gehirnzellmembranen, sichtbar gemacht durch α M β 2/DAB-Immunocytochemie. In den unstimulierten Kokulturen (0.0 μ g/ml) haben die Mikroglia lange Fortsätze mit distaler Ramifizierung. Nach 2-tägiger Stimulation mit Gehirnzellmembranen findet sich ein dosisabhängiger Effekt auf die mikrogliale Morphologie. Es zeigt sich eine zunehmende Deramifikation der Mikroglia, welche bei 40 μ g/ml vollständig ist. Vergrößerung = 114X.



alle vier Peptide

ABBILDUNG (22). Quantifizierung des Effekts bei Zugabe oder Entfernung von Membranen auf die mikrogliale Morphologie. Die Y-Achse zeigt die Zahl an nicht ramifizierten Zellen als Anteil an der gesamten $\alpha\text{M}\beta 2$ -positiven Mikroglia. Als ramifizierte Mikroglia wurden Zellen mit wenigstens zwei Fortsätzen gewertet, die wenigstens einen halben Zellkörper lang sein mussten, wobei mindestens ein Fortsatz länger war verglichen mit dem Durchmesser des Zellkörpers (siehe Material und Methoden). Als nicht-ramifizierte Zellen wurden die Zellen gewertet, welche diese Kriterien nicht erfüllten. Die Membrankonzentrationen sind in $\mu\text{g}/\text{ml}$ angegeben. Mittelwert \pm Standardfehler, $n = 2$ Zellkulturkammern. **A:** Zugabe von Gehirnzellmembranen führt zu einer dosisabhängigen Zunahme von nicht ramifizierten $\alpha\text{M}\beta 2$ -positiven Mikroglia, beginnend bei einer Konzentration von $2.2\mu\text{g}/\text{ml}$ bis zu einem maximalen Effekt bei Konzentrationen von $20\text{-}40\mu\text{g}/\text{ml}$. **B:** Transformierender Effekt von Membranpräparationen aus verschiedenen Geweben bei einer Proteinkonzentration von jeweils $20\mu\text{g}/\text{ml}$. Niere und Leber zeigen moderate Effekte verglichen mit Gehirnmembranen; die Effekte von Milz und Muskel sind relativ schwach. **C:** Zeitverlauf der Deramifikation von Mikroglia nach Zugabe von $20\mu\text{g}/\text{ml}$ Gehirnmembrankonzentration. Erste Effekte zeigen sich bereits nach einer Inkubation von 1 Stunde. Die vollständige graduelle Transformation der Mikroglia dauert jedoch bis zu 72 Stunden. **D:** Zeitverlauf der Reramifikation von Mikroglia nach Entfernung von $20\mu\text{g}/\text{ml}$ Gehirnmembrankonzentration. Der größte Teil der reramifizierenden Wirkung zeigt sich in den ersten 12 Stunden. Es findet sich jedoch noch nach 96 Stunden eine erhöhte Zahl an nicht ramifizierten Zellen.

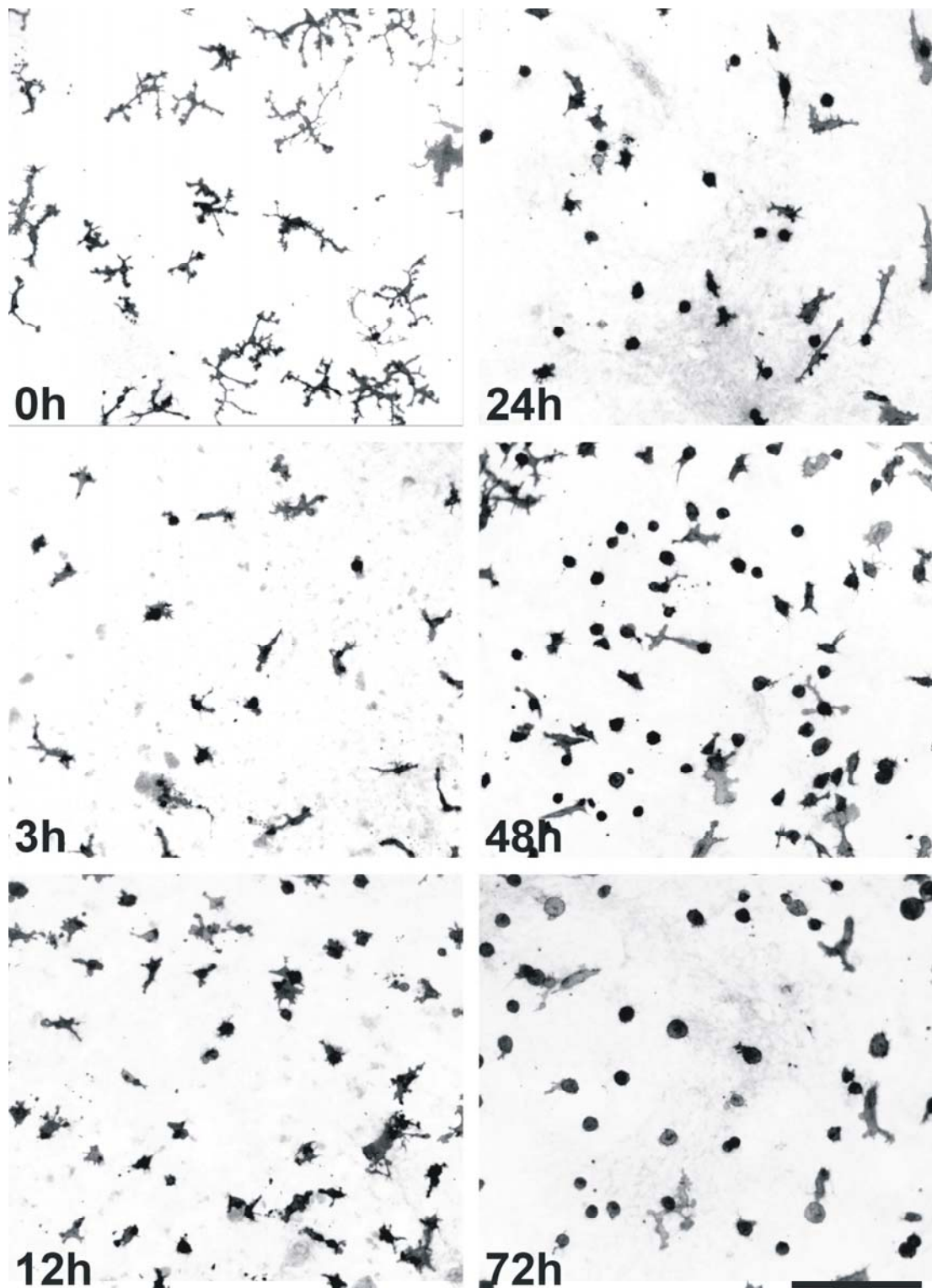


ABBILDUNG (23). Zeitverlauf der Deramifikation von Mikroglia nach Zugabe von 20 μ g/ml Gehirnmembrankonzentration. Mikroglia auf einem konfluenten Astrozytenrasen nach Stimulation mit Gehirnzellmembranen, sichtbar gemacht durch α M β 2/DAB-Immunocytochemie. Nach 3 Stunden verliert die Mikroglia bereits ihre distalen Fortsätze, gefolgt von einem Anschwellen des Zellkörpers (12 Stunden) und dem Auftreten von komplett runden Makrophagen nach 24-72 Stunden. Auch nach dieser langen Inkubationszeit zeigen 10-20% der Mikroglia eine ramifizierte Morphologie. Vergrößerung = 114X.

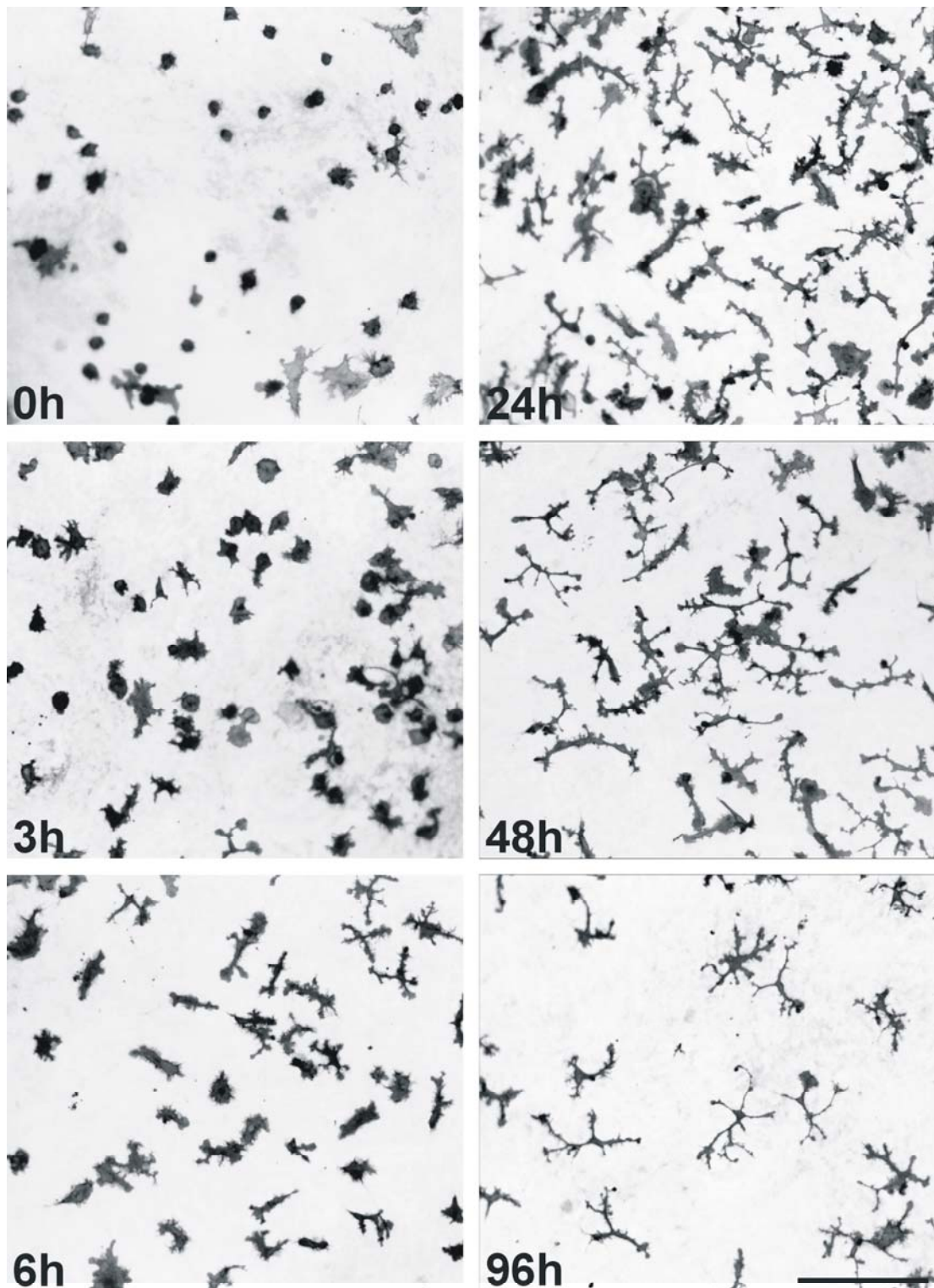


ABBILDUNG (24). Zeitverlauf der Reramifikation von Mikroglia nach Entfernung von 20 μ g/ml Gehirnmembrankonzentration. Mikroglia auf einem konfluenten Astrozytenrasen nach initialer Stimulation mit Gehirnzellmembranen, sichtbar gemacht durch α M β 2/DAB-Immunozytochemie. Der größte Teil der reramifizierenden Wirkung zeigt sich in den ersten 12 Stunden nach Mediumwechsel. Vergrößerung = 114X.

10-20% pro Zellkulturkammer, zeigte noch nach 72 Stunden Inkubationsdauer eine mäßig ramifizierte Morphologie (Abb. 23).

Wie in der Abbildung 22D und 24 gezeigt wird, führten die Entfernung der Zellmembranen und der Austausch des Zellkulturmediums zu einem ähnlich schnellen Prozess der Reramifikation der Mikroglia. Hierbei zeigen die meisten abgerundeten Makrophagen nach 3 Stunden eine flache, verbreiterte Zelloberfläche mit der Aussendung von dünnen Zellprozessen, gefolgt von der Ausbildung von zusätzlichen sekundären Zellausläufern nach 6 Stunden, einer weiteren Verlängerung der Zellprozesse und zunehmender Verringerung der Anschwellung des proximalen Zellkörpers (24-48 Stunden) und einer normalen ramifizierten Morphologie nach 96 Stunden. Jedoch gab es noch eine geringfügig erhöhte Anzahl von nicht-ramifizierten Zellen (17.2%) nach 96 Stunden, verglichen mit den Kontrollkulturen (4-8%, Abb. 22A, C).

3.3.1.3 Transformierender Effekt von Membranpräparationen aus verschiedenen Geweben

Um die Spezifität des transformierenden Effektes festzustellen, wurden Gehirnzellmembranen mit den Membranen aus Niere, Leber, Milz und Skelettmuskel bei Konzentrationen von 0.74, 2.2, 6.7, 20 und 40 µg/ml Proteinkonzentration verglichen. In den Abbildungen 22B und 25 sind jeweils die Effekte bei 20 µg/ml Proteinkonzentration dargestellt. Nach Zugabe von Gehirnmembranen transformierten sich die meisten mikroglialen Zellen in kleine, abgerundete Makrophagen. Dieser Effekt war moderater mit Membranen aus Niere und Leber und schwach bei Milz- und Muskelmembranen. Die meisten mikroglialen Zellen zeigten nach Zugabe von Muskelmembranen nur eine geringfügige Aktivierung und diskrete Verringerung der peripheren Zellausläufer und bei Milzmembranen ein Anschwellen des Zellkörpers. Kleine und vollständig abgerundete Makrophagen waren jedoch sehr selten zu finden (Abb. 27). Die Steigerung der Milz- und Muskelmembrankonzentration auf 40 µg/ml führte zwar zu einer gesteigerten mikroglialen

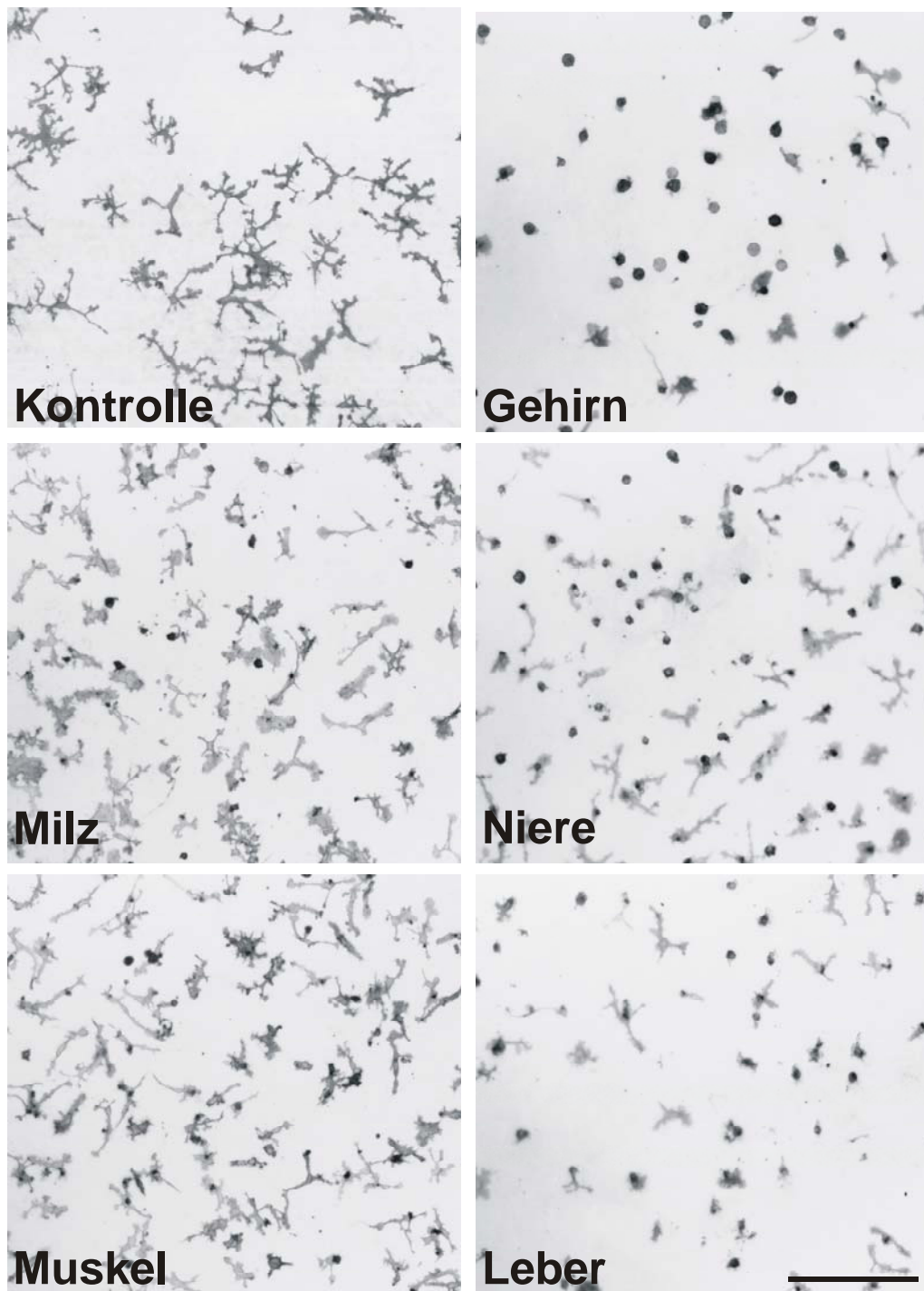


ABBILDUNG (25). Transformierender Effekt von Membranpräparationen aus verschiedenen Geweben bei einer Proteinkonzentration von jeweils 20µg/ml. Mikroglia auf einem konfluenten Astrozytenrasen nach Stimulation mit Membranen, sichtbar gemacht durch αMB2/DAB-Immunozytochemie. Gehirnmembrane haben einen starken transformierenden Effekt; Niere und Leber zeigen moderate Effekte; die Effekte auf Milz und Muskel sind relativ schwach. Vergrößerung = 114X.

Aktivierung, jedoch mit nur wenigen vollständig abgerundeten Makrophagen. Die meisten Zellen wiesen weiterhin eine Art Zwischenmorphologie auf.

3.3.1.4. Aufnahme von fluoreszierenden Gehirnmembranen und Fluorosphäre-Latex-Beads

Zur Bestimmung des Schicksals der Zellmembranen nach Zugabe zur Kokultur wurden diese mit Rhodamin-B-Isothiocyanat fluoreszent markiert und dem Kulturmedium bei einer Konzentration von 20 µg/ml Protein zugefügt. Die Immunfluoreszenz-Doppelmarkierung, mit dem Antikörper gegen das $\alpha\text{M}\beta\text{2}$ -Integrin, zeigte die Aufnahme von Gehirnmembranen von fast allen abgerundeten $\alpha\text{M}\beta\text{2}$ -positiven Makrophagen, mit zahlreichen, ungefähr 1µm großen rhodamin-positiven Körnchen innerhalb des Zytoplasmas, unter Aussparung des Zellkerns, wobei der Anteil der rhodamin-negativen Makrophagen 5% betrug. Eine kleine Subpopulation von ramifizierten mikroglialen Zellen von ungefähr 15% war rhodamin-negativ (Abb. 26B). Zusätzlich zu den Makrophagen gab es eine starke Aufnahme der fluoreszierenden Membranen durch viele $\alpha\text{M}\beta\text{2}$ -negative Zellen (Abb. 26A, B), die zahlreicher als die benachbarten $\alpha\text{M}\beta\text{2}$ -positiven Makrophagen waren. Die Immunfluoreszenz-Doppelmarkierung gegen das $\alpha\text{M}\beta\text{2}$ -Integrin und GFAP bestätigte die Aufnahme von rhodamin-positiven Membranen in einer Subpopulation der $\alpha\text{M}\beta\text{2}$ -negativen, GFAP-positiven Astrozyten (Abb. 26C).

Wie in der Abbildung 26D gezeigt, führte die Zugabe von 1 µm großen Latexkügelchen (Fluorosphäre-Latex-Beads, Fluorobeads) in der Kokultur ebenfalls zur Aufnahme durch fast alle $\alpha\text{M}\beta\text{2}$ -positive Mikrogliazellen (ungefähr 80%) sowie in zahlreichen benachbarten $\alpha\text{M}\beta\text{2}$ -negativen Zellen. Anders als bei den Gehirnmembranen, führte die mikrogliale Aufnahme von Fluorobeads nicht zur Transformation in kleine abgerundete Makrophagen. Statt dessen wies der größte Teil der Fluorobead+/ $\alpha\text{M}\beta\text{2}$ + Mikroglia weiter eine in hohem Grade ramifizierte Morphologie auf. Das Fehlen einer Transformation wurde bis zu der maximalen

Konzentration von 10×10^6 Fluorobeads pro Zellkammer beobachtet (Abb. 26D). Wie in den vorhergehenden Experimenten beobachtet, führte die Zugabe von Gehirnmembranen zu einer Transformation der meisten Mikroglia in kleine und abgerundete Makrophagen (Abb. 26E,F). Die zusätzliche Zugabe von Membranen führte zu einer deutlichen Verringerung der Aufnahme von Fluorobeads bei einer Konzentration von $30 \mu\text{g/ml}$ Membranprotein (Abb. 26E) und einer nahezu kompletten Inhibition bei $300 \mu\text{g/ml}$ (Abb. 26F).

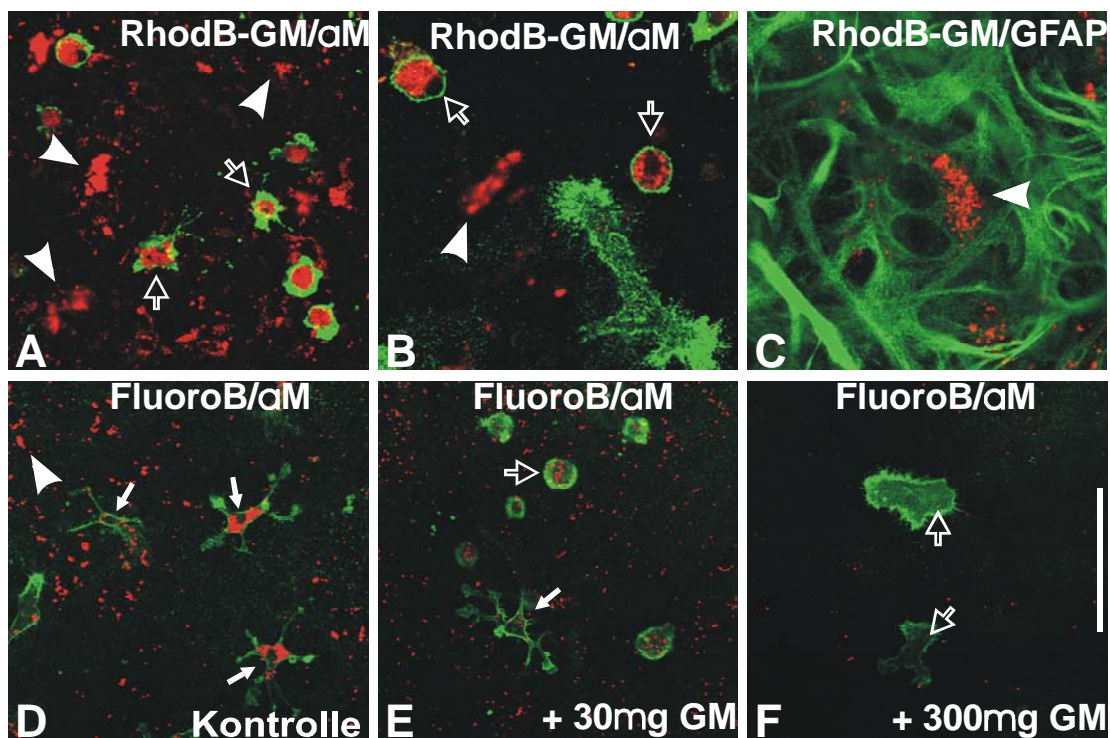


ABBILDUNG (26). Aufnahme von fluoreszierenden Gehirnmembranen und Fluorosphäre-Latex-Beads in Mikroglia-Kokulturen, 48 Stunden nach Zugabe. A/B: Aufnahme von mit Rhodamin-B (rhodB-BM, rot) konjugierten Gehirnmembranen ($20 \mu\text{g/ml}$), sichtbar gemacht durch Immunfluoreszenz-Doppelmarkierung gegen das $\alpha\text{M}\beta\text{2}$ -Integrin (αM , A,B, grün). Nahezu alle abgerundeten $\alpha\text{M}\beta\text{2}$ -positive Makrophagen zeigen die Aufnahme von ungefähr $1 \mu\text{m}$ großen fluoreszierenden Gehirnmembranen (leere Pfeile) im Bereich des Zytoplasmas ohne Beteiligung des Kerns. Die ramifizierte $\alpha\text{M}\beta\text{2}$ -positive Mikroglia stellt sich Rhodamin-B-negativ dar (B). Die starke Aufnahme von Rhodamin-B konjugierten Gehirnmembranen in $\alpha\text{M}\beta\text{2}$ -negativen Zellen (A,B, Pfeilspitze) ist mit der GFAP-Immunoreaktivität (C) kolokalisiert. D-F: Aufnahme von Fluorosphäre-Latex-Beads (FluoroB, rot) in Mikroglia, sichtbar gemacht durch Immunfluoreszenz-Doppelmarkierung gegen das $\alpha\text{M}\beta\text{2}$ -Integrin (αM , grün). D: Aufnahme der Beads in ramifizierte $\alpha\text{M}\beta\text{2}$ -positive Mikroglia (Pfeile) sowie in die benachbarten $\alpha\text{M}\beta\text{2}$ -negativen Zellen (Pfeilspitze). E,F: Die Zugabe von Gehirnzellmembranen führt zum Auftreten von komplett runden Makrophagen (E, leere Pfeile). Bei einer Proteinkonzentration von $30 \mu\text{g/ml}$ (E) zeigt sich eine deutliche Reduktion der Aufnahme der Fluorosphäre Latex Beads in die $\alpha\text{M}\beta\text{2}$ -positiven Makrophagen (Pfeile), in die benachbarten $\alpha\text{M}\beta\text{2}$ -negativen Zellen sowie in die verbleibenden ramifizierten Mikrogliazellen. In einer Konzentration von $300 \mu\text{g/ml}$ Gehirnmembranen (F) kommt es zu einer nahezu vollständigen Inhibition der Aufnahme von Fluorosphäre-Latex-Beads, wobei noch einzelne Beads in den $\alpha\text{M}\beta\text{2}$ -positiven Makrophagen (F, leere Pfeile) dargestellt werden können. Maßstabsbalken = $100 \mu\text{m}$ in A,D-F; $64 \mu\text{m}$ in B; $40 \mu\text{m}$ in C.

3.3.2 Wirkung verschiedener pharmakologischer Substanzklassen auf Mikroglia

Die ramifizierte Mikroglia breitet sich normalerweise auf der oberen Astrozytenzellschicht aus und ähnelt im starken Maße der Morphologie in vivo (Abb. 27A, E und I). In diesem Teil der vorliegenden Arbeit wurden unterschiedliche Kategorien von intrazellulären aktiven Molekülen auf ihre Fähigkeit untersucht, als mögliche Vermittler in der Umwandlung von Mikroglia in Makrophagen zu fungieren (Abb. 27-29). Da aktivierte Mikroglia auch extrazelluläre Faktoren produzieren kann, die den ramifizierenden Effekt von Astrozyten behindern können, wurden auch die Effekte von Proteasen, Disintegrinen und Integrinhibitoren auf ihre Fähigkeit geprüft, die Interaktion von Mikroglia mit der extrazellulären Matrix zu blockieren (Abb. 28C und D, 30 und 31). Alle Effekte wurden nach 48 h Inkubation mit der jeweilig geprüften Substanz untersucht. Die unbehandelten Zellkulturen dienten als Kontrollen. Die Unversehrtheit des zugrundeliegenden Astrozytenrasens wurde mit Phasenkontrast bei hoher Vergrößerung im Mikroskop geprüft (Abb. 26D, H und L).

3.3.2.1 Effekte von intrazellulären Stimuli auf ramifizierte Mikroglia in Zellkultur

Im allgemeinen gab es vier Kategorien pharmakologischer Substanzklassen, die zu einer kompletten Deramifikation der Mikroglia führten. Hierbei handelte es sich um Substanzen, die zu einer Erhöhung des intrazellulären Kalzium oder cAMP, oder zu einer Inhibition der Phosphatasen oder der G_i-Proteine führen. Im Fall vom dibutyryl-cAMP, einem permeablen cAMP Analogon, kam es bereits nach Zugabe von 10µM zu einer Verringerung der peripheren Zellausläufer, mit Fehlen von völlig ramifizierter Mikroglia und deutlichem Anschwellen der Zellkörpers (Abb. 27A-D). Zahlreiche abgerundete Makrophagen überwogen beim Zellbild bei 1 mM (Abb. 27C,D und 28A). Obgleich ein kleiner Anteil der Mikroglia pro Zellkulturkammer noch eine mäßig ramifizierte Zellmorphologie aufwies (10%-20%), zeigten diese Zellen häufig keine sekundären und tertiären Zellausläufer. Der Einsatz in der Abbildung 27C zeigt die Morphologie eines mit Dibutyryl-cAMP behandelten

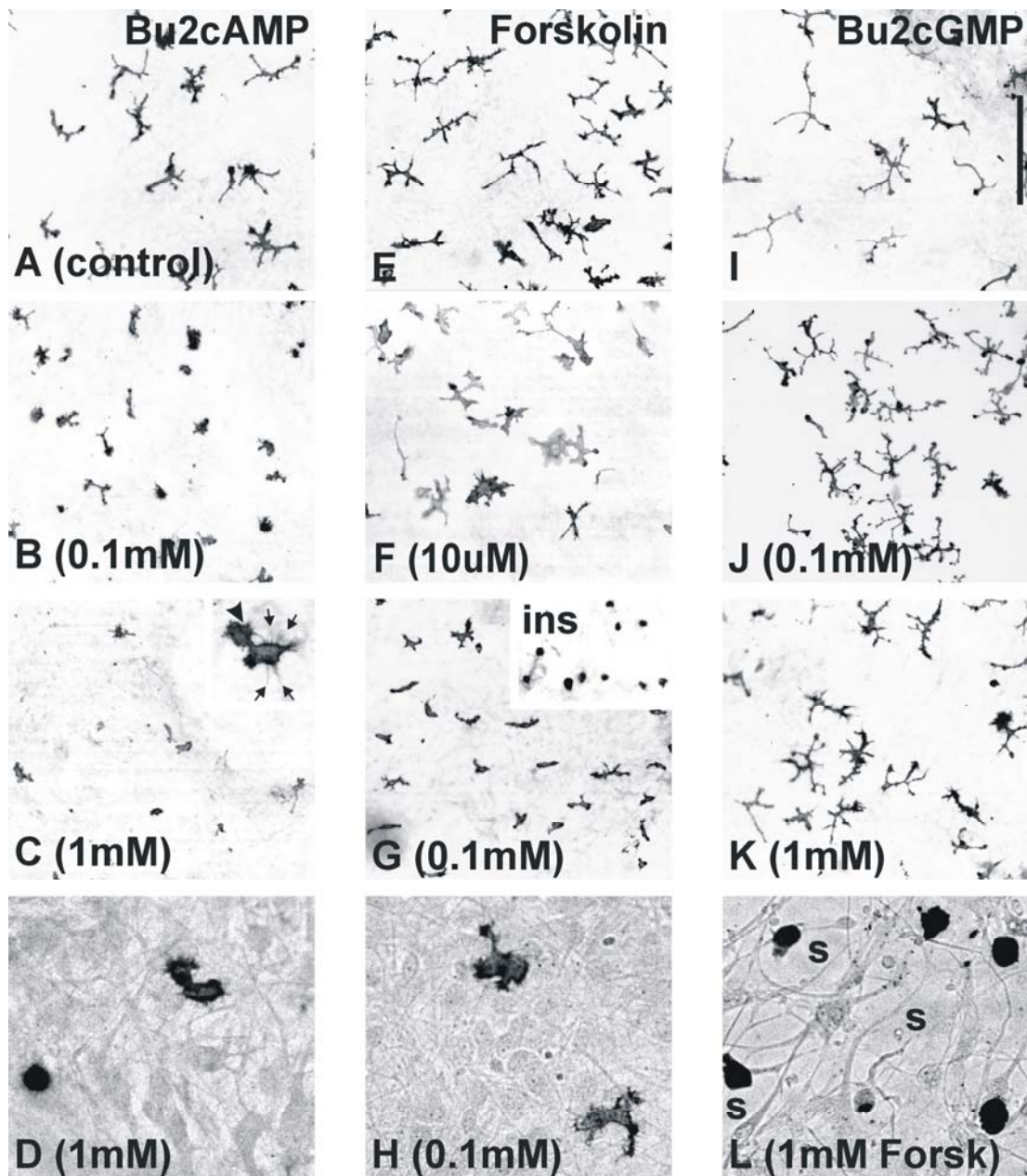


ABBILDUNG (27). Effekt von Dibutyryl-cAMP (Bu2cAMP), Forskolin, und dibutyryl-cGMP (Bu2cAMP) auf Mikroglia in Kokultur. Mikroglia auf einem konfluenten Astrozytenrasen nach Stimulation, sichtbar gemacht durch α M β 2/DAB-Immunozytochemie. In D, H und L zusätzlich Darstellung des Astrozytenrasens mit Phasenkontrast. Die Konzentrationen der pharmakologischen Zusätze sind jeweils in Klammern angegeben. **A, E** und **I**: Kontrollkulturen (co). **B–D**: Die Zugabe von Bu2cAMP führt zu einer Abnahme der ramifizierten Morphologie der Mikroglia. Dieser Effekt ist bereits bei einer Konzentration von 0.1 mM (**B**) sichtbar und zeigt bei 1mM Dibutyryl-cAMP (**C, D**) zahlreiche transformierte Makrophagen. Der Einsatz in **C** zeigt die Morphologie eines mit Dibutyryl-cAMP behandelten Makrophagen mit zahlreichen bis zu 10 μ m langen Filopodien (Pfeile) und einer lamellären Struktur. Die Kombination mit dem Phasenkontrast (**D**) zeigt zwei Makrophagen auf einem mehrschichtigen konfluenten Astrozytenrasen (mit Fokussierung auf den Astrozytenrasen), mit einer komplett abgerundeten Form sowie einem Wachstumsprozess. **F–H** und **L**: Zugabe von Forskolin führt zu einer Deramifikation der Mikroglia, mit einem Anschwellen der Fortsätze bei einer Konzentration von 10 μ M (**F**), und einem Verlust der sekundären Zellfortsätze bei 0.1 mM (**G**) und einer kompletten Transformation in runde Makrophagen bei 1mM (**G**, Bildeinsatz/ins). Die Kombination mit dem Phasenkontrast bei 1mM Forskolin (**L**) zeigt zahlreiche Retraktionen der Astrozytenmembran, so dass der Plastikgrund (s) einzeln zum Vorschein kommt. Keine Auswirkung auf den Astrozytenrasen sind bei einer Konzentration von 0.1mM (**H**) sichtbar. **J** und **K**: Zusatz von Dibutyryl-cGMP hat keinen Einfluss auf die ramifizierte Morphologie der Mikroglia bei Konzentrationen von 0.1 bis 1 mM (**J, K**). Maßstabsbalken = 0.25 mm in allen Mikrographen, ausgenommen D, H und L (50 μ m) und in den Bildeinsätzen in **A** (63 μ m) und **I** (190 μ m).

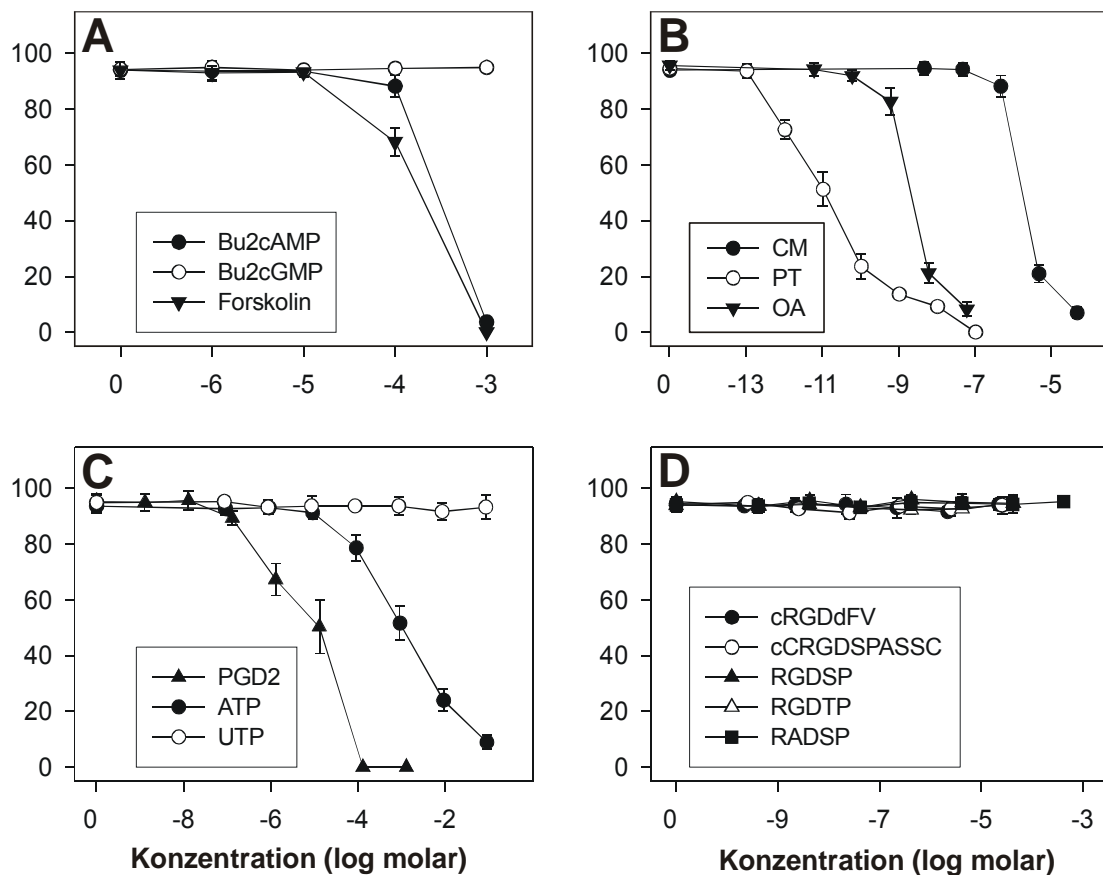


Abbildung (28). Quantifikation der Effekte bei Zugabe von verschiedenen Klassen pharmakologischer Reagentien auf die mikrogliale Morphologie. Die Y-Achse zeigt die Zahl an nicht ramifizierten Zellen als Anteil an der gesamten α M β 2-positiven Mikroglia. Als ramifizierte Mikroglia wurden Zellen mit wenigstens zwei Fortsätzen gewertet, die wenigstens einen halben Zellkörper lang sein mussten, wobei mindestens ein Fortsatz länger war verglichen mit dem Durchmesser des Zellkörpers (siehe Material und Methoden). Als nicht-ramifizierte Zellen wurden die Zellen gewertet, welche diese Kriterien nicht erfüllten. Die Membrankonzentrationen sind in μ g/ml angegeben. Mittelwert \pm Standardfehler (SD) wurden von jeweils 3 Zellkulturkammern bestimmt. Die Konzentration der zugegebenen Substanzen ist als Logarithmus der molaren Konzentration aufgetragen; Kontrollkulturen = co. **A:** Cyclische Nukleotide (Dibutyryl-cAMP, Dibutyryl-cGMP) und Forskolin, als Aktivatoren der Adenylatcyclase. **B:** Ca-Ionophore (calcimycine, CM), Pertussis toxin (PT), und Okadaic Acid (OA).

Makrophagen, mit zahlreichen bis zu 10 μ m langen Filopodien und einer lamellären Struktur. Effekte auf die mikrogliale Proliferation waren nicht der primäre Fokus dieser Studie; jedoch führte eine 48-stündige Behandlung mit 1 mM dibutyryl-cAMP zu einer wahrnehmbaren Verringerung der mikroglialen Zellzahl, welche in Übereinstimmung mit anderen Untersuchungen über die mikrogliale Zellproliferation steht (Zhang et al., 2002).

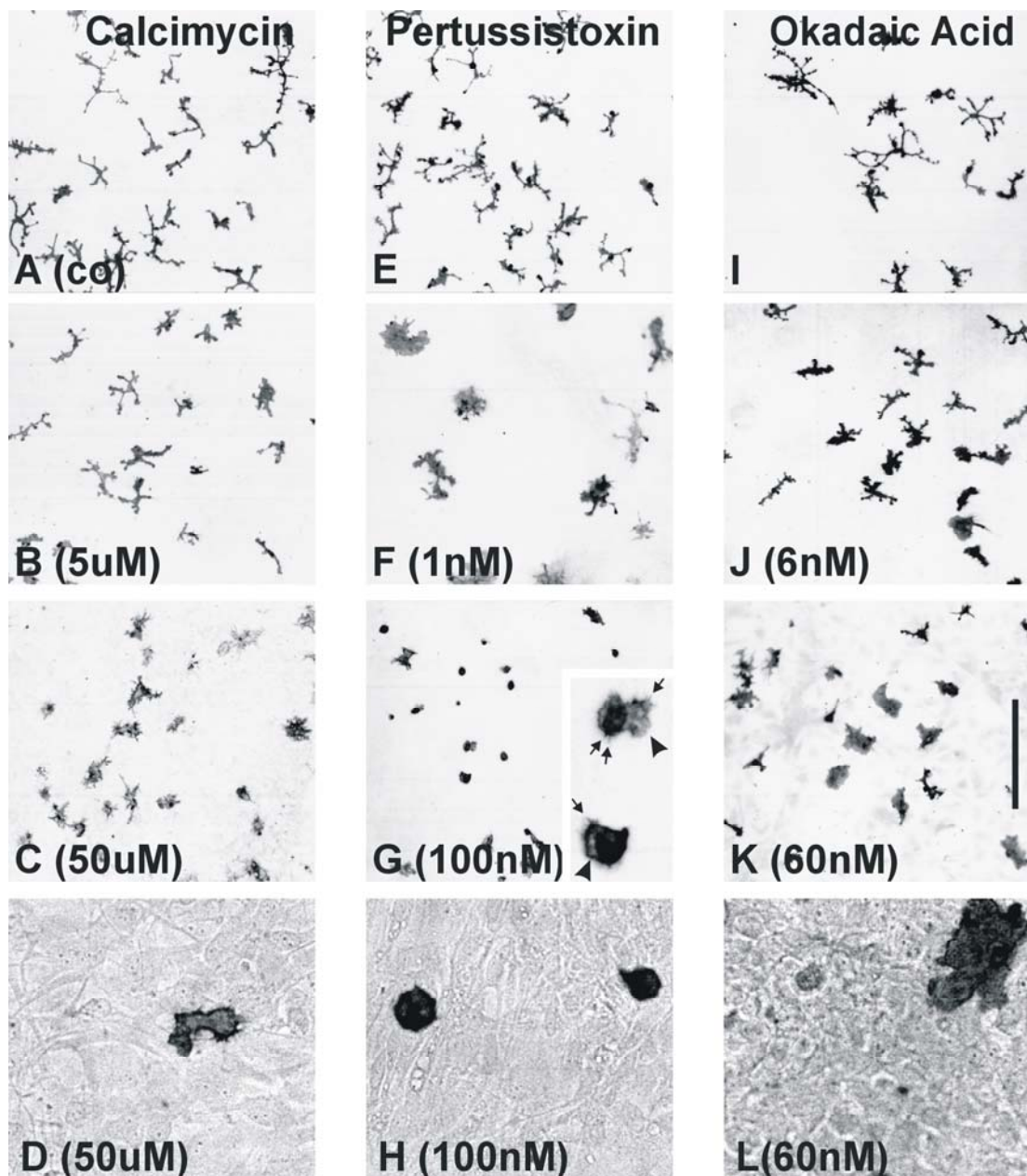


ABBILDUNG (29). Effekt von Ca-Ionophore Calcimycine (A –D), Pertussis toxin (E –H), und Okadaic Acid (I –L) auf Mikroglia in Kokultur. Mikroglia auf einem konfluenten Astrozytenrasen nach Stimulation, sichtbar gemacht durch α M β 2/DAB-Immunozytochemie. Die Konzentrationen der pharmakologischen Zusätze sind jeweils in Klammern angegeben. Die Kontrollen (co) sind in A, E und I dargestellt. D,F,H,J und L zeigen die Effekte der hinzugefügten Substanzen. Bei niedrigen Konzentrationen (B,F,J) kommt es nach Zugabe aller 3 Substanzen zu einem Anschwellen der mikroglialen Fortsätze. Höhere Konzentrationen (C,G,K) führen zu einer weitgehenden Retraktion der Fortsätze und einer Transformation in abgerundete Makrophagen. Dieser Effekt zeigt sich bei der Zugabe von Pertussis toxin (G) besonders deutlich. Der Bildeinsatz in G zeigt die Morphologie zweier mit Pertussis toxin behandelten Makrophagen, mit einigen kurzen Filopodien (Pfeile) und einer lamellären Struktur (Pfeilköpfe). Die Kombination mit dem Phasenkontrast zeigt einen intakten Astrozytenrasen bei hohen Konzentrationen von Calcimycin (D), Pertussis toxin (H) und Okadaic Acid (L). Maßstabsbalken = 0.25 mm in allen Mikrographen, ausgenommen im Bildeinsatz in G (63 μ m) und in den Phasenkontrastmikrographen in D,H, und L (50 μ m).

Ein stufenweiser Verlust der ramifizierten Morphologie wurde auch bei Zugabe von Forskolin beobachtet, einem direkten Induktor der Adenylatcyclase, dem cAMP synthetisierenden Enzym (Abb. 27E-H und 27A). Ein erster Effekt, mit einer Verbreiterung des perinukleären Zytoplasmas zeigte sich bei 10 μM (Abb. 27F), und führte nach Zugabe von 100 μM zum Verschwinden der Sekundärverzweigungen und zu einer abgerundeten Zellform (Abb. 27G). Nach Zugabe von 1mM bzw. 410 $\mu\text{g/ml}$ (Abb. 27G, Einsatz) bestimmten abgerundete Makrophagen mit vereinzelt sehr kurzen Filopodien das Zellbild. Jedoch zeigte eine genauere Prüfung (Abb. 27L), dass es bei diesen Konzentrationen häufig zu lokalen Retraktionen des Astrozytenrasens kam, was auf einen toxischen Effekt schließen ließ. Keine sichtbaren Effekte auf den Astrozytenrasen wurden bei 0.1 mM (Abb. 27H) oder niedrigeren Konzentrationen von Forskolin beobachtet. Der Vergleich mit 1 mM Dibutyryl-cAMP zeigte ein fein verwobenes Netz von Astrozyten und flachen astrozytären Zellausläufern bei den mit zyklischen Nukleotiden behandelten Zellkulturen (Abb. 27D), aber keine Retraktionen mit Sichtbarwerden des zugrundeliegenden Plastiksubstrates. Zugabe von dibutyryl-GMP (1 μM - 1mM) hatte keinen Effekt auf die Morphologie der ramifizierten Mikroglia (Abb. 27I-K, 28A).

Im Fall der Kalziumionophore Calcimycin (A23187) sah man einen mäßigen Effekt bei einer Konzentration von 500 nM und Transformation der meisten Mikroglia in kleine und abgerundete Makrophagen mit noch sichtbaren Filopodien bei einer Konzentration von 50 μM (Abb. 28B und 29A-D). Bei dieser Konzentration war der Astrozytenrasen intakt (Abb. 29D). Die Zugabe von höheren Konzentrationen von Calcimycin (0.5-5 mM) führte zu einer Zerstörung des Astrozytenrasens. Pertussistoxin (Abb. 28B und 29E-H), ein Inhibitor der i-, o-, und t-Klassen der G-Proteinuntereinheiten (Bockaert et al., 1987; Tsai et al., 1987), verursacht ebenfalls eine dosisabhängige morphologische Transformation, angefangen bei 125 $\mu\text{g/ml}$ (1 μM), mit vergrößerten mikroglialen Zellkörpern und Verkleinerung der distalen Zellausläufer. Gewöhnlich traten kleine und abgerundete Makrophagen bei 125 ng/ml (1 nM) auf. Jedoch zeigten viele Makrophagen noch bei 100 nM eine lamelläre Oberflächenstruktur

und zahlreiche Filopodien, als Hinweise für eine ameboide Morphologie (Abb. 29G, vom Einsatz) bei gleichzeitig intakter Astrozytenschicht (Abb. 29H).

Schließlich führte die Zugabe von Okadaischer Säure (okadaic acid, 6 pM- 6 μ M), einem Inhibitor der Serin/Threonin Phosphatasen PP1 und PP2a, ebenfalls zu einer Transformation der Mikroglia (Abb. 28B und 29I-L). Morphologische Effekte wurden zuerst bei 6 nM (Abb. 29J) beobachtet und waren bei einer Konzentration von 60 nM maximal (Abb. 29K). Bei dieser Konzentration wurden die mikroglialen Zellen groß, mit wenigen kurzen proximalen Zellausläufern, bei einer weiterhin intakten Astrozytenschicht (Abb. 29L). Höhere Konzentrationen (600 nM) führten zu einer Zerstörung des Astrozytenrasens und dem Auftreten von einzelnen an der Plastikoberfläche anhaftenden Makrophagen.

3.3.2.2 Effekte von extrazellulären Stimuli auf ramifizierte Mikroglia in Zellkultur

Die aktivierten mikroglialen Zellen vermögen auch extrazelluläre Faktoren zu produzieren, die den ramifizierenden Effekt der Astrozyten behindern können. Deshalb wurden auch die Effekte von Proteasen, Disintegrinen und RGD Inhibitoren auf ihre Fähigkeit geprüft, die Interaktion von Mikroglia mit der extrazellulären Matrix zu blockieren (Abb. 28D und 30). Keine Effekte wurden nach Zugabe von Thrombin (0.01-10 U/ml), Keratan-Sulfat-Proteoglycan (12.5 pg-12.5 μ g/ml) und den Disintegrinen Kistrin (1.6 pM. bis 1.6 μ g/ml), Echistatin (2.0 pM. bis 2.0 μ g/ml) und Flavoridin (1.6 pM. bis 1.6 μ g/ml) beobachtet.

Die Zugabe von inhibitorischen Peptiden, die die RGD Aminosäuresequenz enthalten, zeigte in der α M β 2/DAB-Immunozytochemie in Kombination mit dem Phasenkontrast (Abb. 30F,I) nur nach Verwendung der höchsten Konzentration einen Effekt auf die mikrogliale Morphologie, die jedoch gleichzeitig zu einer Zerstörung des Astrozytenrasens führte. Dieser destruktive Effekt auf den Astrozytenrasen trat für GRGDSP bei 0.4 mM, für GRGDTP bei 0.04-0.4 mM und im Falle des zyklischen CRGDSPASSC Peptids Cyclo-1 und des zyklischen RGDdFV Peptids Fr-1 bei 0.2 mM auf (dF steht für D-Phenylalanin). Das GRADSP Peptid, mit einem Austausch von G mit A, diente als unaktivierte Kontrolle und

beeinflusste die mikrogliale Morphologie oder die Intaktheit des Astrozytenrasens selbst bei einer Konzentration von 0.4 mM (Abb. 30I) nicht. Die Zerstörung des Astrozytenrasens wurde vom Auftreten von einzelnen gerundeten Makrophagen begleitet, die der freiliegenden Plastikoberfläche anhafteten (Abb. 30F), wie z.B. bei hohen Konzentrationen von Okadaic-acid. Anders als bei Okadaic-acid oder Calcimycin wurde dieser Effekt nicht bei niedrigeren Konzentrationen beobachtet, solange der Astrozytenrasen noch intakt war. Die Zugabe der RGD-Peptide bei diesen niedrigeren Konzentrationen, bei welchen es zu keiner Schädigung der Astrozyten kam, hatten keinen Einfluss auf die ramifizierte Morphologie der Mikroglia (Abb. 28D und 30G, H und J-L).

Schließlich führte die Zugabe des Prostaglandins D2 zu einer Verminderung der peripheren Zellausläufer bei 1-10 μ M (Abb. 28C und 31B,C; vergleichen Sie mit Abb. 31A). Eine komplette Transformation in kleine, abgerundete Makrophagen erforderte Konzentrationen von 0.1-1 mM (Abb. 31C, Einsatz), drei 10-er Potenzen höher als für den klassischen Prostaglandin D-Rezeptor beschrieben, dessen physiologischer Bereich bei einer Konzentration von 20-200 nM liegt (Narumiya et al., 1999; Monneret et al., 2001). Diese hohen Konzentrationen von PGD2 (0.1-1mM) waren mit Defekten des Astrozytenrasens verbunden und führten zu einem freiliegenden Plastiksubstrat mit entsprechender Toxizität (Abb. 31H), ähnlich wie bei Forskolin (1 mM). Niedrigere Konzentrationen hatten keinen sichtbaren Effekt auf die Mikroglia (Abb.31D). Die Zugabe von ATP (0.1- 100 mM) führte zur Aktivierung und Reduktion der peripheren Zellausläufer. Allerdings kam es nur bei der höchsten geprüften Konzentration von 100 mM zu einer kompletten Umwandlung in runde Makrophagen (Abb. 28C und 31 I-L). Dies beeinflusste nicht den zugrundeliegenden Astrozytenrasen (Abb. 31L). Die Zugabe von UTP (0.1-100 mM) hatte keinen Effekt auf die Morphologie der ramifizierten Mikroglia (Abb. 28C und 31E-G) oder der darunter liegenden Astrozyten.

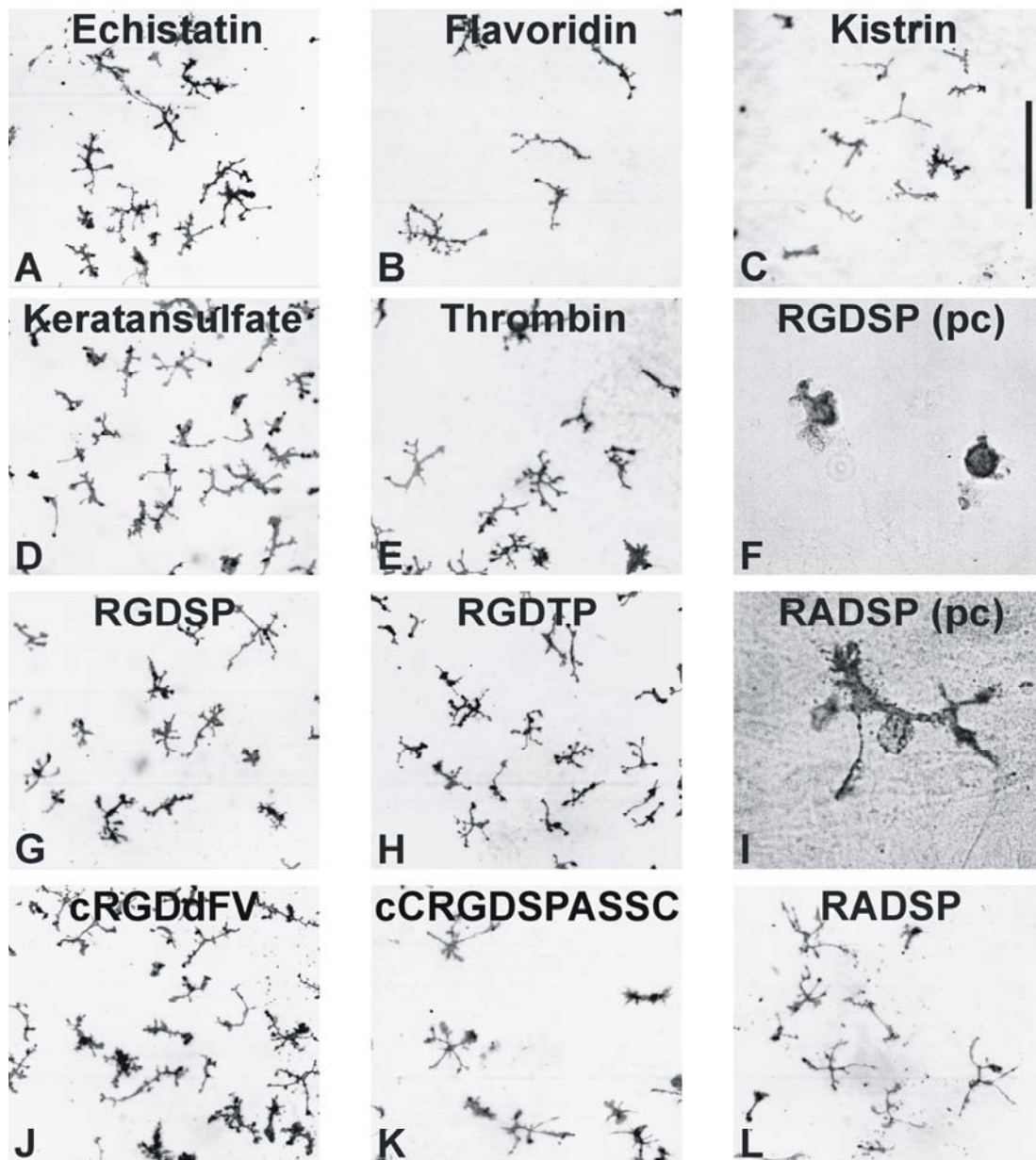


ABBILDUNG (30). Wirkung von verschiedenen Klassen pharmakologischer Reagentien auf Mikroglia in Kokultur. Die Ramifizierung der Mikroglia wird nicht beeinflusst durch die Zugabe von Desintegrinen wie Echistatin (A; 1.6 μ M), Flavoridin (B; 1.6 μ M) oder Kistrin (C; 2 μ M), dem extrazellulären Matrixmolekül Keratansulfat (D; 12.5 μ M ml) oder Thrombin (E; 10 U/ml). Die Zugabe der synthetischen Integrininhibitoren RGDSP (G; 40 μ M), GRGDTP (H; 4 μ M), cyclic RGDdFV (J; 20 μ M) oder cyclic CRGDSPASSC (K; 20 μ M) oder dem inaktiven Analog RADSP (L; 400 μ M) führte zu keiner Veränderung der mikroglialen Morphologie. F und I: Die Kombination mit dem Phasenkontrast (pc) zeigt einen intakten Astrozytenrasen mit Auslöschung des reflektierenden Lichts bei den α M β 2-negativen Astrocyten in I, jedoch nicht in F. Zugabe von 400 μ M des aktiven Inhibitors RGDSP (F) führte zu einem Verschwinden des Astrozytenrasens und zu einer Transformation in kleine, runde Makrophagen. Die α M β 2-positive Mikroglia auf dem intakten Astrozytenrasen zeigt eine ramifizierte Struktur. Maßstabsbalken = 0.25 mm in allen Mikrographen, ausgenommen in den Phasenkontrastmikrographen in F und I (50 μ m).

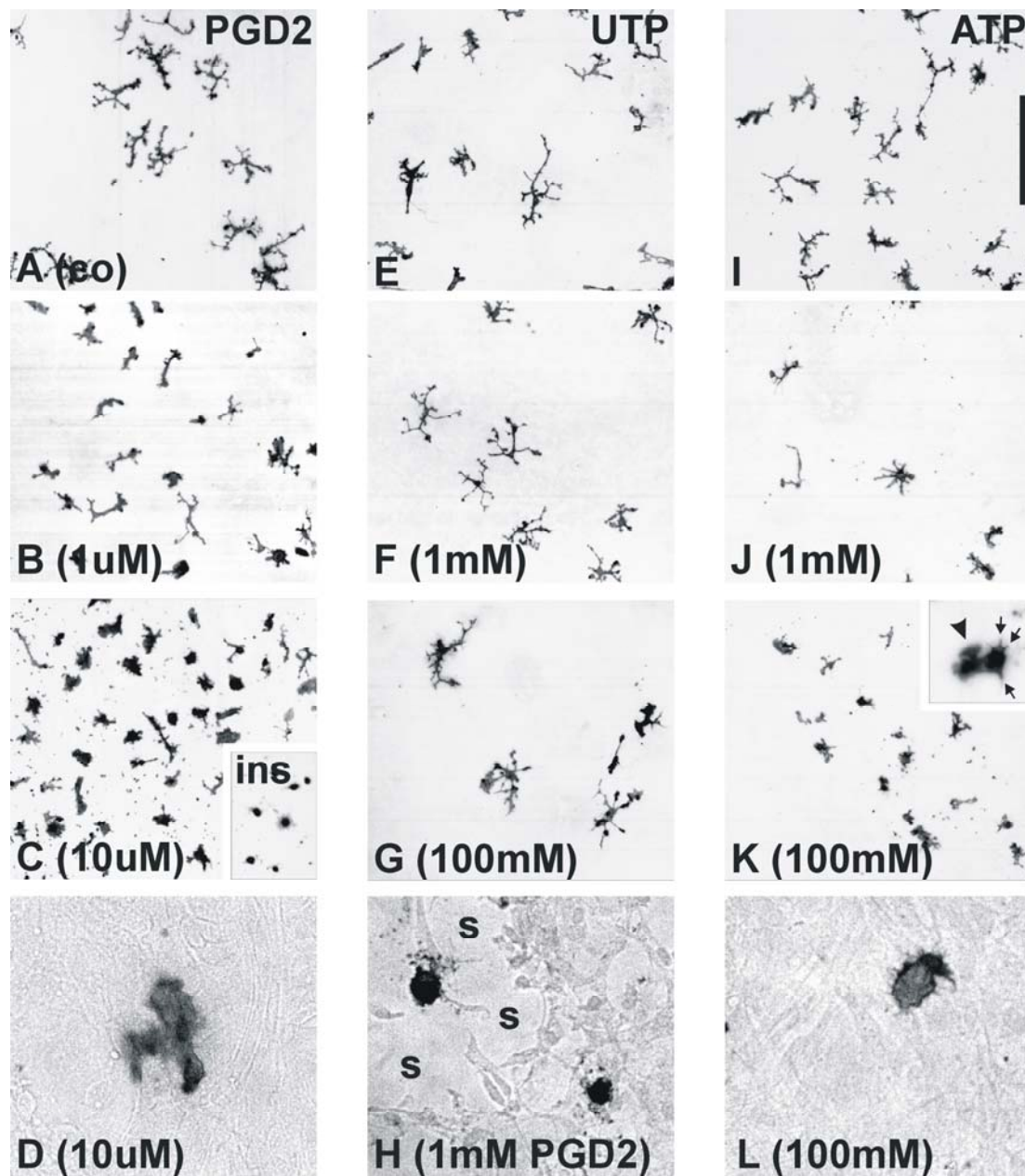


ABBILDUNG (31). Effekt von Prostaglandin D2 (PGD2), UTP und ATP auf Mikroglia in Kokultur. Mikroglia auf einem konfluenten Astrozytenrasen nach Stimulation, sichtbar gemacht durch α M β 2/DAB-Immunozytochemie. Die Konzentrationen der pharmakologischen Zusätze sind jeweils in Klammern angegeben. Die Kontrollen (co) sind in **A**, **E** und **I** dargestellt. **B–D**, **F–H**, **J** und **K** zeigen die Effekte der hinzugefügten Substanzen. **D**, **H** und **L** zeigen bei Kombination mit dem Phasenkontrast einen intakten Astrozytenrasen. **B–D** und **L**: Effekte von Prostaglandin D2. Bei Zugabe von 1 μ M (**B**) kommt es zu einem Anschwellen der mikroglialen Fortsätze. Höhere Konzentrationen (**C**, 10 μ M) führen zu einer Retraktion der Fortsätze und schließlich bei 1 mM (**C**, Bildeinsatz) zu einer Transformation in abgerundete Makrophagen. Die Kombination mit dem Phasenkontrast zeigt zahlreiche Retraktionen der Astrozyten bei der höchsten Konzentrationen von PGD2 (**H**). Ein intakter Astrozytenrasen findet sich bei einer Konzentration von 10 μ M (**D**). Die Ramifizierung der Mikroglia wird nicht beeinflusst durch die Zugabe von UTP bis zu einer maximalen Konzentration von 100mM (**G**). **J–L**: Effekte von ATP. Die Zugabe von 1 mM ATP führt zu einer Verminderung der Zahl der peripheren Fortsätze (**J**) der Mikroglia, jedoch erst bei einer maximalen Dosis von 100 mM (**K**) kommt es zu einer kompletten Transformation in Makrophagen. Der Bildeinsatz in **K** zeigt die Morphologie eines mit ATP behandelten Makrophagen, mit einigen kurzen Filopodien (Pfeile) und einer lamellären Struktur (Pfeilköpfe). Ein intakter Astrozytenrasen findet sich selbst bei der maximalen Konzentration von ATP (**L**). Maßstabsbalken = 0.25 mm in allen Mikrographen, ausgenommen im Bildeinsatz in **C** (225 μ m) und **K** (70 μ m) und in den Phasenkontrastmikrographen **D**, **H** und **L** (50 μ m).

4. Diskussion

Morphologische Veränderungen der Mikroglia sind eine wichtige Begleiterscheinung im verletzten ZNS sowie ein diagnostisches Kennzeichen bei fast allen Formen der Gehirnpathologie. In einer Vielzahl von Fällen gehen sie mit neuronalem Zelltod und dem Auftauchen von Zelldebris aber auch mit einer Induktion von entzündungsassoziierten Zytokinen, wie z.B. Interleukin-6 (IL6), Macrophage Colony Stimulating Factor Receptor (MCSF-R), Tumor Nekrosis Factor alpha (TNFa) und einer Reihe weiterer Zytokine, einher. Die im Zentrum dieser Arbeit stehende Frage war deshalb, welche dieser potentiellen Signale für welche morphologischen Veränderungen der Mikroglia verantwortlich sind.

Das in dieser Studie verwendete Fazialismodell erlaubte die Untersuchung sowohl der frühen mikroglialen Reaktion (Tag 1-4), die mit dem Anschalten von MCSFR und IL6 einhergeht, wie auch der Veränderung nach dem posttraumatischen neuronalen Zelltod mit einem Maximum am Tag 14. Hier führte die MCSF-Defizienz dazu, dass die Mikroglia die meisten frühen Aktivierungsmarker nicht oder nur gering exprimierte, sich nicht auf der Oberfläche der verletzten Neurone ausbreitete und ihren neuronalen Kontakt auf eine kleine Anzahl von fokalen Adhäsionsstellen beschränkte. In den IL6-defizienten Mäusen vermochte die Mikroglia zwar in der Frühphase Kontakte zu den Neuronen auszubilden, jedoch blieben die ramifizierten Zellausläufer erhalten und es kam zu keinem Anschwellen der mikroglialen Zellkörper.

Diese morphologischen Effekte von MCSF und IL6 nach Verletzung beschränkten sich auf die frühe mikrogliale Aktivierung und sie begleitende Veränderungen wie die Rekrutierung von CD3+ Lymphozyten. Bezeichnenderweise gab es nur geringe (IL6^{-/-}, Galiano et al., 2001) oder keine (op/op) Auswirkungen auf die axonale Regeneration und den verzögerten neuronalen Zelltod. Dem folgte eine normale Transformation der Mikroglia in phagozytische Zellen mit dem Auftreten von Gliaknötchen.

Wie schon aus vorhergehenden Studien bekannt, wird neuronaler Zelltod im Fazialismodell von einer Induktion einer Vielzahl der Zytokine (Interleukin-1 beta, Tumor Nekrosis Faktor-alpha, Interferon gamma) und der Einwanderung von Lymphozyten begleitet (Raivich et al., 1998). Hier war eine kausale Zuordnung der mikroglialen Transformation zum Zelldebris deshalb bisher nicht eindeutig möglich.

Aus diesen Gründen wurde die Auswirkung des Zelldebris auf die mikrogliale Morphologie unter vereinfachten Bedingungen in der Zellkultur untersucht. Hier führten neuronale Zellmembrane, die aus normalem Hirngewebe gewonnen wurden, zu einer sehr deutlichen Transformation von ramifizierter Mikroglia in amoeboid-phagozytotische Makrophagen. Dieser Effekt der Hirnmembranen war durchaus gewebsspezifisch, er war weniger deutlich bei anderen Gewebsmembranen (>Leber>Niere>Milz>Muskel), und nicht zu beobachten nach Zugabe von phagozytierbaren, fluoreszenten Latexkügelchen (Fluorobeads).

Da auch die Transformation durch Zelldebris vermutlich durch molekulare Signale ausgelöst wird, wurden im Schlussteil der vorliegenden Arbeit unterschiedliche Kategorien von intrazellulären aktiven Molekülen auf ihre Fähigkeit untersucht, als mögliche Vermittler in der Umwandlung von Mikroglia in Makrophagen zu fungieren. Hier fanden sich vier Kategorien pharmakologischer Substanzklassen, die diese Transformation reproduzieren konnten. Hierbei handelte es sich um Substanzen, die zu einer Erhöhung des intrazellulären Kalzium (Calcimycin) oder cAMP (dibutyryl-cAMP; Forskolin) oder zu einer Inhibition der Phosphatasen (Okadaic Acid) oder G_i-Proteine (Pertussistoxin) führen. Viele der in Frage kommenden extrazellulären Faktoren zeigten in physiologischen Konzentrationen keinen transformierenden Effekt auf die mikrogliale Morphologie.

4.1 MCSF im verletzten Nervensystem

MCSF Mangel führte in den homozygoten, osteopetrotischen Mäusen zu einer starken Reduktion der frühen mikroglialen Antwort, mit verminderter Proliferation der Mikroglia und einem Fehlen der ausgedehnten breitbasigen Bindung der aktivierten Mikroglia an die Oberfläche der verletzten Motoneurone. Diese Veränderungen wurden von einer Reduktion der Infiltration von T-Zellen innerhalb der ersten 24 Stunden nach Verletzung begleitet. Demgegenüber gab es keinen signifikanten Effekt auf die Geschwindigkeit der axonalen Regeneration oder das neuronale Überleben nach Fazialisaxotomie. Die astrozytäre Antwort und die Reduktion des synaptischen Inputs der Motoneurone wurde ebenfalls nicht beeinflusst. Der verzögerte neuronale Zelltod, mit einem Maximum am Tag 14, führte zu einer normalen mikroglialen und lymphozytären Antwort, mit der Anordnung von phagozytotischen Gliaknötchen und einer starken Zunahme der Rekrutierung von T-Zellen in den Bereich von neuronalem Zelldebris.

Diese Daten verweisen auf eine in hohem Grade selektive Rolle von MCSF in der Orchestrierung der frühen Immunüberwachung im verletzten Nervensystem. Außerdem impliziert die Reduktion der Zahl an infiltrierenden T-Zellen in den MCSF-defizienten Tieren eine Schlüsselfunktion dieses Zytokins in der frühen Invasion der Lymphozyten in geschädigtes neuronales Gewebe.

4.1.1 MCSF und der Prozess der mikroglialen Aktivierung

Der Prozess der mikroglialen Aktivierung beginnt innerhalb der ersten 24 Stunden nach Verletzung und führt nach 4 bis 7 Tagen in der Phase der Zielfindung und Adhäsion zur ausgedehnten Bindung der Mikroglia an die neuronalen Perikarya. Die adhärente Mikroglia exprimiert eine Vielzahl von Adhäsionsmolekülen, wie die Integrine $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$, $\alpha M\beta 2$ und TSP (Möller et al., 1996; Kloss et al., 1999). Das Fehlen der breitbasigen Bindung der Mikroglia an die neuronale Oberfläche in den MCSF-defizienten Mäusen und die viel kleinere

Zunahme von TSP, $\alpha\text{M}\beta\text{2}$ und $\alpha\text{5}\beta\text{1}$ implizieren eine wichtige Rolle dieses Zytokins in der Frühphase der Aktivierung und der hiermit einhergehenden morphologischen Veränderungen. MCSF selbst hat einen starken chemotaktischen Effekt auf die vom Gehirnparenchym abstammenden Makrophagen (Calvo et al., 1998) wird durch aktivierte Mikroglia produziert (Thery et al., 1990) und von den bereits anhaftenden mikroglialen Zellen möglicherweise zur weiteren Rekrutierung von Mikroglia an die neuronale Oberfläche sowie zur Aufhebung der bestehenden Kontaktinhibition zwischen ihnen genutzt.

Schließlich exprimieren axotomierte Neurone eine Reihe von Chemokinen, wie MCP-1 und Fractalkin/CX3C1 (Harrison et al., 1998; Schwaiger et al., 1999), und die adhärierende Mikroglia exprimiert die passenden Rezeptoren (CCR2, CX3CR1). Die Deletion des Rezeptors für Fractalkin oder CCR2 (Jung et al., 2000) beeinflusst nicht die mikrogliale Adhäsion und verweist somit auf ein beträchtliches Potential zur Kompensation dieser Mechanismen. Demgegenüber veranschaulicht die in dieser Arbeit beschriebene massive Verringerung der Adhäsion an die geschädigten Neurone in den MCSF-defizienten Mäusen die zentrale Rolle dieses Zytokins in der frühen zellulären Antwort nach Verletzung des ZNS. Das Fehlen von MCSF in den homozygoten op/op Mäusen führte zu einer deutlichen Beeinträchtigung in der Expression früher Marker der mikroglialen Aktivierung. Anders als im Fall der normalen Mäusen gab es nach Verletzung keine statistisch signifikante Zunahme der frühen Aktivierungsmarker, wie TSP oder des $\alpha\text{M}\beta\text{2}$ -Integrins, in den op/op Tieren innerhalb der ersten 24 Stunden nach Verletzung. Dies war von einer geringeren Zunahme der Zellzahl sowie der Expression des MCSF-Rezeptors und des $\alpha\text{5}\beta\text{1}$ -Integrins begleitet: Morphologisch äußerte sich dies in einer verminderten Adhäsion von Mikroglia an die neuronale Oberfläche. MCSF-defiziente Tiere zeigen eine deutlich geringere proliferative Aktivität (Raivich et al., 1994).

Das niedrige Niveau an Immunreaktivität für das ionisierte Ca-bindende Adapterprotein I/IBA1 (Imai et al., 1996) der ruhenden Mikroglia könnte auf eine Beeinträchtigung der mikroglialen Funktion bereits im normalen Gehirn hinweisen. In der Tat verursacht die

Aufhebung der mikroglialen IBA1-Funktion eine Verringerung der Phagozytose (Ohsawa et al., 2000). Jedoch waren die meisten der in dieser Arbeit getesteten Marker der mikroglialen Zellfunktion, wie der MCSF-Rezeptor, α M β 2, α 5 β 1 und α 6 β 1, die Ig-Immunreaktivität und TSP, in der ruhenden Mikroglia der op/op-Mäuse und in den phenotypisch normalen Mäusen gleich. Dies könnte darauf hindeuten, dass die Funktionsbeeinträchtigung von IBA1 im normalen Gehirn nur geringfügiger Natur ist. Zusätzlich zu den direkten Effekten von MCSF auf die MCSF-Rezeptor-positiven Zellen wurde der MCSF-Mangel in den op/op Mäusen auch von einer deutlichen Verringerung der infiltrierenden T-Lymphozyten während der ersten Phase der Lymphozytenrekrutierung begleitet.

Der Mangel an MCSF-Rezeptoren auf T-Zellen selbst weist auf die mögliche Schlüsselrolle der aktivierten mikroglialen Zellen bezüglich der frühen Phase der Immunüberwachung hin. Der ausbleibende Effekt von MCSF auf die Rekrutierung von Lymphozyten in das normale Gehirn oder auf die späte Rekrutierung in die Bereiche von neuronalem Zelldebris verweist auf ein schmales Zeitfenster in der Wirksamkeit dieses mikroglialen Mitogens. Diese Annahme wird durch das Fehlen von funktionellen Effekten des MCSF-Mangels auf die mikrogliale Aktivierung in Anwesenheit von neuronalem Zelldebris am Tag 14 gestützt.

Vorhergehende Untersuchungen über die Expression von MCSF und seines Rezeptors im axotomierten Fazialiskern deuten auf zwei unterschiedliche Regulationsmuster hin: Expression der MCSF-mRNA erfolgt konstitutiv; MCSF ist im normalen Gehirn anwesend; und das Niveau ändert sich nach Verletzung nicht (Raivich et al., 1998b; Streit et al., 1998). Die Expression des MCSF-Rezeptors ist dagegen dynamischer: Die ruhende Mikroglia exprimiert geringe Mengen des MCSF-Rezeptors und zeigt eine starke Zunahme der Immunreaktivität zwischen Tag 1 und Tag 2 nach Axotomie (Raivich et al., 1998b), einhergehend mit einer ausgeprägten mikroglialen Proliferation an den Tagen 2 und 3 (Raivich et al., 1994) und der Adhäsion an die neuronale Oberfläche am Tag 4. Die Down-Regulation des MCSFR erfolgt langsam, so dass noch 14 Tage nach Axotomie ein hohes Niveau der Expression des Rezeptors nachweisbar ist. Das Fehlen des MCSFR auf einer

Subpopulation der Gliaknötchen weist darauf hin, dass dieses Zytokin, obgleich wichtig für die frühen Stadien der Aktivierung, nicht in die Phagozytose oder in die Umgebungsaktivierung der benachbarten Mikrogliazellen involviert ist.

Der gesamte Prozess der MCSF-abhängigen Aktivierung der Mikroglia geht mit einer Zunahme der MCSF-Rezeptoren einher. In der späten Phase (Tag 14) ist noch ein hohes Niveau der MCSF-Rezeptoren vorhanden, aber es besteht keine Sensitivität für dieses Zytokin mehr. Dies deutet darauf hin, dass zusätzliche stimulierende und/oder hemmende Signale vorkommen müssen, die die mikrogliale Empfindlichkeit für MCSF steuern. Gegenwärtige Daten favorisieren IL6, TGF β 1 und TNF α als mögliche Kandidaten.

IL6 wird von axotomierten Neuronen produziert (Murphy et al., 1999b; Streit et al., 2000a), mit einer maximalen Expression am Tag 1 nach Axotomie (Kiefer et al., 1993; Klein et al., 1997). Es erhöht die mikrogliale Aktivierung und Proliferation *in vitro* als auch *in vivo* (Klein et al., 1997; Streit et al., 2000b) und ist über die IL6-bedingte Zunahme der mikroglialen MCSF-Rezeptoren (Galiano et al., 1999) möglicherweise an einer Verstärkung des MCSF-Signals beteiligt.

TGF β 1, TGF β 3 und TNF α sind starke Inhibitoren für die Proliferation der ramifizierten mikroglialen Zellen (Kloss et al., 1997; Jones et al., 1998). Die Expression von TGF β 1 hat einen frühen Beginn (1-2 Tage nach Axotomie), wobei das Maximum erst an den Tagen 4-7, wenn die mikrogliale Proliferation bereits stattgefunden hat, erreicht wird (Kiefer et al., 1993; Streit et al., 1998). Phagozytotische Mikroglia synthetisiert hohe Mengen von TNF α (van Der Laan et al., 1996), dessen Expressionsmuster im Fazialismodell mit dem Maximum des neuronalen Zelltods am Tag 14 zusammenfällt (Raivich et al., 1998a). Obgleich es hypothetisch ist, könnten diese und ähnlich regulierte Zytokine die Wirkung von MCSF verstärken und die Phase für die MCSF-Empfindlichkeit einschränken.

4.1.2 Mikrogliale Aktivierung und neuronales Überleben

Die aktivierten mikroglialen Zellen stellen eine reiche Quelle für verschiedene Moleküle dar, die das neuronale Überleben und die Regeneration sowohl erhöhen als auch hemmen können. Die durch Verletzung vermittelte Produktion von NO, IL1, reagierenden Sauerstoffradikalen, proteolytischen Enzymen oder exzitatorischen Substanzen können zur Pathologie im verletzten Gehirn beitragen und die sekundären Folgeschäden erhöhen (Allan et al., 2000). Nach Stimulation synthetisiert Mikroglia neurotrophe Moleküle wie z.B. den Nerv-Wachstumsfaktor (NGF), TGF β 1 und TSP (Mallat und Chamak, 1994; Kiefer et al., 1995). Einige mikrogliale Moleküle können als zweiseitige Klinge fungieren, abhängig von der aktiven Konzentration und dem pathologischen Zustand des verletzten Gewebes. So hat das Amyloid Vorläuferprotein (APP) einen trophischen Effekt auf eine Subpopulation von Neurone in vitro (Araki et al., 1991; Milward et al., 1992), aber seine erhöhte Synthese und Ablagerung sind ein entscheidendes Ereignis im neurodegenerativen Prozess der Alzheimer-Demenz (St. George-Hyslop, 1999; Emilien et al., 2000; van Leuven, 2000). Ähnliche unterschiedliche Effekte sind sowohl für IL6 (Hama et al., 1990; Campbell et al., 1993; Murphy et al., 1999a; Loddick et al., 1998; Suzuki et al., 1999) als auch für TNF gezeigt worden (Cheng et al., 1994; Prehn 1996; Bruce et al., 1996; Bohatschek et al., 1998; Carlson et al., 1999). Diese Daten deuten darauf hin, dass ein fein abgestimmtes Zusammenspiel zwischen unterschiedlichen zytotoxischen und neurotrophen Effekten der aktivierten mikroglialen Zellen besteht, die zu geringer oder keiner offensichtlichen Resttätigkeit der Mikroglia führen können.

Die Daten bezüglich der Effekte von MCSF sind widersprüchlich. Das Überleben der kortikalen Neurone scheint in den op/op Mäusen nach Gefäßmikrookklusion verringert zu sein (Berezovskaya et al., 1995), wobei dies nicht für die fokale Ischämie im Arteria cerebri media Okklusion-Reperusionsmodell zutrifft (Mies und Raivich, unveröffentlichte Beobachtungen). Wie in dieser Arbeit gezeigt wird, führt das Fehlen von biologisch aktivem MCSF in den homozygoten op/op Mäusen zu einer massive Abnahme der Aktivierung und

Zahl der mikroglialen Zellen im verletzten ZNS-Gewebe. Die Geschwindigkeit der axonalen Regeneration, die Entfernung der präsynaptischen Endigungen von der Oberfläche der verletzten Neurone und der posttraumatische neuronale Zelltod bleiben jedoch in den MCSF-defizienten Tieren unbeeinflusst. Gleiches trifft auch für die astrozytäre Antwort zu. Dies ist in Übereinstimmung mit den Daten von Svensson und Aldskogius (1993a,b), die keinen Effekt der Arabinosidcytosin (ARA-C)-vermittelten Hemmung der mikroglialen Proliferation auf die axonale Regeneration oder auf das „synaptic stripping“ zeigen konnten. Die Entfernung der zahlreichen präsynaptischen Endigungen könnte den exzitatorischen Stress auf die verletzten und sich regenerierenden Motoneurone verringern. Jedoch scheint dies zum größten Teil durch die benachbarten Astrozyten mit ihren Zellausläufern und nicht durch die aktivierten mikroglialen Zellen vermittelt zu werden (Svensson und Aldskogius, 1993b).

Die gegenwärtige Studie scheint Effekte der frühen, MCSF-sensitiven mikroglialen Aktivierung auf das neuronale Überleben oder die Regeneration ausschließen zu können. Hier muss erwähnt werden, dass noch eine geringfügige frühe mikrogliale Aktivierung selbst bei Fehlen von MCSF auftritt. Interessanterweise beeinflusst eine beschleunigte mikrogliale Antwort, wie sie in PTP1C- und p75NTR-defizienten Mäusen auftritt, auch nicht die Geschwindigkeit der axonalen Regeneration (Gschwendtner et al., 1999; Horvat et al., 2001), was gegen eine Wechselbeziehung zwischen früher mikroglialer Aktivierung und neuronaler Antwort spricht.

Die späte mikrogliale Aktivierung in Anwesenheit des neuronalen Zelldebris, die Umwandlung in phagozytotische Makrophagen, die Ausbildung von Gliaknötchen und die Aktivierung der benachbarten, nicht phagozytotischen mikroglialen Zellen wird durch den MCSF-Mangel nicht beeinflusst. Die Mikroglia scheint in schweren Formen der Gehirnpathologie das Zytokin TNF zu exprimieren (Bruce et al., 1996). Die Expression von TNF erreicht am Tag 14 nach Axotomie ihr Maximum, was mit dem Höhepunkt des neuronalen Zelltodes zusammenfällt (Raivich et al., 1998a).

Des Weiteren führt die kombinierte Ausschaltung der Gene, die für den Typ 1 und 2 des TNF-Rezeptors kodieren, zu einem nahezu kompletten Verschwinden der Gliaknötchen am Tag 14 und zu einer 75% Reduktion des neuronalen Zelltods 30 Tage nach Fazialisaxotomie (Bohatschek et al., 1998). Wie in einer vorhergehenden Studie gezeigt werden konnte, wird die Zahl der mikroglialen Zellen um 40% im Kerngebiet der Kontrollseite und um einen Faktor von 3 bis 4 im axotomierten Fazialiskern am Tag 7, dem Zeitpunkt der größten mikroglialen Zelldichte, in den op/op Mäusen verringert (Raivich et al., 1994). Der fehlende Einfluss in den op/op Tieren auf das Überleben der verletzten Neurone im axotomierten Fazialiskern deutet darauf hin, dass die mikrogliale Zellzahl an sich nicht ein limitierender Faktor ist, wenn es um die Generierung eines neurotoxischen Effektes durch die Mikroglia geht.

Wenn die mikroglialen Zellen nicht die axonale Regeneration, das „synaptic stripping“ und das neuronale Überleben während der frühen Stadien nach Durchtrennung des N. facialis beeinflussen, welche Funktion üben diese Zellen während ihrer Adhäsion an die verletzten sich regenerierenden Neurone aus? Untersuchungen über den retrograden Transport von neurotrophen Faktoren haben gezeigt, dass diese Neurone ihre Abbauprodukte mit einer kurzen Verzögerung, nachdem sie im neuronalen Zellkörper angekommen sind, wieder erneut sekretieren (Johnson et al., 1978; Ure und Campenot, 1994).

Dieses tritt auch bei applizierten retrograden Markern wie Weizenkeimagglutinin (WGA), Tetanustoxin (TT), Fluorogold (FG) und Meerrettichperoxidase (HRP) auf, die durch die angrenzenden Neuritenendigungen (WGA, TT), durch gliale Zellen (FG) oder sogar durch benachbarte perivaskuläre Makrophagen (HRP) aufgenommen werden (Schwab und Thoenen, 1977; Harrison et al., 1984; Balin et al., 1986; Angelov et al., 1999). In der Tat kommt der trans-synaptischen Aufnahme des retrograd transportierten Materials eine Schlüsselfunktion für die Ausbreitung von Infektionen des Gehirnparenchyms mit neurotrophen Viren, wie Tollwut, Varicella oder Herpes simplex, zu (Lentz et al., 1983; Rostad et al., 1989; Strack und Loewy, 1990; Dehal et al., 1993).

Der frühe Zellkontakt sowie die breitbasige Adhäsion der Mikroglia an die beschädigten Neurone könnte zur Steigerung der Aufnahme dieser Krankheitserreger, ihrer Abbauprodukte sowie der nicht integrierten Bestandteile des Viruscapsids beitragen. Die mikrogliale Induktion von MHC und kostimulatorischen Molekülen, wie ICAM1 und B7.2 (Bohatschek et al., 1998; Werner et al., 1998; Raivich et al., 1999a), und die frühe Invasion von Lymphozyten in das geschädigte Gehirn stützt offenbar diese Annahme, dass die aktivierte Mikroglia eine zentrale Rolle in der Immunüberwachung des verletzten neuronalen Gewebes spielt, insbesondere noch vor dem Auftreten von Zelldebris.

4.1.3 Zelluläre Antwort im verletzten Nervensystem

Die Fazialisaxotomie verursacht eine besonders ausgeprägte zelluläre Reaktion an zwei unterschiedlichen Lokalisationen im Nervensystem: distal zum Läsionsort im peripheren Anteil des N. facialis und im Kerngebiet in der Umgebung der betroffenen Neurone. Im distalen Teil des Axons führt die Läsion zur Wallerschen Degeneration, einem Prozess der durch die Invasion von hämatogenen Leukozyten, insbesondere von Makrophagen, unterstützt wird. Wie in der aktuellen Arbeit gezeigt werden kann, ist dieser Prozess MCSF-unabhängig. Dies wird vom Wiedereintritt von aussprossenden Axonen in die distalen endoneuralen Schläuche gefolgt, was zur Reinnervation des distalen Zielorgans bei gleichzeitiger Remyelinisierung der neuen Axone durch die denervierten Schwannschen Zellen führt.

Gleichzeitig kommt es im ZNS in den verletzten Neuronen zu einer Erhöhung der Proteinsynthese, verschiedener Transkriptionsfaktoren, Adhäsionsmolekülen, Zytokinen, Rezeptoren für Wachstumsfaktoren und Neuropeptiden wie Galanin und CGRP (Graeber et al., 1989; Herdegen et al., 1991; Haas et al., 1993; Raivich et al., 1995; Murphy et al., 1999a; Gschwendtner et al., 1999; Schwaiger et al., 2000; Werner et al., 2000; Jones et al., 2000). Die für die Neurotransmitter zuständigen Enzyme, die eine normale synaptische Funktion

unterhalten, werden herunterreguliert. Alternativ hierzu kommt es zu einer Zunahme von Signalenzymen, wie der NO-produzierenden NADPH-Diaphorase (Kreutzberg, 1963).

Die umgebenden Astrozyten steigern ihre Produktion von GFAP (Graeber et al., 1986), rearrangieren ihr Zytoskelett hin zu einer stellaren Form (Raivich et al., 1999a) und senden dünne astrozytäre Zellausläufer in den synaptischen Raum aus, um auf diese Weise den Kontakt mit den Neuritenendigungen zu unterbrechen (Graeber und Kreutzberg, 1988; Svensson und Aldskogius, 1993b). Die mikroglialen Zellen werden sehr schnell aktiviert, proliferieren stark, adhärieren an verletzte Neurone und breiten sich über deren Zelloberfläche aus. Die vermehrte Expression von MHC1 und kostimulatorischer Faktoren und der verstärkte Influx von T-Zellen unterstreicht die zentrale Rolle der Mikroglia in der Immunüberwachung des verletzten Gehirns (Raivich et al., 1998a; Bohatschek et al., 1998).

Insgesamt führt die Verletzung des Nervensystems zu verschiedenen reaktiven Veränderungen in unterschiedlichen Zelltypen, die eine hohe Anzahl von möglichen Interaktionen bedingen. Es wurde angenommen, dass die unterschiedlichen Aspekte der glialen Aktivierung auch den Prozess der axonalen und neuronalen Regeneration unterstützen. Neue Resultate, einschließlich der Daten dieser Arbeit, haben an dieser Annahme Zweifel aufgeworfen. So beeinflusst die zytostatische Entfernung der proliferierenden mikroglialen Zellen nicht den Prozess der axonalen Regeneration (Svensson und Aldskogius, 1993a). Ein ähnlicher ausbleibender Effekt auf die Geschwindigkeit der Regeneration sowie das neuronale Überleben wurde auch in der vorliegenden Arbeit beobachtet, in welcher der MCSF-Mangel die frühe mikrogliale Aktivierung beeinträchtigt.

Diese Daten deuten darauf hin, dass die zelluläre Antwort auf neuronale Verletzung in unterschiedliche Reaktionsmodule aufgeteilt ist, zwischen denen nur eine geringe Interaktion besteht. In diesem Konzept sind das neuronale Reparaturprogramm und die Antwort der Immunüberwachung zwei zentrale Module, die die zellulären Änderungen im verletzten Nervensystem regulieren.

Beide Module enthalten vermutlich verschiedene Untereinheiten, die durch spezifische molekulare Mechanismen gesteuert werden. Die selektiven Effekte von MCSF auf die frühe Antwort der Immunüberwachung unterstützt diese Idee einer hierarchischen Einteilung der verschiedenen Bereiche.

Interessanterweise wird dieser Gedanke der in hohem Grade strukturierten modularen Organisation der zellulären Reaktion auch durch Untersuchungen über die Effekte der transgenen Deletion der $\alpha 7$ -Integrinuntereinheit gestützt. Diese Deletion verringert in großem Maße die Geschwindigkeit der Regeneration des peripheren Nervs (Werner et al., 2000); sie führt zu einer posttraumatischen neuronalen Expressionssteigerung der korrespondierenden Integrin- $\beta 1$ Einheit und zu einer Zunahme des perikaryal-axonalen Aussprossens der Axone während der späten neuronalen Antwort am Tag 14 (Galiano et al., 1999). Jedoch beeinflusst sie weder die frühen noch die späten Phasen der mikroglialen Aktivierung oder die Rekrutierung von Lymphozyten (Werner et al., 2000). Zur Zeit ist jedoch wenig über die neuronalen Auslöser dieser unterschiedlichen zellulären Reaktionsmechanismen bekannt. Die Induktion der Transkriptionsfaktoren wie c-jun, jun-D und STAT3 sowie ihre nachfolgende Phosphorylierung sind sehr frühe Ereignisse in der neuronalen Antwort nach Verletzung (Herdegen et al., 1991, 1998; Haas et al., 1993; Schwaiger et al., 2000). Diese Moleküle sind offenbar Kandidaten für die Auslösung eines solchen frühen Effektes, die in den entsprechenden transgenen Modellen geprüft werden sollten.

Hierbei liefern selektive Defekte in der Aktivierung bestimmter Zellen, wie z.B. die in dieser Arbeit dargestellten Defekte in der frühen mikroglialen Aktivierung in den op/op Mäusen, eine wichtige Lektion über den Beitrag der Mikroglia zur Gesamtantwort nach Verletzung. In den MCSF-defizienten Tieren führt das Fehlen dieses Zytokins zu einer verminderten mikroglialen Aktivierung in der Frühphase nach Verletzung, fehlender Anhaftung an die Neurone sowie zu einer Reduktion der frühen Rekrutierung der Lymphozyten in den axotomierten Fazialiskern. Es beeinflusst jedoch nicht die axonale Regeneration, den Prozess des „synaptic stripping“, das neuronale Überleben oder die zelluläre Antwort der

benachbarten Astrozyten. Dies deutet auf eine Schlüsselrolle von MCSF in der Einleitung der entzündlichen Veränderungen im Gehirn und in der Steuerung der Interaktion mit dem Immunsystem hin.

4.2 Interleukin-6 und die Aktivierung der Mikroglia

Die Verletzung des Gehirnparenchyms geht mit einer Vielzahl an zellulären Veränderungen unmittelbar im Bereich der Läsion, der anterograden Degeneration, der retrograden reagierenden Neurone und in ihrer nicht-neuronalen zellulären Umgebung einher. Obgleich viele dieser Änderungen vermutlich selektiv durch eine Menge lokaler Faktoren vermittelt werden, die gerade eine spezifische Reaktion bewirken, scheint durchaus die Notwendigkeit für eine kleine Anzahl an Signalen zu bestehen, die die Gesamtantwort auf die Verletzung und deren nachfolgende Regeneration steuern. Die Daten dieser Arbeit sowie bereits durchgeführter Studien deuten darauf hin, dass das Zytokin IL6 einen wichtigen Beitrag zur gesamten zellulären Antwort nach Verletzung des ZNS leistet. Das Fehlen von IL6 in homozygoten IL6 Mäusen verursachte eine massive Abnahme der Rekrutierung von Lymphozyten, eine verminderte frühe Aktivierung von Mikroglia sowie eine Verringerung der axonalen Regeneration und ein erhöhtes spätes perineuronales Aussprossen der Axone (Galiano et al., 2001). Vorangegangene Studien zeigten auch eine signifikante Rolle von IL6 auf die astrozytäre Aktivierung (Klein et al., 1997; Penkowa et al., 1999; Raivich et al., 1999a, b; Sugiura et al., 2000), das Überleben der sensorischen Neurone (Murphy et al., 1999a; Zhong et al., 1999) und das Expressionsmuster von Neuropeptiden in den verletzten Neuronen (Klein et al., 1997; Murphy et al., 1999b). Außerdem wird IL6 schnell nach Trauma sowohl im peripheren als auch zentralen Nervensystem hochreguliert (Kiefer et al., 1993; Bolin et al., 1995; Klein et al., 1997; Murphy et al., 1999a; Legos et al., 2000), was auf eine Schlüsselrolle in der Steuerung der frühen zellulären Gesamtantwort nach Trauma spricht.

Diese Befunde unterstreichen die Notwendigkeit, die IL6-defizienten Tiere eingehender zu untersuchen, um die physiologische Funktion dieses endogenen Zytokins besser verstehen zu lernen.

Das Fehlen von IL-6 führt bei der Mikroglia zu einer deutlich abgeschwächten Veränderung der Morphologie nach Verletzung. Dieser Einfluss scheint Stadium-spezifisch zu sein, da eine Vielzahl an frühen Aktivierungsmarkern wie MCSFR, $\alpha 5\beta 1$ und $\alpha 6\beta 1$ -Integrin und TSP in den IL6-defizienten Mäusen verringert sind. Es zeigt sich auch eine mäßige Abnahme der mikroglialen Proliferation (Klein et al., 1997), verbunden mit der Verminderung der entsprechenden Aktivierungsmarker und der mikroglialen Zelldichte.

Im Gegensatz zu diesen frühen Effekten wird die späte mikrogliale Aktivierung am Tag 14 und die Zunahme von MHC1 und B7.2 nicht durch einen IL6 Mangel beeinflusst (Galiano et al., 2001). Insgesamt deuten die gegenwärtigen Daten auf zwei unterschiedliche Phasen der neuroglialen Aktivierung hin, die jeweils durch unterschiedliche Zytokine gesteuert werden: Die erste Phase wird durch die verletzten regenerationsfähigen Neurone IL6 und MCSF vermittelt; die zweite Phase wird durch die Reaktion auf den neuronalen Zelltod sowie durch die Zytokine IL1 und TNF α , wobei IL6 in dieser Phase eine verhältnismäßig geringe Rolle spielt, gesteuert (Galiano et al., 2001; Raivich et al., 2002, 2003).

Die IL6-abhängige Rekrutierung der Lymphozyten und die Expression der immunassoziierten Moleküle durch die aktivierten mikroglialen Zellen (Galiano et al., 2001) deuten offenbar darauf hin, dass diese Zellen Bestandteil eines in hohem Grade spezialisierten immunen Überwachungsprogramms sind. Die Reaktion dieses Programms scheint schrittweise zu erfolgen. Während des ersten Phase sucht die aktivierte Mikroglia ihre Umgebung auf aktivierte T-Zellen ab, bindet Antikörper und Antigene mit ihren neu exprimierten Rezeptoren für Immunoglobuline, Komplement und lymphozytäre Oberflächenstrukturen.

Dieses wird von der Adhäsion der Mikroglia an den Zellkörper der verletzten Neurone und dem Beginn der Expression von MHC Molekülen begleitet, einem Schlüsselbestandteil in der Antigenpräsentation. Die Apposition und Ausbreitung auf der neuronalen Oberfläche bringt

die Mikroglia in eine strategisch wichtige Position, um lösliche Moleküle und kleine Teilchen aufzunehmen, die durch die verletzten Neurone ausgeschüttet werden, gefolgt von der intrazellulären Verarbeitung und der Darstellung gegenüber aktivierten T-Zellen, die in das verletzte ZNS rekrutiert werden. Auch die frühe Induktion des mikroglialen MHC1 ist von der Anwesenheit von IL6 abhängig (Galiano et al., 2001). Die morphologischen Veränderungen der aktivierten Mikroglia, mit Anschwellen des Zellkörpers und der starken Proliferation der lysosomalen Organellen in der Umgebung der Neurone (Raivich et al., 1998b), können diesen Prozess unterstützen.

Interessanterweise führt die IL6-abhängige astrogliale Antwort (Klein et al., 1997) zu einer erhöhten physikalischen Stabilität des geschädigten Gewebes (Pekny et al., 1999), wobei die hemmenden Eigenschaften der glialen Narben die zelluläre Migration und das Aussprossen zusätzlich blockieren können (Giftochristos und David, 1988; McKeon et al., 1991; Brodkey et al., 1995; Amberger et al., 1998; Fawcett and Asher, 1999; Menet et al., 2000; Moon et al., 2000) und somit die mögliche Ausbreitung von ansteckenden Krankheitserregern über aussprossende Axone oder nicht-neuronale Zellen verhindern. Tatsächlich ist die Aussprossung zentraler Axone in den IL6+/+ Tieren nach Axotomie des N. facialis deutlich geringer als in den IL6-/- Mäusen (Galiano et al., 2001).

Die niedrigere Dichte der axonalen Sprouts in der grauen Substanz des axotomierten Fazialiskern, verglichen mit denen der benachbarten weißen Substanz, würde offenbar den hemmenden Effekt der reagierenden Astrozyten der grauen Substanz unterstützen. Diese Hemmung des axonalen Aussprossens kann eine rationale Strategie sein, wenn das ZNS einer infektiösen Bedrohung gegenüber steht (Raivich et al., 1999a, b). Jedoch sind aussprossende Axone eine Vorbedingung für die erfolgreiche Reparatur im verletzten Gehirn. Die Identifizierung der Signale wie IL6, die diese Antwort und ihre Neutralisation hemmen, zeigt, dass das Wissen um diese Zusammenhänge gleichzeitig zu einer Verbesserung der neurologischen Regeneration in einer sterilen Umgebung beitragen kann.

Zusammenfassend erscheinen die Aktivierung der Mikroglia, der Astrozyten und die lymphozytäre Rekrutierung als konstitutive Elemente einer schrittweisen zellulären Antwort, die für die Immunüberwachung im verletzten ZNS verantwortlich sind und eine mögliche Verbreitung von Infektionen verhindern sollen. Die Mikroglia von IL6-defizienten Mäusen vermag in der Frühphase zwar Kontakte zu den Neuronen auszubilden, jedoch bleiben die ramifizierten Zellausläufer erhalten und es kommt zu keinem Anschwellen der mikroglialen Zellkörper.

Darüber hinaus kommt es zu einer wesentlich schwächeren Induktion einer Reihe von Zelladhäsionsmolekülen und dem Haupthistokompatibilitätskomplex Typ I/Major histocompatibility complex class I (Galiano et al., 2001), was eine entscheidende Rolle für die Antigenpräsentation spielt. Insgesamt deuten die Daten darauf hin, dass dieses Zytokin eine zentrale Rolle in der Initialphase der Immunüberwachung im verletzten Zentralnervensystem spielt, noch bevor es zum Auftreten des neuronalen Zelldebris kommt. Obgleich Daten zu Infektionen des ZNS zum gegenwärtigen Zeitpunkt fehlen, führt IL6 Mangel zu einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber infektiösen Erkrankungen, denen IL6-defiziente Tiere schnell erliegen, wohingegen die gesunden Wildtypiere nicht erkranken (Kopf et al., 1994).

4.3 Transformation der Mikroglia in Phagozyten: Rolle des Zelldebris

Der Verlust der peripheren Ramifikation und die Umwandlung in Phagozyten in Anwesenheit von Zelldebris sind entscheidende morphologische Veränderungen der Mikroglia in schweren Formen von ZNS-Pathologien.

In vivo wird diese Analyse jedoch durch die unzureichende exakte Bestimmung des Zelltods, das asynchrone Auftreten von Zelldebris, mit allen hiermit verbundenen Zwischenstadien der mikroglialen Aktivierung und den hierbei auftretenden sekundären Reaktionen der

benachbarten gesunden oder verletzten Neurone, der Oligodendrozyten, des Gefäßsystems oder der rekrutierten Leukozyten erschwert.

Der Hauptvorteil des in dieser Arbeit verwendeten in-vitro-Modells lag darin, dass es die Untersuchung verschiedener phagozytotischer Stimuli auf die morphologische Veränderung einer homogenen Zellpopulation und die damit verbundenen molekularen Signale ermöglicht, indem die Anregung an definierten Zeitpunkten gegeben werden kann, ohne die Vielzahl an möglichen Sekundäreffekten auszulösen. Weiterhin bietet die Verwendung dieses Kokultursystems den Vorteil, mit ramifizierten mikroglialen Zellen zu arbeiten, die dem überwiegenden Phänotyp dieser Zellen im normalen Gehirn entsprechen. So ist die mikrogliale Ramifizierung in der Kokultur weit besser entwickelt als in der Reinkultur (Sievers et al., 1994), ist gegenüber reinen Mikrogliaulturen weniger empfindlich gegenüber Außensignalen (Schilling et al., 2001; Wollmer et al., 2001) und zeigt eine selektive Transformation der Morphologie auf Zelldebris, die der in vivo sehr ähnlich ist (Kloss et al., 1997, 2001; Jones et al., 1998). Schließlich bietet der Gebrauch von einem hybriden Kokultursystem, mit Mikroglia aus der Maus und Astrozyten aus der Ratte die Möglichkeit, die Mikroglia zu einem bestimmten Zeitpunkt auf dem Astrozytenrasen auszusäen und zwischen den Astrozyten und der Mikroglia besser zu unterscheiden.

4.3.1 Wirkung von Zellmembranen auf ramifizierte Mikroglia-Kokulturen

Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, führt die Zugabe von Gehirnmembranen zu einer schnellen graduellen Transformation, beginnend mit einem Anschwellen des Zellkörpers und dem Verlust der peripheren Zellausläufer, gefolgt vom Auftreten kleiner abgerundeter Makrophagen innerhalb von 12-24 Stunden. Die fluoreszenzfarbene Markierung der Gehirnmembrane zeigt deren Aufnahme durch fast alle transformierte Makrophagen und deutet auf einen Zusammenhang zwischen der Phagozytose und den morphologischen Veränderungen hin. Jedoch ist Phagozytose alleine nicht ausreichend, um eine Transformation zu veranlassen.

So führte die Aufnahme von Fluorobeads durch die ramifizierte Mikroglia nicht zu einer Umwandlung in Makrophagen. Außerdem gab es beträchtliche Unterschiede in der Fähigkeit unterschiedlicher Membranpräparationen aus verschiedenen Geweben zu einer Transformation beizutragen, was die Notwendigkeit eines zweiten Stimulus nach Phagozytose vermuten ließ. Interessanterweise folgte auf die Entfernung der Gehirnmembrane ein umgekehrter Reramifizierungsprozess, mit initialer Verbreiterung und flächiger Ausbreitung der abgerundeten Makrophagen, gefolgt vom Aussenden von primären und sekundären Zellausläufern mit einer stufenweisen Verringerung des angeschwollenen Zellkörpers. Dieser Prozess war der stufenweisen Ramifizierung von Mikroglia während der postnatalen Entwicklung und der Rückkehr zum ramifizierten Phänotyp nach Abbau von Zelledebris sehr ähnlich.

Eine Subpopulation von ungefähr 10-20% der mikroglialen Zellen nahm kein phagozytotisches Material auf und behielt eine völlig ramifizierte Morphologie selbst in unmittelbarer Nähe zu vollständig transformierten Makrophagen bei. Dieses war selbst in Anwesenheit hoher Konzentrationen von Gehirnmembranen zu beobachten. Diese Heterogenität in der Zellpopulation der Mikroglia und Astrozyten, Zelledebris in unterschiedlichem Maße aufzunehmen, ist möglicherweise eine ihrer wichtigen Eigenschaften. In vivo könnte diese mikrogliale Heterogenität dazu beitragen, dass sowohl phagozytotische als auch nichtphagozytotische Mikroglia selbst bei Vorhandensein großer Mengen von Zelledebris gleichzeitig präsent sind. Obgleich hypothetisch, könnte eine solche Heterogenität eine entscheidende Rolle für eine differenzierte Immunüberwachung des verletzten ZNS spielen. In-vivo exprimiert die umgebungsaktivierte Mikroglia verstärkt MHC1 und kostimulatorische Faktoren wie B7.2 und ICAM1, deren Niveau jedoch nicht so hoch wie für die phagozytotischen Makrophagen ist (Werner et al., 1998; Bohatschek et al., 1999). Einige kostimulatorische Faktoren, wie das $\alpha\beta 2$ -Integrin, werden von der umgebungsaktivierten Mikroglia nicht exprimiert (Kloss et al., 1999). Ein solches Fehlen von kostimulatorischen Molekülen kann in Anwesenheit des Antigens und der passenden MHC

Moleküle zu einer Inaktivierung oder sogar zum Tod der T-Zelle führen (Bretscher und Cohn, 1970; Robey und Allison, 1995), welche das Antigen auf der aktivierten Mikroglia erkennt.

Eine ähnliche Heterogenität wurde in dieser Arbeit auch für die zugrundeliegenden Astrozyten beobachtet, obgleich der Anteil der phagozytotischen und nichtphagozytotischen Zellen umgekehrt verteilt war: die meisten der kultivierten Astrozyten zeigten nur eine geringe Aufnahme der rhodaminmarkierten Gehirnmembrane und der Fluorobeads. Die Phagozytose durch Astrozyten wird auch *in vivo* beobachtet (Raine, 1976; al-Ali und al-Hussain, 1996; Bechmann und Nitsch, 1997). Die kombinierte Deletion der astrozytären Filamentproteine GFAP und Vimentin führt zu einer Beeinträchtigung des Abbau von Zelldebris nach Verletzung (Pekny et al., 1999). Somit könnten auch *in vitro* diese Filamente an der Beseitigung des Zellrückstands von der oberen Schicht mitbeteiligt sein.

Die Aufnahme von Fluorobeads durch Astrozyten und ramifizierte Mikroglia wird durch die Zugabe von Gehirnmembranen gehemmt. Diese Hemmung erfolgte stufenweise mit Zugabe zunehmender Mengen von Gehirnmembranen und lässt aufgrund seiner Sättigung bei hohen Konzentrationen an einen rezeptorvermittelten Mechanismus denken. Die ähnliche Kinetik der Aufnahme von Zellmembranen in Mikroglia und Astrozyten lässt darauf schließen, dass in beiden Zelltypen ähnliche Rezeptoren für die Aufnahme verantwortlich sind. Die Aufklärung dieser Rezeptoren wird dazu beitragen, den Prozess der Phagozytose von neuronalen Zelldebris besser zu verstehen und die für eine spezifische zelluläre Antwort notwendigen nachfolgenden Signalkaskaden zu verstehen.

Intrazelluläre Signale scheinen nach der Phagozytose von neuronalem Zelldebris die Transformation in abgerundete Makrophagen zu vermitteln. Nahezu alle transformierten Makrophagen zeigen die Aufnahme von rhodaminmarkierten Gehirnmembranen, wobei die weiterhin ramifizierten mikroglialen Zellen unmarkiert blieben, was auf eine Kopplung von Phagozytose und Transformation schließen lässt. Das offensichtliche Fehlen eines Effekts von amöboiden Makrophagen auf die unmittelbar benachbarte ramifizierte Mikroglia spricht gegen ein extrazelluläres Signal, obgleich sich eine mäßige Aktivierung nicht ausschließen

lässt. Dasselbe trifft auch auf die Subpopulation der zufällig verteilten phagozytotischen Astrozyten zu, die keine bevorzugte Kolokalisation. Mit amöboiden Makrophagen oder mit ramifizierter Mikroglia zeigten. Möglicherweise sind die intrazellulären Signale, die zu einer Deramifikation der Mikroglia führen, ähnlich oder identisch denen, die eine Aktivierung nach Phagozytose verursachen. So erhöht die Zugabe von Myelin die Produktion von Wachstumsfaktoren durch die phagozytierenden Makrophagen (Baichwal et al., 1988). Die Zugabe von neuronalen oder glialen Zellmembranen in Mikrogliaekulturen verursacht eine starke Expression von MHC2 (Beyer et al., 2000), wobei selbiges nicht nach Phagozytose von Flurobeads zu beobachten ist, was die Notwendigkeit von biologischem Zelldebris unterstreicht (Beyer et al., 2000).

Die morphologischen Veränderungen, die durch Gehirnmembranen ausgelöst werden, scheinen jedoch nicht einfach nur auf die Zugabe eines biologischen Zelldebris zu beruhen. So unterscheidet sich die Fähigkeit zur Transformation von Gewebe zu Gewebe. Insbesondere Gehirnmembrane, gefolgt von Membranen aus Niere und Leber, zwei großen epithelialen Geweben, vermochten eine Änderung der mikroglialen Morphologie zu induzieren. Die Aktivität von Gewebe mesodermalen Ursprunges, wie Muskel und Milz, war verhältnismäßig schwach. Die Zelloberfläche der Neurone, Gliazellen und Epithelzellen ist in hohem Grade polarisiert, und der Effekte auf die ramifizierte Mikroglia reflektiert möglicherweise den chemischen Aufbau ihrer Zellmembranen.

Unter anderen Bedingungen handelt es sich um dasselbe Gewebe, welches den umgekehrten Effekt der Ramifikation von Monozyten veranlassen kann. In vivo ist die Ramifikation im Gehirn am ausgeprägtesten, aber auch die Makrophagen in Leber (Kuffer Zellen) und Niere weisen mit ihren peripheren Zellausläufern eine ramifizierte Morphologie auf, im Gegensatz zu den mehr abgerundeten Phänotypen im Skelettmuskel oder in der roten Pulpa der Milz. Ebenso wie die Astrozyten verursachen konfluente Zellrasen von Epithelzellen aus Niere und Leber eine Ramifikation der auf ihrer Oberfläche kultivierten Monozyten (Wilms et al., 1997), wobei dieser Effekt wahrscheinlich über das konditionierte

Medium vermittelt wird. Insgesamt scheinen das adulte ZNS und epitheliales Gewebe eine doppelte Kontrolle über die Morphologie der jeweils residenten Makrophagen auszuüben. Sie vermögen unter gesunden Bedingungen eine Ramifikation zu induzieren und im Falle von pathologischer Veränderung zu einer Aktivierung, mit Verlust der peripheren Zellausläufer und Umwandlung in Phagozyten zu führen. Diese abgerundeten Makrophagen produzieren zahlreiche Zytotoxine und neurotrophe Moleküle und scheinen eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von Sekundärschäden zu spielen.

4.3.2 Pharmakologie der mikroglialen Transformation

In diesem Teil der Arbeit wurde das Kokultursystem dazu benutzt, um die starke deramifizierende Wirkung verschiedener pharmakologischer Substanzen zu zeigen, die eine Erhöhung des intrazellulären Kalziums (Calcimycin), ein hohes Niveau von cAMP (dibutyryl-cAMP), eine Aktivierung der Adenylatcyclase (Forskolin) und eine Hemmung der G-Proteine (Pertussistoxin) als auch der Serine/ Threonin-Proteinphosphatasen 1 und 2A (Okadaicacid) bewirken. Interessanterweise zeigten vorhergehende Untersuchungen zum mikroglialen Zelltod nach Applikation von dibutyryl-cAMP oder Forskolin in der mit α M β 2-Immunreaktivität kombinierten TUNEL-Färbung nur eine geringe Wirkung (Bohatschek und Kalla, unveröffentlichte Beobachtungen).

Im Fall vom dibutyryl-cAMP waren sowohl in den behandelten (1 μ M-1mM) als auch unbehandelten Kulturen in der TUNEL-Färbung nur 1%-2% der α M β 2-positiven Mikroglia markiert und keine Astrozyten; im Fall von 1mM Forskolin waren 5% der α M β 2-positiven Mikroglia TUNEL-positiv, im Vergleich zu 1%-2% in den Kontrollen und in den mit 1-100 μ M Forskolin behandelten Kulturen (Kalla et al., 2003). Verglichen mit der bis zu 80% TUNEL-positiven Mikroglia 24 h nach entfernen von GMCSF (Jones et al., 1997), sind die oben beschriebenen Effekte verhältnismäßig mild. Dies stimmt mit einer mäßigen Toxizität von Forskolin überein und lässt darauf schließen, dass die meisten abgerundeten mikroglialen Zellen selbst auf dem beschädigten Astrozytenrasen keine Apoptose durchmachen.

Kein Effekt auf die mikrogliale Morphologie wurde für dibutyryl-cGMP oder für UTP beobachtet. Die Zugabe von ATP hatte einen mäßigen Effekt, welcher jedoch nur bei sehr hohen unphysiologischen Konzentrationen (100 mM) zu beobachtet war. Extrazelluläre Matrixbestandteile, Integrinrezeptorblocker, Disintegrine oder die Serinprotease Thrombin hatten alle keinen Einfluss auf die Morphologie, trotz vorhergehender Studien, die einen Effekt auf reine Mikrogliazellkulturen zeigen konnten. Die Zugabe von Prostaglandin D2 (PGD2), einem Molekül, das durch aktivierte mikrogliale Zellen produziert wird, hatte einen transformierenden Effekt. Dieser trat jedoch bei Konzentrationen zwei Zehnerpotenzen größer als die für PGD2 exprimierten Rezeptoren auf. Außerdem war die komplette Transformation im Fall von PGD2 und Forskolin mit Konzentrationen verbunden, die mit einer Störung der intakten Astrozytenschicht einhergingen und somit indirekte, giftige Effekte implizieren.

4.3.2.1 Effekte von intrazellulären Stimuli auf ramifizierte Mikroglia in Zellkultur

Die Ergebnisse in der Zellkultur implizieren vier verschiedene Kategorien pharmakologischer Substanzen, die zu einer Transformation der ramifizierten Zellen in abgerundete Makrophagen führen. So wurden starke stimulierende Effekte für Substanzen beobachtet, die zu einer Erhöhung des intrazellulären Kalziums und cAMP führen oder eine Hemmung der G-Proteine und Serine/Threonin-Proteinphosphatasen 1 und 2A bewirken. Insgesamt deuten diese Effekte auf zwei gegensätzlich regulierte intrazelluläre Mechanismen hin: einerseits führen erhöhte Konzentrationen von Kalzium und cAMP zu einer Umwandlung in Makrophagen; auf der anderen Seite tragen aktivierte Phosphatasen und Pertussis-sensitive G-Proteine dazu bei, einen ramifizierten Phänotyp beizubehalten.

Die meisten der oben genannten Moleküle spielen eine wichtige Rolle während der Phagozytose und scheinen an der physiologischen Transformation in Makrophagen beteiligt zu sein. Die Vorbehandlung humaner Monozyten mit Pertussistoxin, einem Inhibitor von G-Proteinen, blockiert die Fähigkeit, Bakterium vom Wildtyp zu internalisieren (Schaeffer und

Weiss, 2001). Ein ähnlich inhibitorischer Effekt wurde auch für Okadaicacid (Stromhaug et al., 1997; Pahan et al., 1998), einem Inhibitor der Serine/Threonin Proteinphosphatasen PP1 und PP2A, beobachtet. Die Phagozytose konnte auch durch eine Erhöhung von cAMP verringert werden (Deporter et al., 1977; Thomas et al., 1997; Rossi et al., 1998), was als wichtiger negativer Feedbackmechanismus dienen könnte, zumal eine Erhöhung von cAMP in den Bereichen der Internalisation durch die Makrophagen beobachtet wird (Birmelin und Decker, 1984; Pryzwansky et al., 1998).

Auf der anderen Seite gleicht cAMP auch Phagozytosedefekte in den C3H/HeJ Makrophagen aus (Vogel et al., 1981) und scheint für die Transformation in immunkompetente Makrophagen erforderlich zu sein (Peters et al., 1990). Dies unterstreicht seine Rolle in der phagozytotischen und postphagozytotischen Signalkaskade. Schließlich führt die Phagozytose bei peripheren Blutmonozyten und in hepatischen Kupfferzellen zu einem schnellen Anstieg des freien zytosolischen Kalzium (Bermelin und Decker, 1983; Kim et al., 1992), welches als „second messenger“ bei der Phagozytose beteiligt sein könnte. Hohe Kalziumkonzentrationen, eine Rekrutierung von Calcium-bindenden Calmodulin und die Aktivierung der calmodulinabhängigen Kinase CAMK2 sind für eine erfolgreiche Aufnahme, Tötung und Verdauung von Bakterien wie z.B. dem Mykobakterium tuberkulose entscheidend (Malik et al., 2001).

Neue Studien deuten auf eine phagozytotische Mitbeteiligung des calcium-bindenden Proteins IBA1 hin (Ohsawa et al., 2000), welches spezifisch in aktivierter Mikroglia und Makrophagen exprimiert wird (Imai et al., 1996) und zu einer starken Actin-Bindung führt (Sasaki et al., 2001). Außerdem führen die Entleerung der Ca^{2+} -Speicher im endoplasmatischen Retikulum sowie die langanhaltende Verringerung des cytoplasmatischen Ca^{2+} -Spiegels mit Thapsigargin zu einer Rücktransformation der Makrophagen in ramifizierte Mikroglia in reinen mikroglialen Zellkulturen (Yagi et al., 2000). Die physiologische Rolle der oben genannten Moleküle in der Transformation von Makrophagen sollte in Zukunft noch mit Hilfe von transfizierten Genmutanten bestätigt

werden. Hier könnte der Gebrauch des hybriden Mikroglia-Astrozyten Kokultursystems mit Mäusemikroglia und Astrozyten aus der Ratte ein Vorteil sein, da es die Beurteilung von Effekten auf einen speziellen Zelltyp unter Verwendung von speziesspezifischen Reagentien zulässt.

Es scheint ein beträchtliches Potential für die Interaktion zwischen den unterschiedlichen Signalkaskaden zu geben, die zu einer mikroglialen Deramifikation führen. Die pertussis-sensitiven G_i alpha Proteine sind starke Inhibitoren der zytosolischen Adenylatcyclase. Ihre Inaktivierung durch das Pertussistoxin blockiert ihre Fähigkeit, die Adenylatcyclase zu inhibieren (Bokoch et al., 1983; Kaslow et al., 1987) und ermöglicht so eine Ansammlung von cAMP als Antwort auf den passenden Stimulus (Fishel et al., 1970; Katada und Ui, 1981). Die Erhöhung von Kalzium und die nachfolgende Rekrutierung von calcium-bindenden Calmodulin (Malik et al., 2001) könnte ein wichtiger, überwiegend stimulierender Effekt auf unterschiedliche Isoformen der Adenylatcyclase sein und zu einer erhöhten Ansammlung von cAMP führen (Defer et al., 2000).

Okadaic acid, ein Inhibitor der Serine/Threonin Proteinphosphatasen PP1 und PP2A, scheint einen stark stimulierenden Effekt auf raf-1 und die MAP-Kinase zu haben (Gomez-Cambronero et al., 1993; Kharbanda et al., 1994), beides Bestandteile einer allgemeinen intrazellulären Kaskade, die Signale integriert, die durch Wachstumsfaktoren, Kalzium und zyklische Nukleotide vermittelt werden (Anderson et al., 1990). Diese Daten deuten darauf hin, dass die Proteinphosphorylierung an den PP1 und PP2A sensitiven Serin- und Threoninstellen, und folglich an den Okadaicacid-sensitiven Stellen, einen stark deramifizierenden Effekt hat.

Ein ähnlicher deramifizierender Effekt durch Proteinphosphorylierung wird auch in vivo für die PTP1C-defizienten Mäuse (MeV) angenommen. PTP1C ist eine Tyrosinphosphatase, die in aktivierten mikroglialen Zellen stark hochreguliert wird. Nach Fazialisaxotomie in den PTP1C-defizienten Mäusen kommt es schnell zur Transformation der aktivierten Mikroglia in Makrophagen (Horvat et al., 2001). Dies kann nicht in den normalen Wildtypen

beobachtet werden, was eine Proteinphosphorylierung an den PTP1C-sensitiven Tyrosinstellen sowie an den Okadaicacid-sensitiven Serine/Threonin Stellen impliziert, wenn die mikrogliale Transformation vermittelt wird.

In der Mikroglia und in den Makrophagen hängt die Hochregulation von PP2A sowie PTP1C von Mitogenen wie MCSF und GMCSF ab (Chen et al., 1996; Jiao et al., 1997). Aufgrund eines hemmenden Feedbackmechanismus wird somit einer Hyperphosphorylierung des MCSF-Rezeptors sowie anderer Proteine und eine erhöhte Aktivität der Makrophagen in Abwesenheit dieser Phosphatasen verhindert (Umeda et al., 1999; Horvat et al., 2001; McMahon et al., 2001). Beide Mitogene sind in der Kokultur in einer proliferationsstimulierenden Konzentration vorhanden (Kloss et al., 1997; Schilling et al., 2001). Die Inhibition der Phosphatasen mit Okadaicacid könnte zu einer unphysiologischen Hyperphosphorylierung ihrer Proteinziele führen und somit eine Transformation der noch ramifizierten Zellen (Jones et al., 1998) in vollständig abgerundete Makrophagen verursachen. PP2A spielt auch eine hemmende Rolle auf die Proteinkinasen, die durch cAMP, Kalzium und die Calmodulin-abhängigen Signalkaskaden aktiviert werden (Berger et al., 1993; Westphal et al., 1998; Zakany et al., 2002). Durch die hemmende Wirkung von Okadaicacid auf PP2A wird eine direkte Aktivierung dieser Moleküle imitiert.

4.3.2.2 Effekte von extrazellulären Stimuli auf ramifizierte Mikroglia in Zellkultur

Im Gegensatz zu in-vitro-Studien mit reinen Mikrogliazellkulturen (Chamak und Mallat, 1991; Tanaka und Maeda, 1996; Wollmer et al., 2001) implizieren die Ergebnisse aus der Kokultur einen fehlenden Einfluss von extrazellulären Molekülen auf die Transformation von ramifizierter Mikroglia in Makrophagen. So kann Keratansulfat in reinen Mikrogliazellkulturen Ramifikation induzieren (Wilms et al., 1999), bleibt jedoch im Kokultursystem ohne Wirkung auf deramifizierte Zellen. Ähnlich verhält es sich mit den drei geprüften Disintegrinen (Flavoridin, Kistrin, Echistatin), die andererseits keinen deramifizierenden Effekt auf die Mikroglia zeigten.

Im Falle der inhibitorischen RGD-Peptide, führten alle vier Peptide zum Auftreten von abgerundeten Makrophagen, jedoch jeweils bei einer Konzentration, die auch eine komplette Zerstörung des zugrundeliegenden Astrozytenrasens verursachte. Das Fehlen eines spezifischen Effekts auf die mikroglialen Zellen und die Empfindlichkeit der Astrozyten gegenüber diesen Peptiden, sind beide im Einklang mit der Verteilung fokaler Adhäsionen und der extrazellulären Matrix in der Kokultur. Beide sind in interastrozytären Kontakten zahlreich vorhanden (Bohatschek et al., 2001) und bilden die entsprechenden Angriffsstellen für die RGD-Peptide. Das Vorhandensein eines etwa gleichstarken Effektes bei allen vier Peptiden in der jeweils gleichen Konzentration und das Fehlen eines Effektes bei Verwendung des Kontrollpeptids mit Austausch einer Aminosäure in einer für die Objekterkennung zentralen Position unterstreicht die Spezifität dieses Effektes.

Das Fehlen fokaler Adhäsionen und die gering ausgeprägte extrazelluläre Matrix auf der Astrozytenoberfläche sind eine wichtige Eigenschaft von Mikroglia-Astrozyten-Kontakten (Bohatschek et al., 2001). Jedoch ist die Mikroglia zur Ausbildung spezifischer Adhäsionen fähig. So zeigen sie sowohl in vivo als auch in vitro hochentwickelte Kontakte zu den benachbarten Neuronen und zu anderen mikroglialen Zellen, (Streit et al., 1987; Sudo et al., 1998). Sie exprimieren auch zahlreiche verschiedene Integrine, wie z.B. $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$, und $\alpha M\beta 2$ (Kloss et al., 1999, 2001), die derartige Adhäsion vermitteln können. Gegenwärtig können wir einen direkten Einfluss der Integrine auf die Ramifizierung der Mikroglia, die nicht durch fokale Adhäsionen und auch nicht durch die RGD-Sequenz vermittelt werden, nicht sicher ausschließen. Die aktuellen Daten deuten jedoch auf eine indirekte Rolle über die Ausbildung eines konfluenten Astrozytenrasens hin. Hinsichtlich der mikroglialen Integrine scheint es, dass diese mehr in die Interaktion mit Neuronen und anderen mikroglialen Zellen eingebunden sind, als an der Regulation eines ramifizierten Phänotyp im Beisein von lebenden Astrozyten.

Schwere Gehirnverletzungen führen zu einer erhöhten Synthese und Freigabe von vielen Trauma- und Entzündungs-assoziierten Molekülen, einschließlich Zytokinen,

Prostaglandinen, Proteasen wie Thrombin sowie intrazellulären Nukleotiden. ATP und UTP werden von undichten verletzten Zellen oder von stark elektrisch stimulierten Zellen freigesetzt (Schipke et al., 2002), Thrombin an Orten der lokalen Koagulation sowie durch lokale Synthese in geschädigtem Gewebe (Citron et al., 2000) und PGD₂, das eigentlich im ZNS vorkommende Prostaglandin (Siren, 1982), hauptsächlich von aktivierten mikroglialen Zellen (Matsuo et al., 1995; Minghetti und Levi, 1995). Interessanterweise schien keines dieser Moleküle einen starken, die Ramifikation inhibierenden Effekt in der Kokultur zu haben, obgleich sie andere Parameter der mikroglialen Aktivierung beeinflussten (Walz et al., 1993; Norenberg et al., 1997; Möller et al., 2000).

In vorhergehenden Studien (Kloss et al., 1997; Jones et al., 1998) zeigten zahlreiche Zytokine keinen Einfluss auf die ramifizierte Morphologie der Mikroglia, obgleich sie die Proliferation erhöhten (MCSF, GMCSF, IL1, IL3, IL6) oder inhibierten (TGFβ₁, IL2, IL4, IL10, TNFα, IFNγ). Des weiteren führte die Zugabe von Thrombin, anders als bei Neuronen, bei denen es *in vitro* nach Zugabe zu einem Kollaps der Neuriten kommt (Jalink und Moolenaar, 1992), zu keiner derartigen Degeneration der ramifizierten Mikroglia. Von all den extrazellulär aktiven Molekülen, die in der vorliegenden Arbeit geprüft wurden, hatten nur ATP und PGD₂ einen mäßig deramifizierenden Einfluss auf die mikrogliale Morphologie, ohne gleichzeitig den zugrundeliegenden Astrozytenrasen zu schädigen. Jedoch wurden diese Effekte nur bei Konzentrationen zwei Zehnerpotenzen über denen der vorhandenen Rezeptoren für PGD (Narumiya et al., 1999; Monneret et al., 2001) oder der lokalen effektiven ATP-Konzentrationen (0.1-1mM) im verletzten Gewebe beobachtet und scheinen somit nichtphysiologische Effekte wiederzuspiegeln. ATP scheint bei physiologisch relevanten Konzentrationen von 1mM zu einer erhöhten peripheren Verästelung in reinen mikroglialen Zellkulturen zu führen (Wollmer et al., 2001).

Das Fehlen eines deramifizierenden Effektes von extrazellulären Signalen ist in Übereinstimmung mit der selektiven Wirkung des Zelldebris auf die phagozytierende und nicht auf die benachbarte nichtphagozytierende Mikroglia, und verweist auf die intrazelluläre

Signalkaskade, die zu einer Deramifikation führt. Die Identifikation der eigentlichen Mediatoren dieses Transformationsprozesses aus der Reihe der wahrscheinlichen Kandidaten, die in der gegenwärtigen Arbeit beschrieben werden, wird sicher zu einem besseren Verständnis der molekularen Mechanismen verschiedener Formen der Gehirnpathologie beitragen. Außerdem wird dieses Verständnis zur Entwicklung von Strategien führen, die eine Verminderung der Sekundärschäden sowie eine erfolgreiche Regeneration im verletzten Nervensystem bedingen werden.

5. Zusammenfassung

Morphologische Veränderungen der Mikroglia, einer normalerweise hochverästelten, und mit Gewebsmakrophagen verwandten Hirnzelle, sind eine wichtige Begleiterscheinung bei fast allen Formen der Gehirnpathologie. Selbst geringfügige neurale Verletzungen führen zu einer Abnahme der mikroglialen Verästelung, Expression verschiedener Adhäsionsmoleküle und der Anheftung der Mikroglia an die betroffenen Strukturen, wie z.B. die verletzten Neurone. Dabei schwellen die Mikroglia an, wobei es Hinweise gibt, dass sie antigenes Material von verletzten Neuronen übernehmen und es den einwandernden T-Lymphozyten präsentieren. Auf diese Weise spielen sie eine wichtige Rolle in der Immunüberwachung des verletzten Nervensystems. Neuronaler Zelltod und das Auftauchen des Zelldebris führen zu einer weiteren Transformation der Mikroglia in fortsatzlose (deramifizierte), amoeboid-phygozytotische Makrophagen, die das Hirndebris beseitigen.

In der hier vorliegenden Arbeit wurden im Fazialisaxotomiemodell der Maus, in den MCSF und IL6-defizienten Tieren, und in der Astrozyten-Mikroglia Zellkultur molekulare Signale untersucht, die diese morphologischen Veränderungen der Mikroglia steuern. Hier führte die MCSF-Defizienz zu einer Hemmung der initialen Anheftung der Mikroglia an die Oberfläche der verletzten Neurone und die von IL6 zu einer Hemmung der etwas später einsetzenden mikroglialen Anschwellung, Deramifikation und der Expression von antigenpräsentierenden Molekülen (MHC1). Allerdings führte weder die Defizienz von IL6 noch von MCSF zu einer Hemmung der späten mikroglialen Transformation von Mikroglia in Makrophagen, als Auswirkung auf den verspäteten neuronalen Zelltod.

Wie schon aus vorhergehenden Studien bekannt, wird neuronaler Zelltod von einer Induktion einer Vielzahl der Zytokine (Interleukin-1 beta, Tumor Nekrosis Faktor-alpha, Interferon gamma) und der Einwanderung von Lymphozyten begleitet. Hier war eine kausale Zuordnung der mikroglialen Transformation zum Zelldebris deshalb bisher nicht eindeutig möglich.

Aus diesen Gründen wurde die Auswirkung des Zelldebris auf die mikrogliale Morphologie unter vereinfachten Bedingungen in der Zellkultur untersucht. Hier führten neuronale Zellmembranen, die aus normalem Hirngewebe gewonnen wurden, zu einer sehr deutlichen und gewebsspezifischen Transformation von ramifizierter Mikroglia in amoeboid-phagozytotische Makrophagen. Im Schlussteil der vorliegenden Arbeit wurden unterschiedliche Kategorien von intrazellulären aktiven Molekülen auf ihre Fähigkeit untersucht, als mögliche Vermittler in der Umwandlung von Mikroglia in Makrophagen zu fungieren. Viele der in Frage kommenden extrazellulären Faktoren zeigten in physiologischen Konzentrationen keinen transformierenden Effekt auf die mikrogliale Morphologie. Allerdings fanden sich hier 4 Kategorien pharmakologischer Substanzklassen, die diese Transformation reproduzieren konnten: Substanzen, die zu einer Erhöhung des intrazellulären Kalzium (Calcimycin) oder cAMP (dibutyryl-cAMP; Forskolin) und zu einer Inhibition der Phosphatasen (Okadaic Acid) oder G_i-Proteine (Pertussistoxin) führen.

Insgesamt weist die spezifische Reaktion der Mikroglia-Zellen nach Verletzung des ZNS auf ein stark konserviertes Programm hin, dem eine wichtige Rolle beim Schutz und bei der Regeneration des verletzten Nervensystems zukommt. Das bessere Verständnis dieser hierarchischen Organisation und der dabei involvierten molekularen Signale wie MCSF, IL6, Ca, cAMP, Phosphatasen oder Gi-Proteine ist deshalb wichtig als Ausgangspunkt für eine gezielte therapeutische Intervention bei Schädigungen des Nervensystems.

6. Literaturverzeichnis

- Adams JC (1992) Biotin amplification of biotin and horseradish peroxidase signals in histochemical stains. *J Histochem Cytochem* 40:1457-63.
- al-Ali SY, al-Hussain SM (1996) An ultrastructural study of the phagocytic activity of astrocytes in adult rat brain. *J Anat* 188:257-262.
- Allan SM, Parker LC, Collins B, Davies R, Luheshi GN, Rothwell NJ (2000) Cortical cell death induced by IL-1 is mediated via actions in the hypothalamus of the rat. *Proc Natl Acad Sci* 97:5580-5585.
- Amberger VR, Hensel T, Ogata N, Schwab ME (1998) Spreading and migration of human glioma and rat C6 cells on central nervous system myelin in vitro is correlated with tumor malignancy and involves a metalloproteolytic activity. *Cancer Res* 58:149-158.
- Anderson NG, Maller JL, Tonks NK, Sturgill TW (1990) Requirement for integration of signals from two distinct phosphorylation pathways for activation of MAP kinase. *Nature* 343:651-653.
- Angelov DN, Gunkel A, Stennert E, Neiss WF (1995) Phagocytotic microglia during delayed neuronal loss in the facial nucleus of the rat - time course of the neuronofugal migration of brain macrophages. *Glia* 13:113-129.
- Angelov DN, Walther M, Streppel M, Guntinas-Lichius O, Neiss WF, Probstmeier R und Pesheva P (1998) Tenascin-R is antiadhesive for activated microglia that induce downregulation of the protein after peripheral nerve injury: a new role in neuronal protection. *J Neurosci* 18:6218-6229.
- Angelov DN, Walther M, Popratiloff A, Lachnit N, Neiss WF (1999) Brain perivascular phagocytes and the presentation of antigen to the immune system. *J Neurochem* 73:154.
- Araki W, Kitaguchi N, Tokushima Y, Ishii K, Aratake H, Shimohama S, Nakamura S, Kimura J (1991) Trophic effect of beta-amyloid precursor protein on cerebral cortical neurons in culture. *Biochem Biophys Res Commun* 181:265-271.
- Aubert I, Ridet JL, Gage FH (1995) Regeneration in the adult mammalian CNS: guided by development. *Current Opinion in Neurobiology* 5:625-635.
- Baichwal RR, Bigbee JW, DeVries GH (1988) Macrophage-mediated myelin-related mitogenic factor for cultured Schwann cells. *Proc Natl Acad Sci* 85:1701-1705.
- Balin BJ, Broadwell RD, Salzman M, El Kalliny M (1986) Avenues for entry of peripherally administered protein to the central nervous system in mouse, rat and squirrel monkey. *J Comp Neurol* 251:260-280.
- Banati RB, Gehrmann J, Schubert P, Kreutzberg GW (1993) Cytotoxicity of microglia. *Glia* 7:111-118.
- Barron KD (1983) Comparative observations on the cytologic reactions of central and peripheral nerve cells to axotomy. In Kao CC; Bunge RP, Reier PJ (eds): *Spinal Cord Reconstruction*. New York: Raven Press: pp. 7-40.
- Baumgartner BJ und Shine HD (1998) Permanent rescue of lesioned neonatal motoneurons and enhanced axonal regeneration by adenovirus-mediated expression of glial cell-line-derived neurotrophic factor. *J Neuroscience Research* 54:766-777.
- Bechmann I, Nitsch R (1997) Astrocytes and microglial cells incorporate degenerating fibers following entorhinal lesion: a light, confocal, and electron microscopical study using a phagocytosis-dependent labeling technique. *Glia* 20:145-154.
- Berezovskaya D, Maysinger S, Fedoroff (1995) The hematopoietic cytokine, colony-stimulating factor 1, is also a growth factor in the CNS: congenital absence of CSF-1 in mice results in abnormal microglial response and increased neuron vulnerability to injury. *Int J Dev Neurosci* 13:285-299.
- Berger HA, Travis SM, Welsh MJ (1993) Regulation of the cystic brosis transmembrane conductance regulator Cl⁻ channel by specific protein kinases and protein phosphatases. *J Biol Chem* 268: 2037-2047.
- Bermelin M, Decker K (1983) Ca²⁺-influx as an initial event in phagocytosis by rat Kupffer cells. *Eur J Biochem* 131:539-543.
- Beuche W; Friede RL (1984) The role of non-resident cells in Wallerian degeneration. *J Neurocytology* 13:767-796.
- Beyer M, Gimsa U, Eyiipoglu IY, Hailer NP, Nitsch R (2000) Phagocytosis of neuronal or glial debris by microglial cells: upregulation of MHC class II expression and multinuclear giant cell formation in vitro. *Glia* 31:262-266.
- Blinzinger K. und Kreutzberg GM (1968) Displacement of synaptic terminals from regenerating motoneurons by microglial cells. *Z Zellforsch* 85:145-157.
- Bignami A, Eng LF, Dahl D und Uyeda CT (1972) Localization of the glial fibrillary acidic protein in astrocytes by immunofluorescence. *Brain Research* 43:429-435.
- Birmelin M, Decker K (1984) Synthesis of prostanoids and cyclic nucleotides by phagocytosing rat Kupffer cells. *Eur J Biochem* 142:219-225.
- Bisby MA (1995) Regeneration of peripheral nervous system axons. In Waxman SG, Kocsis JD, Stys PK (eds): *The Axon*. New York: Oxford University Press, pp. 553-578.
- Bohatschek M, Jones LL, Kreutzberg GW und Raivich G (1998) Expression of immunoregulatory molecules MHC 1, MHC 2 and B7.2 in the axotomized mouse facial nucleus. *Clinical Neuropathology* 17:286.
- Bohatschek M, Christian UA, Roger Kalla, Raivich G (2001) In vitro model of microglial deramification. *J Neurosci Res* 64:508-522.

- Bockaert J, Homburger V, Rouot B (1987) GTP binding proteins: a key role in cellular communication. *Biochemie* 69:329-338.
- Bokoch GM, Katada T, Northup JK, Hewlett EL, Gilman AG (1983) Identification of the predominant substrate for ADP-ribosylation by islet activating protein. *J Biol Chem* 258:2072-2075.
- Bolin LM, Verity AN, Silver JE, Shooter EM, Abrams JS (1995) Interleukin-6 production by Schwann cells and induction in sciatic nerve injury. *J Neurochem* 64:850-858.
- Boucsein C, Kettenmann H, Nolte C (2000) Electrophysiological properties of microglial cells in normal and pathologic rat brain slices. *Eur J Neurosci* 12:2049-2058.
- Bobrow MN, Shaughnessy KJ, Litt GJ (1991) Catalyzed reporter deposition, a novel method of signal amplification. II. Application to membrane immunoassays. *J Immunol Methods* 137:103-12.
- Bobrow MN, Harris TD, Shaughnessy KJ, Litt GJ (1989) Catalyzed reporter deposition, a novel method of signal amplification. Application to immunoassays. *J Immunol Methods* 125:279-85.
- Bretscher P, Cohn M (1970) A theory of self-nonself discrimination. *Science* 169:1042-1049.
- Brodkey JA, Laywell ED, O'Brien TF, Faissner A, Stefansson K, Doerries HU, Schachner M, Steindler DA (1995) Focal brain injury and upregulation of a developmentally regulated extracellular matrix protein. *J Neurosurg* 82:106-112.
- Brown MC, Perry VH, Hunt SP, Lapper SR (1994) Further studies on motor and sensory nerve regeneration in mice with delayed Wallerian degeneration. *European Journal of Neuroscience* 6:420-428.
- Bruce AJ, Boling W, Kindy MS, Peschon J, Kraemer PJ, Carpenter MK, Holtsberg FW, Mattson MP (1996) Altered neuronal and microglial responses to excitotoxic and ischemic brain injury in mice lacking TNF receptors. *Nat Med* 2:788-794.
- Brück W, Huitinga I, Dijkstra CD (1996) Liposome-mediated monocyte depletion during wallerian degeneration defines the role of hematogenous phagocytes in myelin removal. *J Neuroscience Res* 46:477-484.
- Cajal SR (1928) *Degeneration and Regeneration in the nervous system*. Translated and edited by RM May, Haffner: published 1957.
- Calvo CF, Dobbertin A, Gelman M, Glowinski J, Mallat M (1998) Identification of CSF-1 as a brain macrophage migratory activity produced by astrocytes. *Glia* 24:180-186.
- Cammer W und Tansey FA (1988) Carbonic anhydrase immunostaining in astrocytes in the rat cerebral cortex. *Journal of Neurochemistry* 50:319-322.
- Campbell IL, Abraham CR, Masliah E, Kemper P, Inglis JD, Oldstone MB, Mucke L (1993) Neurologic disease induced in transgenic mice by cerebral overexpression of interleukin 6. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:10061-10065.
- Carlson NG, Wieggl WA, Chen J, Bacchi A, Rogers SW, Gahring LC (1999) Inflammatory cytokines IL-1 alpha, IL-1 beta, IL-6, and TNF-alpha impart neuroprotection to an excitotoxin through distinct pathways. *J Immunol* 163:3963-3988.
- Carroll SL, Miller ML, Frohnert PW, Kim SS, Corbett JA (1997) Expression of neuregulins and their putative receptors, ErbB2 and ErbB3, is induced during Wallerian degeneration. *J Neuroscience* 17:1642-1659.
- Chamak B, Mallat M (1991) Fibronectin and laminin regulate the in vitro differentiation of microglial cells. *Neuroscience* 45:513-527.
- Chen HE, Chang S, Trub T, Neel BG (1996) Regulation of colony stimulating factor 1 receptor signaling by the SH2 domain-containing tyrosine phosphatase SHPTP1. *Mol Cell Biol* 16:3685-3697.
- Cheng B, Christakos S, Mattson MP (1994) Tumor necrosis factors protect neurons against metabolic-excitotoxic insults and promote maintenance of calcium homeostasis. *Neuron* 12:139-153.
- Citron BA, Smirnova IV, Arnold PM, Festoff BW (2000) Upregulation of neurotoxic serine proteases, prothrombin, and protease-activated receptor 1 early after spinal cord injury. *J Neurotrauma* 17:1191-1203.
- Clark WM, Lauten JD, Lesov N, Woodward W, Coull BM (1995) Time course of ICAM-1 expression and leukocyte subset infiltration in rat forebrain ischemia. *Mol Chem Neuropathol* 26: 213-230.
- Compston A, Zajicek J, Sussman J, Webb A, Hall G, Muir D, Shaw C, Wood A, Scolding N (1997) Glial lineages and myelination in the central nervous system. *J Anat* 190:161-200.
- Dailey AT, Avellino AM, Benthem L, Silver J, Kliot M (1998) Complement depletion reduces macrophage infiltration and activation during Wallerian degeneration and axonal regeneration. *J Neurosci* 18:6713-6722.
- Deckert-Schluter M, Bluethmann H, Rang A, Hof H, Schluter D (1998) Crucial role of TNF receptor type 1 (p55), but not of TNF receptortype 2 (p75), in murine toxoplasmosis. *J Immunol* 160:3427-3436.
- Defer N, Best-Belpomme M, Hanoune J (2000) Tissue specificity and physiological relevance of various isoforms of adenylyl cyclase. *Am J Physiol Renal Physiol* 279:400-416.
- del Rio-Hortega P (1919) El 'tercer elemento' de los centros nerviosos. Poder fagocitario y moviilidad de la microglia. *Bol Soc Esp Biol* 154-166.
- del Rio-Hortega P (1932) Microglia. In Penfield W (ed): *Cytology and Cellular Pathology of the Nervous System*. New York: Paul B. Hoeber, pp. 481.
- Dehal NS, Dekaban GA, Krassioukov AV, Picard FJ, Weaver LC (1993) Identification of renal sympathetic preganglionic neurons in hamsters using transsynaptic transport of herpes simplex type 1 virus. *Neuroscience* 56:227-240.

- Deporter DA, Dieppe PA, Glatt M, Willoughby DA (1977) The relation of cyclic AMP levels to phagocytosis and enzyme release in acute inflammation in vivo. *J Pathol* 121:129-139.
- De Simone R, Giampaolo A, Giometto B, Gallo P, Levi G, Peschle C, Aloisi F (1995) The costimulatory molecule B7 is expressed on human microglia in culture and in multiple sclerosis acute lesions. *J Neuropathol Exp Neurol* 54:175-187.
- Dickson DW, Lee SC, Mattiace LA, Yen SH (1993) Microglia and cytokines in neurological disease, with special reference to AIDS and Alzheimer's disease. *Glia* 7:75.
- Didier M, Harandi M, Aguera M, Bancel B, Tardy M, Fages C, Calas A, Stagaard M, Mollgard K und Belin MF (2000) Differential immunocytochemical staining for glial fibrillary acidic (GFA) protein, S-100 protein and glutamine synthetase in the rat subcommissural organ, nonspecialized ventricular ependyma and adjacent neuropil. *Cell and Tissue Research* 245:343-351.
- Du Yan S, Zhu H, Fu J, Yan SF, Roher A, Tourtellotte WW, Rajavashisth T, Chen X, Godman GC, Stern D, Schmidt AM (1997) Amyloid-beta peptide-receptor for advanced glycation endproduct interaction elicits neuronal expression of macrophage-colony stimulating factor: a proinflammatory pathway in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:5296-5301.
- Eddleston M, Mucke L (1993) Molecular profile of reactive astrocytes - implications for their role in neurological disease. *Neuroscience* 54:15-36.
- Eder C, Schilling T, Heinemann U, Haas D, Hailer NP und Nitsch R (2000) Morphological, immunophenotypical and electrophysiological properties of resting microglia in vitro. *European Journal of Neuroscience* 11:4251-4261.
- Eglitis MA, Mezey E (1997) Hematopoietic cells differentiate into both microglia and macroglia in the brains of adult mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:4080-4085.
- Emilien G, Maloteaux JM, Beyreuther K, Masters CL (2000) Alzheimer disease: mouse models pave the way for therapeutic opportunities. *Arch Neurol* 57:176-181.
- Engelhardt JI, Tajti J, Appel SH (1993) Lymphocytic infiltrates in the spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. *Arch Neurology* 50:30-36.
- Fattori E, Lazzaro D, Musiani P, Modesti A, Alonzi T, Ciliberto G (1995) IL-6 expression in neurons of transgenic mice causes reactive astrocytosis and increase in ramified microglial cells but no neuronal damage. *Eur J Neurosci* 7:2441-2449.
- Fawcett JP, Bamji SX, Causing CG, Aloyz R, Ase AR, Reader TA, McLean, JH und Miller FD (1998) Functional evidence that BDNF is an anterograde neuronal trophic factor in the CNS. *J Neuroscience* 18:2808-2821.
- Fawcett JW, Asher RA (1999) The glial scar and central nervous system repair. *Brain Res Bull* 49, 377-391.
- Ferri CC, Moore FA, Bisby MA (1998) Effects of facial nerve injury on mouse motoneurons lacking the p75 low-affinity neurotrophin receptor. *J Neurobiology* 34:1-9.
- Fishel CW, O'Bryan BS, Smith DL, Jewell GW (1970) Conversion of ATP by mouse lung preparations and by an extract of *Bordetella pertussis*. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 38:457-465.
- Fishman PS, Savitt JM (1989) Selective Localization by Neuroglia of Immunoglobulin G in Normal Mice. *J Neuropathology and Experimental Neurology* 48:212-220.
- Flugel A, Bradl M (2001) New tools to trace populations of inflammatory cells in the CNS. *Glia*. 36:125-36.
- Frei K, Leist TP, Meager A, Gallo P, Leppert D, Zinkernagel RM, Fontana A (1988) Production of B cell stimulatory factor-2 and interferon-gamma in the central nervous system during viral meningitis and encephalitis. *J Exp Med* 168:449-453.
- Frisen J, Risling M, Fried K (1993) Distribution of axonal relations of macrophages in a neuroma. *Neuroscience* 55:1003-1013.
- Gabbott PLA und Bacon SJ (1996) Localisation of NADPH diaphorase activity and NOS immunoreactivity in astroglia in normal adult rat brain. *Brain Research* 714:135-144.
- Galiano M, Werner A, Mayer U, Kreutzberg GW, Raivich G (1999) Molecular components of the regenerating growth cones. *Ann Anat* 181:101.
- Galiano M, Liu ZL, Kalla R, Bohatschek M, Koppus A, Gschwendtner A, XU SL, Werner A, Kloss CUA, Jones LL, Bluethmann H, Raivich G (2001) Interleukin-6 and cellular response to facial nerve injury. *Eur J Neurosci* 14:327-341.
- Giftochristos N, David S (1988) Laminin and heparan sulfate proteoglycan in the lesioned adult mammalian central nervous system and their possible relationship to axonal sprouting. *J Neurocytol* 17:385-398.
- Gilad GM, Gilad VH (1983) Early rapid and transient increase in ornithine decarboxylase activity within sympathetic neurons after axonal injury. *Exp Neurol* 81:158-66.
- Giulian D, Baker TJ (1986) Characterization of amoeboid microglia isolated from developing mammalian brain. *J Neurosci*. 6:2163-78.
- Giulian D, Ingeman JE (1988) Colony-stimulating factors as promoters of amoeboid microglia. *J Neurosci* 8:4707-17.
- Giulian D, Ingeman JE (1995) Colony stimulating factors as promoters of amoeboid microglia. *J Neurosci* 8:4707-4717.
- Giulian D, Li J, Bartel S, Broker J, Li X, Kirkpatrick JB (1995) Cell surface morphology identifies microglia as a distinct class of mononuclear phagocyte. *J Neurosci* 15:7712-7726.
- Giulian D (1999) Microglia and the immune pathology of Alzheimer disease. *Am J Hum Gen* 65:13-18.

- Gomez-Cambronero J, Colasanto JM, Huang CK, Sha'a RI (1993) Direct stimulation by tyrosine phosphorylation of microtubule-associated protein (MAP) kinase activity by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in human neutrophils. *Biochem J* 291:211-217.
- Graeber MB, Kreutzberg GW (1986) Astrocytes increase in glial fibrillary acidic protein during retrograde changes of facial motor neurons. *J Neurocytology* 15:363-373.
- Graeber MB, Kreutzberg GW (1988a) Delayed astrocyte reaction following facial nerve axotomy. *J Neurocytol* 17:209-220.
- Graeber MB, Streit WJ, Kreutzberg GW (1988b) Axotomy of the rat facial nerve leads to increased CR3 complement receptor expression by activated microglial cells. *J Neurosci Res* 21:18-24.
- Graeber MB, Tetzlaff W, Streit WJ, Kreutzberg GW (1988c) Microglial cells but not astrocytes undergo mitosis following rat facial nerve axotomy. *Neurosci Lett* 85:317-321.
- Graeber MB, Raivich G, Kreutzberg GW (1989) Increase of transferring receptors and iron uptake in the regenerating facial motoneurons. *J Neurosci Res* 23:342-345.
- Graeber MB, Streit WJ (1990) Microglia: immune network in the CNS. *Brain Pathol* 1:2-5.
- Grafstein B, und McQuarrie IG (1978) Role of the nerve cell body in axonal regeneration. In Cotman CW (ed): *Neuronal Plasticity*. New York: Raven Pres, pp. 155-195.
- Graham RC Jr, Karnovsky MJ (1965) The histochemical demonstration of monoamine oxidase activity by coupled peroxidatic oxidation. *J Histochem Cytochem* 13:604-5.
- Griffin JW, George EB, Chaudhry V (1996) Wallerian degeneration in peripheral nerve disease. *Baillieres Clin Neurol* 5:65-75.
- Gschwendtner A, Liu Z, Hucho T, Bohatschek M, Kalla R, Dechant G, Raivich G (2003) Regulation, cellular localization, and function of the p75 neurotrophin receptor (p75NTR) during the regeneration of facial motoneurons. *Mol Cell Neurosci* 24:307-22.
- Guntinas-Lichius O, Neiss WF, Schulte E, Stennert E (1996) Quantitative image analysis of the chromatolysis in rat facial and hypoglossal motoneurons following axotomy with and without reinnervation. *Cell Tissue Res* 286:537-41.
- Haas CA, Donath C, Kreutzberg GW (1993) Differential expression of immediate early genes after transection of the facial nerve. *Neuroscience* 53:91-9.
- Hama T, Kushima M, Miyamoto M, Kubota M, Taga T, Kishimoto T (1990). Interleukin-6 improves the survival of mesencephalic catecholaminergic and septal cholinergic neurons from postnatal, two-week-old rats in culture. *Neuroscience* 40:445-452.
- Harrison PJ, Hultborn H, Jankowska E, Katz R, Storai B, Zytnicki D (1984) Labelling of interneurons by retrograde transsynaptic transport of horseradish peroxidase from motoneurons in rats and cats. *Neurosci Lett* 45:15-19.
- Harrison JK, Jiang Y, Chen S, Xia Y, Maciejewski D, McNamara RK, Streit WJ, Salafranca MN, Adhikari S, Thompson DA, Botti P, Bacon KB, Feng L (1998) Role for neuronally derived fractalkine in mediating interactions between neurons and CX3CR1-expressing microglia. *Proc Natl Acad Sci* 95:10896-10901.
- Herdegen T, Kummer W, Fiallos CE, Leah J, Bravo R (1991) Expression of c-JUN, JUN B and JUN D proteins in rat nervous system following transection of vagus nerve and cervical sympathetic trunk. *Neuroscience* 45:413-22.
- Herdegen T, Claret FX, Kallunki T, Martin-Villalba A, Winter C, Hunter T, Karin M (1998) Lasting N-terminal phosphorylation of c-Jun and activation of c-Jun N-terminal kinases after neuronal injury. *J Neurosci* 18:5124-5135.
- Hermanson M, Olsson T, Westermarck B, Funa K (1995) PDGF and its receptors following facial nerve axotomy in rats: expression in neurons and surrounding glia. *Exp Brain Res* 102:415-22.
- Hirano T, Yasukawa K, Harada H, Taga T, Watanabe Y, Matsuda T, Kashiwamura S, Nakajima K, Koyama K, Iwamatsu A, Tsunasawa S, Sakiyama F, Matsui H, Takahara Y, Taniguchi T, Kishimoto T (1986) Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. *Nature* 324:73-76.
- Hopkins SJ, Rothwell NJ (1995) Cytokines and the nervous system: expression and recognition, *Trends Neurosci.* 18:83-88.
- Hynes RO (1992) Integrins: versatility, modulation and signalling in cell adhesion. *Cell* 69:11-25.
- Hickey WF, Kimura H (1988). Perivascular microglial cells of the CNS are bone marrow-derived and present antigen in vivo. *Science* 239:290-2.
- Hickey WF, Hsu BL, Kimura H (1991) T-lymphocyte entry into the central nervous system. *J Neurosci Res* 28:254-60.
- Hickey WF, Vass K und Lassmann H (1992) Bone marrow-derived elements in the central nervous system: an immunohistochemical and ultrastructural survey of rat chimeras. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 51:246-256.
- Holmin S, Soderlund J, Biberfeld P, Mathiesen T (1998) Intracerebral inflammation after human brain contusion. *Neurosurgery* 42:291-298.
- Horvat A, Schwaiger F, Hager G, Bocker F, Streif R, Knyazev P, Ullrich A, Kreutzberg GW (2001) A novel role for protein tyrosine phosphatase shp1 in controlling glial activation in the normal and injured nervous system. *J Neurosci* 21:865-874.

- Hsu SM, Soban E (1982) Color modification of diaminobenzidine (DAB) precipitation by metallic ions and its application for double immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem* 30:1079-82.
- Hulkower K, Brosnan CF, Equino DA, Cammer W, Kulshrestha S, Guida MP, Rapoport DA, Barman JW (1993) Expression of CSF-1, c-fms and MCP-1 in the central nervous system of rats with experimental allergic encephalomyelitis. *J Immunol* 150:2525-2533.
- Ilschner S, Brandt R (1996) The transition of microglia to a ramified phenotype is associated with the formation of stable acetylated and detyrosinated microtubules. *Glia* 18:129-40.
- Imai Y, Iбата I, Ito D, Ohsawa K, Kohsaka S (1996) A novel gene *iba1* in the major histocompatibility complex class III region encoding an EF hand protein expressed in a monocytic lineage. *Biochem Biophys Res Commun* 224:855-862.
- Irani DN, Griffin DE (1996) Regulation of lymphocyte homing into the brain during viral encephalitis at various stages of infection. *J Immunol* 156:3850-3857.
- Jacobson M (1991). *Developmental neurobiology*. Third ed Plenum Press. New York.
- Jalink K, Moolenaar WH (1992) Thrombin receptor activation causes rapid neural cell rounding and neurite retraction independent of classic second messengers. *J Cell Biol* 118:411-419.
- Janzer RC und Raff MC (1987) Astrocytes induce blood-brain barrier properties in endothelial cells. *Nature* 325:253-7.
- Jenkins R, Hunt SP (1991) Long-term increase in the levels of c-jun mRNA and jun protein-like immunoreactivity in motor and sensory neurons following axon damage. *Neurosci Lett*. 129:107-10.
- Jiao H, Yang W, Berrada K, Tabrizi M, Shultz L, Yi T (1997) Macrophages from motheaten and viable motheaten mutant mice show increased proliferative responses to GM-CSF: detection of potential HCP substrates in GM-CSF signal transduction. *Exp Hematol* 25: 592-600.
- Johnson EM Jr, Andres RY, Bradshaw RA (1978) Characterization of the retrograde transport of nerve growth factor (NGF) using high specific activity [¹²⁵I]NGF. *Brain Res* 150:319-331.
- Jones LL, Kreutzberg GW, Raivich G (1997) Regulation of CD44 in the regenerating mouse facial motor nucleus. *Eur J Neurosci* 9:1854-1863.
- Jones LL, Kreutzberg GW, Raivich G (1998) Transforming growth factor's 1, 2 and 3 inhibit proliferation of ramified microglia on an astrocyte monolayer. *Brain Res* 795:301-306.
- Jones LL, Liu ZQ, Werner A, Shen J, Kreutzberg GW, Raivich G (2000) Regulation of the cell adhesion molecule CD44 after nerve transection and direct trauma to the mouse brain. *J Comp Neurol* 426:468-92.
- Jung S, Aliberti J, Graemmel P, Sunshine MJ, Kreutzberg GW, Sher A, Littman DR (2000) Analysis of fractalkine receptor CX(3)CR1 function by targeted deletion and green fluorescent protein reporter gene insertion. *Mol Cell Biol* 20:4106-4114.
- Kalla R, Bohatschek M, Kloss CUA, Janna Krol, Xenia von Maltzan, Raivich G (2003) Loss of microglial ramification in microglia-astrocyte cocultures: Biological and molecular stimuli. *Glia* 41:50-63.
- Kandel R, Schwartz JH, Jessell TM (2000) *Principles of Neural Science*, McGraw-Hill.
- Kaslow HR, Lim LK, Moss J, Lesikar DD (1987) Structure-activity analysis of the activation of pertussis toxin. *Biochemistry* 26:123-127.
- Katada T, Ui M (1981) Islet-activating protein. A model of receptor mediated regulation of rat islet adenylate cyclase. *J Biol Chem* 256:8310-8317.
- Kater SB, Rehder V (1995) The sensory-motor role of growth cone filopodia. *Curr Opin Neurobiol* 5:68-74.
- Kettenmann H (1999) Physiology of glial cells. *Advances in Neurology* 79:565-571.
- Kharbanda S, Saleem A, Emoto Y, Stone R, Rapp U, Kufe D (1994) Activation of Raf-1 and mitogen-activated protein kinases during monocytic differentiation of human myeloid leukemia cells. *J Biol Chem* 269:872-878.
- Kiefer R, Lindholm D, Kreutzberg GW (1993) Interleukin-6 and transforming growth factor-beta-1 mRNAs are induced in rat facial nucleus following motoneuron axotomy. *Eur J Neurosci* 5:775-781.
- Kiefer R, Streit WJ, Toyka KV, Kreutzberg GW, Hartung H (1995) Transforming growth factor-beta-1: a lesion-associated cytokine of the nervous system. *Int. J. Dev. Neurosci.* 13:331-339.
- Kim E, Enelow RI, Sullivan GW, Mandell GL (1992) Regional and generalized changes in cytosolic free calcium in monocytes during phagocytosis. *Infect Immun* 60:1244-1248.
- Klein MA, Moller JC, Jones LL, Bluethmann H, Kreutzberg GW, Raivich G (1997) Impaired neuroglial activation in interleukin-6 deficient mice. *Glia* 19:227-233.
- Kloss CUA, Kreutzberg GW, Raivich G (1997) Proliferation of ramified microglia on an astrocyte monolayer: characterization of stimulatory and inhibitory cytokines. *J Neurosci Res* 49:248-254.
- Kloss CUA, Werner A, Shen J, Klein MA, Kreutzberg GW, Raivich G (1999) The integrin family of cell adhesion molecules in the injured brain: regulation and cellular localization in the normal and regenerating mouse facial nucleus. *J Comp Neurol* 441:162-178.
- Kloss CUA, Bohatschek M, Kreutzberg GW, Raivich G (2001) Effect of lipopolysaccharide on the morphology and integrin immunoreactivity of ramified microglia in the mouse brain and in cell culture. *Exp Neurol* 168:32-46.
- Kopf M, Baumann H, Freer G, Freudenberg M, Lamers M, Kishimoto T, Zinkernagel R, Bluethmann H, Koehler G (1994) Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6-deficient mice. *Nature* 368:339-342.
- Kreutzberg GW (1963) Changes of coenzyme (TPN) diaphorase and TPN-linked dehydrogenase during axonal reaction of the nerve cell. *Nature* 199:393-394.

- Kreutzberg GW (1966) Autoradiographische Untersuchungen über die Beteiligung von Gliazellen an der axonalen Reaktion im Fazialiskern der Ratte. *Acta Neuropathol* 7:149-161.
- Kreutzberg GW, Tetzlaff W., Toth L (1984) Cytochemical changes of cholinesterases in motor neurons during regeneration. In Brzin M, Barnard EA und Sked D (eds.): *Cholinesterases – fundamental and applied aspects*. Berlin. Walter de Gruyter, pp. 273-288.
- Kreutzberg GW (1990). Peripheral axotomy challenges the central motor neuron and its cellular microenvironment. In: *From Neuron to Action*. Hrsg. Deecke L, Eccles JC und Mountcastle VB. Springer-Verlag, Berlin, S. 407-412.
- Kreutzberg GW (1996). Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci* 19:312-318.
- Kreutzberg GW (1995) Reaction of neuronal cell body to axonal damage. In Waxman SG, Kocsis JD, Stys PK (eds): *The Axon*. New York: Oxford university press, pp. 355-374.
- Kreutzberg GW, Raivich G (1999) Neurobiology of regeneration and degeneration. *The facial Nerve*. pp. 65-77.
- Kurz H, Christ B (1998) Embryonic CNS macrophages and microglia do not stem from circulating, but from extravascular precursors. *Glia* 22:98-102.
- Kreutzberg GW, Blakemore WF, Graeber MB (2000) Cellular pathology of the central nervous system. In Graham DI und Lantos PL (eds): *Greenfields Neuropathology*. New York: Oxford University Press, pp. 85-156.
- Lawson LJ, Perry VH, Gordon S (1992) Turnover of resident microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience* 48:405-415.
- Legos JJ, Whitmore RG, Erhardt JA, Parsons AA, Tuma RF Barone FC (2000) Quantitative changes in interleukin proteins following focal stroke in the rat. *Neurosci Lett* 282:189-192.
- Lentz TL, Burrage TG, Smith AL, Tignor GH (1983) The acetylcholine receptor as a cellular receptor for rabies virus. *Yale J Biol Med* 56:315-322.
- Lindholm D, Heumann R, Meyer M, Thoenen H (1987) Interleukin-1 regulates synthesis of nerve growth factor in non-neuronal cells of rat sciatic nerve. *Nature* 17-23:330:658-9.
- Ling EA, Wong WC (1993) The origin and nature of ramified and amoeboid microglia: a historical review and current concepts. *Glia* 7:9-18.
- Liu L, Tornqvist E, Mattsson P, Eriksson NP, Persson JK, Morgan BP, Aldskogius H, Svensson M (1995) Complement and clustering in the spinal cord dorsal horn and gracile nucleus following sciatic nerve injury in the adult rat. *Neuroscience* 68:167-179.
- Liuzzi FJ und Lasek RJ (1987) Astrocytes block axonal regeneration in mammals by activating the physiological stop pathway. *Science* 237:642-5.
- Loddick SA, Turnbull AV, Rothwell NJ (1998) Cerebral interleukin-6 is neuroprotective during permanent focal cerebral ischemia in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 18:176-179.
- Lotz M, Jirik F, Kabouridis P, Tsoukas C, Hirano T, Kishimoto T, Carson DA (1988) B cell stimulating factor/interleukin 6 is a costimulant for human thymocytes and T lymphocytes. *J Exp Med* 167:1253-1258.
- Lux HD, Schubert P (1975) Some aspects of the electroanatomy of dendrites. *Adv Neurol* 12:29-44.
- Malik ZA, Iyer SS, Kusner DJ (2001) Mycobacterium tuberculosis phagosomes exhibit altered calmodulin-dependent signal transduction: contribution to inhibition of phagosome-lysosome fusion and intracellular survival in human macrophages. *J Immunol* 166:3392-3401.
- Mallat M, Chamak B (1994) Brain macrophages: neurotoxic or neurotrophic effector cells? *J Leuk Biol* 56:416-422.
- Maness PF, Shores CG, Ignelzi M (1990) Localization of the normal cellular src protein to the growth cone of differentiating neurons in brain and retina. *Adv Exp Med Biol*. 265:117-25.
- Marks SC Jr, Lane PW (1976) Osteopetrosis, a new recessive skeletal mutation on chromosome 12 of the mouse. *J Hered* 67:11-18.
- Martini R (1994) Expression and functional roles of neural cell surface molecules and extracellular matrix components during development and regeneration of peripheral nerves. *Journal of Neurocytology* 23:1-28.
- Martini R, Schachner M (1988) Immunoelectron microscopic localization of neural cell adhesion molecules (L1, N-CAM, and myelin-associated glycoprotein) in regenerating adult mouse sciatic nerve. *J Cell Biol* 106:1735-46.
- Matsuo M, Hamasaki Y, Fujiyama F, Miyazaki S (1995) Eicosanoids are produced by microglia, not by astrocytes, in rat glial cell cultures. *Brain Res* 685:201-204.
- McCarthy KD, de Vellis J (1980) Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue. *J Cell Biol* 85:890-902.
- McGeer PL, Kawamata T, Walker DG, Akiyama H, Tooyama I, McGeer EG (1993) Microglia in degenerative neurological disease, *Glia* 7:84-92.
- McGovern FH, Estevez J (1980) The use of cromolyn sodium in the prevention of nerve degeneration in Bell's palsy. *Laryngoscope* 90:1640-5.
- McKeon RJ, Schreiber RC, Rudge JS, Silver J (1991) Reduction of neurite outgrowth in a model of glial scarring following CNS injury is correlated with the expression of inhibitory molecules on reactive astrocytes. *J Neurosci* 11:3398-411.
- McMahon KA, Wilson NJ, Marks DC, Beecroft TL, Whitty GA, Hamilton JA, Csar XF (2001) Colony-stimulating factor-1 (CSF-1) receptor- mediated macrophage differentiation in myeloid cells: a role for tyrosine 559-dependent protein phosphatase 2A (PP2A) activity. *Biochem J* 358:431-436.

- Menet V, Ribotta MGY, Sandillon F, Privat A (2000) GFAP null astrocytes are a favorable substrate for neuronal survival and neurite growth. *Glia* 31:267-272.
- Merril JE, Kono DH, Clayton J, Ando DG, Hinton DR, Hofman FM (1992) Inflammatory leukocytes and cytokines in the peptide-induced disease of experimental allergic encephalomyelitis in SJL and B10.PL mice. *Proc Natl Acad Sci* 89:574-578.
- Merzbacher L (1909) Untersuchungen über die Morphologie und Biologie der Abraumzellen im Zentralnervensystem. Fisher Verlag.
- Mielke K, Brecht S, Lucius R, Herdegen T (1999) FK506 mediates neuroprotection by downregulation of JNK activity and inhibition of microglia activation. *Soc Neurosci Abs* 25:289.
- Milward EA, Papadopoulos R, Fuller SJ, Moir RD, Small D, Beyreuther K, Masters CL (1992) The amyloid protein precursor of Alzheimer's disease is a mediator of the effects of nerve growth factor on neurite outgrowth. *Neuron* 9:129-137.
- Minghetti L, Levi G (1995) Induction of prostanoid biosynthesis by bacterial lipopolysaccharide and isoproterenol in rat microglial cultures. *J Neurochem* 65:2690-2698.
- Möller JC, Klein MA, Haas S, Jones LL, Kreutzberg GW, Raivich G (1996) Regulation of thrombospondin in the regenerating mouse facial motor nucleus. *Glia* 17:121-132.
- Moller T, Hanisch UK, Ransom BR (2000) Thrombin-induced activation of cultured rodent microglia. *J Neurochem* 75:1539-1547.
- Monneret G, Gravel S, Diamond M, Rokach J, Powell WS (2001) Prostaglandin D2 is a potent chemoattractant for human eosinophils that acts via a novel DP receptor. *Blood* 98:1942-1948.
- Moon LDF, Brecknell JE, Franklin RJM, Dunnett SB, Fawcett JW (2000) Robust regeneration of CNS axons through a track depleted of CNS glia. *Exp Neurol* 161:49-66.
- Mori I, Hossain MJ, Takeda K, Okamura H, Imai Y, Kohsaka S, Kimura Y (2001) Impaired microglial activation in the brain of IL-18-gene-disrupted mice after neurovirulent influenza A virus infection. *Virology* 287:163-70.
- Müller HW and Stoll G (1998) Nerve injury and regeneration: basic insights and therapeutic interventions. *Curr Opin Neurol* 11:557-62.
- Murphy S, Pearce B (1987) Functional receptors for neurotransmitters on astroglial cells. *Neuroscience* 22:381-94.
- Murphy PG, Borthwick LS, Johnston RS, Kuchel G, Richardson PM (1999a) Nature of the retrograde signal from injured nerves that induces interleukin-6 mRNA in neurons. *J Neurosci* 19:3791-3800.
- Murphy PG, Ramer MS, Borthwick L, Gaudie J, Richardson PM, Bisby MA (1999b) Endogenous interleukin-6 contributes to hypersensitivity to cutaneous stimuli and changes in neuropeptides associated with chronic nerve constriction in mice. *Eur J Neurosci* 11:2243-2253.
- Nakayama M, Miyake T, Gahara Y, Ohara O und Kitamura T (1995) A novel RING-H2 motif protein downregulated by axotomy: its characteristic localization at the postsynaptic density of axosomatic synapse. *Journal of Neuroscience* 15:5238-5248.
- Narumiya S, Sugimoto Y, Ushikubi F (1999) Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiol Rev* 79:1193-1226.
- Neumann H, Wekerle H (1998) Neuronal control of the immune response in the central nervous system: linking brain immunity to neurodegeneration. *J Neuropathol Exp Neurol* 57:1-9.
- Nissl F (1894) Über eine neue Untersuchungsmethode des Centralorgans speziell zur Feststellung der Lokalisation der Nervenzellen. *Zentralblatt für Nervenheilkunde und Psychiatrie* 17:337-344.
- Norenberg MD (1994) Astrocyte responses to CNS injury. *J Neuropathol Exp Neurol* 53:213-20.
- Norenberg W, Cordes A, Blohbaum G, Fröhlich R, Illes P (1997) Coexistence of purino- and pyrimidinoceptors on activated rat microglial cells. *Br J Pharmacol* 121:1087-1098.
- Ohsawa K, Imai Y, Kanazawa H, Sasaki Y, Kohsaka S (2000) Involvement of Iba1 in membrane ruffling and phagocytosis of macrophages/microglia. *J Cell Sci* 113:3073-3084.
- Pahan K, Sheikh FG, Namboodiri AM, Singh I (1998) Inhibitors of protein phosphatase 1 and 2A differentially regulate the expression of inducible nitric-oxide synthase in rat astrocytes and macrophages. *J Biol Chem* 273:12219-26.
- Palacios G, Mengod G, Sarasa M, Baudier J und Palacios JM (1994) De novo synthesis of GAP-43: in situ hybridization histochemistry and light and electron microscopy immunocytochemical studies in regenerating motor neurons of cranial nerve nuclei in the rat brain. *Brain Research Molecular Brain Research* 24:107-117.
- Paschen W (1992) Polyamine metabolism in different pathological states of the brain. *Mol Chem Neuropathol* 16:241-71.
- Pearson VL, Rothwell NJ, Toulmond S (1999) Excitotoxic brain damage in the rat induces interleukin-1beta protein in microglia and astrocytes: correlation with the progression of cell death. *Glia* 25:311-323.
- Pekny M, Johansson CB, Eliasson C, Stakeberg J, Wallen A, Perlmann T, Lendahl U, Betsholtz C, Berthold CH, Frisen J (1999) Abnormal reaction to central nervous system injury in mice lacking glial fibrillary acidic protein and vimentin. *J Cell Biol* 145:503-514.
- Penkowa M, Moos T, Carrasco J, Hadberg H, Molinero A, Bluethmann H, Hidalgo J (1999) Strongly compromised inflammatory response to brain injury in interleukin-6-deficient mice. *Glia* 25:343-357.

- Peress NS, Fleit HB, Perillo E, Kuljis R, Pezzullo C (1993) Identification of Fc gamma RI, II and III on normal human brain ramified microglia and on microglia in senile plaques in Alzheimer's disease. *J Neuroimmunol* 48:71-9.
- Perry VH, Hume DA, Gordon S (1985) Immunohistochemical localization of macrophages and microglia in the adult and developing mouse brain. *Neuroscience* 15:313-326.
- Perry VH und Gordon S (1988) Macrophages and microglia in the nervous system. *Trends in Neurosciences* 11:273-277.
- Perry VH, Bell MD, Brown HC und Matyszak MK (1995) Inflammation in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol* 5:636-41.
- Peters JH, Borner T, Ruppert J (1990) Accessory phenotype and function of macrophages induced by cyclic adenosine monophosphate. *Int Immunol* 2:1195-1202.
- Powell HC, Myers RR, Costello ML (1980) Increased endoneural fluid pressure following injection of histamine and compound 48/80 into rat peripheral nerves. *Lab Invest* 43:564-72.
- Prehn JH (1996) Marked diversity in the action of growth factors on N-methyl-D-aspartate-induced neuronal degeneration. *Eur J Pharmacol* 306:81-88.
- Pryce G, Male D, Campbell I, Greenwood J (1997) Factors controlling T-cell migration across rat cerebral endothelium in vitro. *J Neuroimmunol* 75:84-94.
- Pryzwansky KB, Kidao S, Merricks EP (1998) Compartmentalization of PDE-4 and cAMP-dependent protein kinase in neutrophils and macrophages during phagocytosis. *Cell Biochem Biophys* 28:251-275.
- Raine CS (1976) On the development of CNS lesions in natural canine distemper encephalomyelitis. *J Neurol Sci* 30:13-28.
- Raivich G, Gehrman J, Kreutzberg GW (1991) Increase of macrophage colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony stimulating factor receptors in the regenerating rat facial nucleus. *J Neurosci Res* 30:682-686.
- Raivich G, Domoulin FL, Breit WJ, Kreutzberg GW (1992) Calcitonin gene-related peptide in the regenerating rat sciatic nerve. *Restorative Neurology and Neuroscience* 4: 107-115.
- Raivich G, Kreutzberg GW (1993) Peripheral nerve regeneration: role of growth factors and their receptors. *Int J Dev Neurosci* 11:311-24.
- Raivich G, Gehrman J, Graeber MB, Kreutzberg GW (1993) Quantitative immunohistochemistry in the rat facial nucleus with iodine-125 iodinated secondary antibodies and in-situ autoradiography non-linear binding characteristics of primary monoclonal and polyclonal antibodies. *J Histochem Cytochem* 41:579-592.
- Raivich G, Moreno-Flores MT, Möller JC, Kreutzberg GW (1994) Inhibition of posttraumatic microglial proliferation in a genetic model of macrophage colony-stimulating factor deficiency in the mouse. *Eur J Neurosci* 6:1615-1618.
- Raivich G, Bluethmann H und Kreutzberg GW (1996) Signaling molecules and neuroglial activation in the injured central nervous system. *Keio Journal of Medicine* 45:239-247.
- Raivich G, Reddington M, Haas CA und Kreutzberg GW (1995) Peptides in motoneurons. *Progress in Brain Research* 104:3-20.
- Raivich G, Jones LL, Kloss CUA, Werner A, Neuniann H, Kreutzberg GW (1998a) Immune surveillance in the injured nervous system: T-lymphocytes invade the axotomized mouse facial motor nucleus and aggregate around sites of neuronal degeneration. *J Neurosci* 18:5804-5816.
- Raivich G, Haas S, Werner S, Klein MA, Kloss CUA, Kreutzberg GW (1998b) Regulation of MCSF receptors on microglia in the normal and injured central nervous system: A quantitative immunofluorescence study using confocal laser microscopy. *J Comp Neurol* 395:342-358.
- Raivich G, Bohatschek M, Kloss CUA, Werner A, Jones LL, Kreutzberg GW (1999a) Neuroglial activation repertoire in the injured brain: graded response, molecular mechanisms and cues to physiological function. *Brain Res Rev* 30:77-105.
- Raivich G, Galiano M, Gschwendtner A, Jones LL, Kloss CUA, Werner A, Pfeffer K, Bluethmann H, Kreutzberg GW (1999b) Lymphocyte infiltration in the injured brain: role of proinflammatory cytokines IL1, IL6 and TNF α . *Soc Neurosci Abstr* 25:1536.
- Raivich G, Liu ZQ, Kloss CU, Labow M, Bluethmann H, Bohatschek M (2002) 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* 178:186-93.
- Murphy PG, Borthwick LS, Johnston RS, Kuchel G, Richardson PM (1999) Nature of the retrograde signal from injured nerves that induces interleukin-6 mRNA in neurons. *J Neurosci* 19:3791-800.
- Ridet JL, Malhotra SK, Privat A, Gage FH (1997) Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function, *Trends Neurosci* 20:570-577.
- Robey E, Allison JP (1995) T-cell activation: integration of signals from the antigen receptor and costimulatory molecules. *Immunol Today* 16:306-310.
- Rossi AG, McCutcheon JC, Roy N, Chilvers ER, Haslett C, Dransfeld I (1998) Regulation of macrophage phagocytosis of apoptotic cells by cAMP. *J Immunol* 160:3562-3568.
- Rostad SW, Olson K, McDougall J, Shaw CM, Alvord EC Jr (1989) Transsynaptic spread of varicella zoster virus through the visual system: a mechanism of viral dissemination in the central nervous system. *Hum Pathol* 20:174-179.

- Roth P, Stanley E (1992) The biology of CSF-1 and its receptor. *Curr Top Microbiol Immunol* 181:141-167.
- Saika T, Kiyama H, Tohyama M, Matsunaga T (1993) GAP-43 mRNA expression in facial motoneurons during regeneration: in situ hybridization histochemistry study using an alkaline phosphatase labelled probe. *Acta Oto-Laryngologica - Supplement* 501:80-84.
- Sasaki Y, Ohsawa K, Kanazawa H, Kohsaka S, Imai Y (2001) Iba1 is an actin-cross-linking protein in macrophages/microglia. *Biochem Biophys Res Comm* 286:292-297.
- Sawada M, Suzumura A, Yamamoto H, Marunouchi T (1990) Activation and proliferation of the isolated microglia by colony stimulating factor-1 and possible involvement of protein kinase C. *Brain Res* 509:119-124.
- Schaeffer LM, Weiss AA (2001) Pertussis toxin and lipopolysaccharide influence phagocytosis of *Bordetella pertussis* by human monocytes. *Infect Immun* 69:7635-7641.
- Schilling T, Nitsch R, Heinemann U, Haas D, Eder C (2001) Astrocyte released cytokines induce ramification and outward K-channel expression in microglia via distinct signalling pathways. *Eur J Neurosci* 14:463-473.
- Schmidtmayer J, Jacobsen C, Miksch G und Sievers J (1994) Blood monocytes and spleen macrophages differentiate into microglia-like cells on monolayers of astrocytes: membrane currents. *Glia* 12:259-267.
- Schluter D, Bertsch D, Frei K, Hubers SB, Wiestler OD, Hof H, Fontana A, Deckert-Schluter M (1998) Interferon-gamma antagonizes transforming growth factor-beta2-mediated immunosuppression in murine *Toxoplasma* encephalitis. *J Neuroimmunol* 81:38-48.
- Schipke CG, Boucsein C, Ohlemeyer C, Kirchhoff F, Kettenmann H (2002) Astrocyte Ca²⁺ waves trigger responses in microglial cells in brain slices. *FASEB J* 16:255-257.
- Schwab M, Thoenen H (1977) Selective trans-synaptic migration of tetanus toxin after retrograde axonal transport in peripheral sympathetic nerves: a comparison with nerve growth factor. *Brain Res* 122:459-474.
- Schwab ME und Caroni P (1988) Oligodendrocytes and CNS myelin are nonpermissive substrates for neurite growth and fibroblast spreading in vitro. *J Neurosci* 8:2381-93.
- Schwaiger FW, Fluegel A, Hager G, Horvat A, Spitzer C, Graeber MB, Kreutzberg GW (1999) Neuronal expression of MCP-1 following a remote lesion of the CNS. *Soc Neurosci Abstr* 25:1275.
- Schwaiger FW, Schmitt GH, Horvat A, Hager G, Streif R, Spitzer C, Gamal S, Breuer S, Brook GA, Nacimiento W, Kreutzberg GW (2000) Peripheral but not central axotomy induces changes in Janus kinases (JAK) and signal transducers and activators of transcription (STAT). *Eur J Neurosci* 12:1165-1176.
- Seiler N (2000) Polyamines. In Latha A (ed): *Handbook of Neurochemistry*. New York: Plenum Press, pp.223-255.
- Seilhean D, Kobayashi K, He Y, Uchihara T, Rosenblum O, Katlama C, Bricaire F, Duyckaerts C, Hauw JJ (1997) Tumor necrosis factor-alpha, microglia and astrocytes in AIDS dementia complex. *Acta Neuropathol* 93 508-517.
- Sendtner M, Gotz R, Holtmann B, Thoenen H (1997) Endogenous ciliary neurotrophic factor is a lesion factor for axotomized motoneurons in adult mice. *J Neurosci* 17:6999-7006.
- Sheng JG, Mrak RE, Griffin WS (1998) Enlarged and phagocytic, but not primed, interleukin-1 alpha-immunoreactive microglia increase with age in normal human brain. *Acta Neuropathol* 95:229-234.
- Sievers J, Schmidtmayer J und Parwaresch R (1994) Blood monocytes and spleen macrophages differentiate into microglia-like cells when cultured on astrocytes. *Annals of Anatomy* 176:45-51.
- Sinatra RS und Ford DH (1979) The effects of acute and chronic morphine treatment on the process off facial nerve regeneration. *Brain Research* 175:315-325.
- Siren AL (1982) Central cardiovascular and thermal effects of prostaglandin D2 in rats. *Prostaglandins Leukot Med* 8:349-359.
- Skene JH, Jacobson RD, Snipes GJ, McGuire CB, Norden JJ, Freeman JA (1986) A protein induced during nerve growth (GAP-43) is a major component of growth-cone membranes. *Science* 233:783-6.
- Skene JHP (1989) Axonal growth-associated proteins. *Annual Review of Neuroscience* 12:127-156.
- Smith ME, van der Maesen K und Somera FP (1998) Macrophage and microglial responses to cytokines in vitro: phagocytic activity, proteolytic enzyme release, and free radical production. *Journal of Neuroscience Research* 54:68-78.
- Sontag E, Sontag JM, Garcia A (1997) Protein phosphatase 2A is a critical regulator of protein kinase C zeta signaling targeted by SV40 small t to promote cell growth and NF-kappaB activation. *EMBO J* 16:5662-5671.
- Springer TA (1994) Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 76:301-14.
- Sternberger LA (1986) *Immunocytochemistry*. New York: John Wiley & Sons.
- St. George-Hyslop PH (1999) Molecular genetics of Alzheimer disease. *Semin Neurol* 19:371-383.
- Stoll G, Griffin JW, Li CY, Trapp BD (1989) Wallerian degeneration in the peripheral nervous system: participation of both Schwann cells and macrophages in myelin degradation. *J Neurocytol* 18:671-83.
- Strack AM, Loewy AD (1990) Pseudorabies virus: a highly specific transneuronal cell body marker in the sympathetic nervous system. *J Neurosci* 10:2139-2147.
- Streit WJ, Kreutzberg GW (1987) Lectin binding by resting and reactive microglia. *J Neurocytol* 16:249-260.
- Streit WJ, Graeber MB, Kreutzberg GW (1988a) Functional plasticity of microglia: a review. *Glia* 1: 301-307.
- Streit WJ, Kreutzberg GW (1988b) Response of endogenous glial cells to motor neuron degeneration induced by toxic ricin. *J Comp Neurol* 268:248-263.

- Streit WJ, Dumoulin FL, Raivich G und Kreutzberg GW (1989) Calcitonin gene-related peptide increases in rat facial motoneurons after peripheral nerve transection. *Neuroscience Letters* 101:143-148.
- Streit WJ, Semple-Rowland SL, Hurley SD, Miller RC, Popovich PG, Stokes BT (1998) Cytokine mRNA profiles in contused spinal cord and axotomized facial nucleus suggest a beneficial role for inflammation and gliosis. *Exp Neurol* 152:74-87.
- Streit WJ, Hurley SD, McGraw TS, Semple-Rowland SL (2000a) Comparative evaluation of cytokine profiles and reactive gliosis supports a critical role for interleukin-6 in neuron-glia signaling during regeneration. *J Neurosci Res* 61:10-20.
- Streit WJ (2000b) Microglial response to brain injury: a brief synopsis. *Toxicol Pathol* 28:28-30.
- Streit WJ (2002) Microglia and the response to brain injury. *Ernst Schering Res Found Workshop* 39:11-24.
- Stromhaug PE, Berg TO, Gjoen T, Seglen PO (1997) Differences between fluid-phase endocytosis (pinocytosis) and receptor-mediated endocytosis in isolated rat hepatocytes. *Eur J Cell Biol* 73:28-39.
- Sudo S, Tanaka J, Toku K, Desaki J, Matsuda S, Arai T, Sakanaka M, Maeda N (1998) Neurons induce the activation of microglial cells in vitro. *Exp Neurol* 154:499-510.
- Sugiura S, Lahav R, Han J, Kou SY, Banner LR, de Pablo F, Patterson PH (2000) 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* 12:457-466.
- Suzuki S, Tanaka K, Nogawa S, Nagata E, Ito D, Dembo T, Fukuuchi Y (1999) Temporal profile and cellular localization of interleukin-6 protein after focal cerebral ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 19: 1256-1262.
- Suzumura A, Marunouchi T, Yamamoto H (1991) Morphological transformation of microglia in vitro. *Brain Res* 545:301-306.
- Suzumura A, Marunouchi T, Yamamoto H (1991) Morphological transformation of microglia in vitro. *Brain Res* 545:301-6.
- Svensson M, Aldskogius H (1993a) Regeneration of hypoglossal nerve axons following blockade of the axotomy-induced microglial cell reaction in the rat. *Eur J Neurosci* 5:85-94.
- Svensson M, Aldskogius H (1993b) Synaptic density of axotomized hypoglossal motoneurons following pharmacological blockade of the microglial cell proliferation. *Exp Neurol* 120:123-131.
- Tanaka J, Maeda N (1996) Microglial ramification requires nondiffusible factors derived from astrocytes. *Exp Neurol* 137:367-375.
- Tanaka J, Toku K, Matsuda S, Sudo S, Fujita H, Sakanaka M, Maeda N (1998) Induction of resting microglia in culture medium devoid of glycine and serine. *Glia* 24:198-215.
- Tao-Cheng JH, Nagy Z, Brightman MW (1987) Tight junctions of brain endothelium in vitro are enhanced by astroglia. *J Neurosci* 7:3293-3299.
- Tetzlaff W, Bisby MA und Kreutzberg GW (1988) Changes in cytoskeletal proteins in the rat facial nucleus following axotomy. *Journal of Neuroscience* 8:3181-3189.
- Tetzlaff W, Kreutzberg GW (1985) Ornithine decarboxylase in motoneurons during regeneration. *Exp Neurol* 89:679-88.
- Thanos S, Mey J, Wild M (1993) Treatment of the adult retina with microglia-suppressing factors retards axotomy-induced neuronal degradation and enhances axonal regeneration in vivo and in vitro. *J Neurosci* 13:455-466.
- Thery C, Hetier E, Evrard C, Mallat M (1990) Expression of macrophage colony-stimulating factor gene in the mouse brain during development. *J Neurosci Res* 26:129-133.
- Thomas CA, Weinberger OK, Ziegler BL, Greenberg S, Schieren I, Silverstein SC, El Khoury J (1997) Human immunodeficiency virus-1 impairs Fc receptor-mediated phagocytosis via a cyclic adenosine monophosphate-dependent mechanism. *Blood* 90:3760-3765.
- Torvik A, Skjörten F (1971) Electron microscopic observations on nerve cell regeneration and degeneration after axon lesions. II. Changes in the glial cells. *Acta Neuropathol* 17:265-282.
- Troost D, van den Oord JJ, de Jong JM, Swaab DF (1989) Lymphocytic infiltration in the spinal cord of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Clin Neuropathol* 8:289-94.
- Tsacopoulos M und Magistretti PJ (1996) Metabolic coupling between glia and neurons. *J Neurosci* 16:877-85.
- Tsai SC, Adamik R, Kanaho Y, Halpern JL, Moss J (1987) Immunological and biochemical differentiation of guanyl nucleotide binding proteins: interaction of Go alpha with rhodopsin, anti-Go alpha polyclonal antibodies, and a monoclonal antibody against transducin alpha subunit and Gi alpha. *Biochemistry* 26:4728-4733.
- Umeda S, Beamer WG, Takagi K, Naito M, Hayashi S, Yonemitsu H, Yi T, Shultz LD (1999) Deficiency of SHP-1 protein-tyrosine phosphatase activity results in heightened osteoclast function and decreased bone density. *Am J Pathol* 155:223-233.
- Uno H, Matsuyama T, Akita H, Nishimura H, Sugita M (1997) Induction of tumor necrosis factor-alpha in the mouse hippocampus following transient forebrain ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 17:491-499.
- Unsicker K, Meier C, Kriegstein K, Sartor BM, Flanders KC (1996) Expression, localization and function of transforming growth factor beta s in embryonic chick spinal cord, hindbrain and dorsal root ganglia. *J. Neurobiol* 29:262-276.

- Ure DR, Campenot RB (1994) Leukemia inhibitory factor and nerve growth factor are retrogradely transported and processed by cultured rat sympathetic neurons. *Dev Biol* 162:339-347.
- van der Laan LJ, Ruuls SR, Weber KS, Lodder IJ, Dopp EA, Dijkstra CD (1996) Macrophage phagocytosis of myelin in vitro determined by flow cytometry: phagocytosis is mediated by CR3 and induces production of tumor necrosis factor-alpha and nitric oxide. *J Neuroimmunol* 70:145-152.
- van Leuven F (2000) Single and multiple transgenic mice as models for Alzheimer's disease. *Progr Neurobiol* 61:305-312.
- Vogel SN, Weedon LL, Oppenheim JJ, Rosenstreich DL (1981) Defective Fc-mediated phagocytosis in C3H/HeJ macrophages: II, correction by cAMP agonists. *J Immunol* 126:441-445.
- Vougioukas VI, Roeske S, Michel U, Bruck W (1998) Wallerian degeneration in ICAM-1-deficient mice. *J Pathol* 152:241-9.
- Wagner R, Myers RR (1996) Schwann cells produce tumor necrosis factor alpha: expression in injured and non-injured nerves. *Neuroscience* 73:625-9.
- Walz W, Ilschner S, Ohlemeyer C, Banati R, Kettenmann H (1993) Extracellular ATP activates a calcium conductance and a K⁺ conductance in cultured microglial cells from mouse brain. *J Neurosci* 13:4403-4411.
- Wekerle H, Linington C, Lassmann H, Meyermann R (1986) Cellular immune reactivity within the CNS. *Trends Neurosci* 9:271-277.
- Werner A, Kloss CUA, Walter J, Kreutzberg GW, Raivich G (1998) Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM1) in the regenerating mouse facial motor nucleus. *J Neurocytol* 27:219-232.
- Werner A, Mayer U, Jones LL; Kreutzberg GW, Raivich G (2000) Impaired axonal regeneration in α 7-integrin deficient mice. *J Neurosci* 20:1822-1830.
- Westphal RS, Anderson KA, Means AR, Wadzinski BE (1998) A signalling complex of Ca²⁺-calmodulin-dependent protein kinase IV and protein phosphatase 2A. *Science* 280:1258-1261.
- Wiktor-Jedrzejczak W, Bartocci A, Ferrante AW, Ahmed-Ansari A, Sell KW, Pollard JW, Stanley ER (1990) Total absence of colony-stimulating factor 1 in the macrophage-deficient osteopetrotic mouse. *Proc Natl Acad Sci* 87:4828-4832.
- Wilms H, Hartmann D, Sievers (1997) Ramification of microglia, monocytes and macrophages in vitro: influences of various epithelial and mesenchymal cells and their conditioned media. *Cell Tissue Res* 287:447-58.
- Wilms H, Wollmer MA, Sievers J (1999) In vitro-staining specificity of the antibody 5-D-4 for microglia but not for monocytes and macrophages indicates that microglia are a unique subgroup of the myelomonocytic lineage. *J Neuroimmunol* 98:89-95.
- Wollmer MA, Lucius R, Wilms H, Held-Feindt J, Sievers J, Mentlein R (2001) ATP and adenosine induce ramification of microglia in vitro. *J Neuroimmunol* 115:19-27.
- Yagi R, Tanaka S, Koike T (2000) Thapsigargin induces microglial transformation from amoeboid to ramified type in vitro. *Glia* 28:49-52.
- Yoshida H, Hayashi SI, Kunisasa Z, Ogawa M, Nishikawa S, Okamura H, Sudo T, Shultz LD, Nishikawa SI (1990) The murine mutation osteopetrosis is in the coding region of the macrophages colony stimulating factor gene. *Nature* 345:442-444.
- Yu WH (1994) Nitric oxide synthase in motor neurons after axotomy. *J Histochem Cytochem* 42:451-7.
- Yu WH (1989) Administration of testosterone attenuates neuronal loss following axotomy in the brain-stem motor nuclei of female rats. *J Neurosci* 9:3908-14.
- Zakany R, Szucs K, Bako E, Felszeghy S, Czifra G, Biro T, Modis L, Gergely P (2002) Protein phosphatase 2A is involved in the regulation of protein kinase A signaling pathway during in vitro chondrogenesis. *Exp Cell Res* 275:1-8.
- Zhang B, Yang L, Konishi Y, Maeda N, Sakanaka M, Tanaka J (2002) Suppressive effects of phosphodiesterase type IV inhibitors on rat cultured microglial cells: comparison with other types of cAMP elevating agents. *Neuropharmacology* 42:262-269.
- Zhong J, Dietzel ID, Wahle P, Kopf M, Heumann R (1999) Sensory impairments and delayed regeneration of sensory axons in interleukin-6 deficient mice. *J Neurosci* 19:4305-4313.

7. Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ABC	Vectorstain [®] Avidin- Biotin-Komplex Kit
ACM	Astrozyten-konditioniertes Medium
AF	Autofluoreszenz
BBB	Blut-Hirn-Schranke (englisch "Blood-brain barrier")
BDNF	Gehirnnervenwachstumsfaktor (englisch "brain derived neurotrophic factor")
bidest.	bidestilliert
BSA	Rinderalbumin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CD	Differenzierungsmerkmal (englisch "cluster of differentiation")
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CGRP	Kalzitonin Gen-verwandtes Protein (englisch "calcitonin gene related peptide")
CR3	Komplement-Rezeptor 3
Cy3	Indokarbocyanin 3
DAB	3,3'-Diaminobenzidin (3,3',4,4'-Tetraaminobiphenyl)
DIFF-RISC	Differentialer relativer Farbe-Koeffizient
DMEM	Dulbeccos Modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamin-tetra-Azid
EP	Endogene Peroxidase
EM	Elektronenmikroskopie
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxidsynthase
EZM	extrazelluläre Matrix
FA	Formaldehyd
FCγ	Fc-Teil der IgG
FCγR	Rezeptor für den Fc-Teil der IgG
FCS	Fötale Kälberserum
FI	Färbeintensität
FITC	Fluorescein-5-Isothiocyanat
g	Gramm
g	Konstante der Erdbeschleunigung (9,81 kg x m ² :s ²)
GFAP	sauerer Gliafaserprotein (englisch "glial fibrillary acidic protein")
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonestimulierender Faktor

gp	Glykoprotein
HRP	Meerrettichperoxidase (englisch "horse radish peroxidase")
IBA	ionisiertes Ca-bindendes Adaptermolekül
ICAM	Interzelluläres Adhäsionsmolekül (englisch "intercellular adhesion molecule")
IFNγ	Interferon gamma
Ig	Immunglobuline
IGF	engl. „ insulin-like growth factor“
IgG	Immunglobulin G
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
in vitro	in Kultur
in vivo	im Gewebe
IR	Immunreaktivität
kDa	kilo-Dalton
l	Liter
LDL	Lipoproteine geringer Dichte (englisch "low density lipoproteins")
LIF	Leukämie inhibierender Faktor
LPS	Lipopolysaccharide
M	Musculus (lateinisch "Muskel")
MB	Mega-byte (Millionen Bytes)
MCSF	Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
MCSFR	Rezeptor für MCSF
MHC	Haupthistokompatibilitätsantigen (englisch "major histocompatibility complex")
μg	Mikrogramm (= 10^{-6} Gramm)
μl	Mikroliter (= 10^{-6} Liter)
ml	Milliliter (= 10^{-3} Liter)
MPI	Max-Planck-Institut
N	Nervus (lateinisch "Nerv")
NADPH	reduziertes Nikotinsäureamid-adenin-dinucleotid-phosphat
Ncl.	Nucleus (lateinisch "Kern")
NGF	Nervenwachstumsfaktor
NO	Stickstoffmonoxid
OLV	optischer Lichtwert (englisch "optical luminosity value")
p	Fehler erster Art

PB	Phosphat-Puffer
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PDGF	von Thrombozyten gebildeter Wachstumsfaktor
PF	Perfusionsfixativ
PFA	Paraformaldehyd
Pixel	Bildpunkt
PNS	peripheres Nervensystem
RGB	Rot-Grün-Blau (englisch "Red Green Blue")
RISC	relativer Färbe-Koeffizient (englisch "relative intensity of staining factor")
ROI	Auswertungsgebiet (englisch "region of interest")
rpm	Umdrehungen pro Minute (englisch "rounds per minute")
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung (englisch "standard deviation")
TGF	Tumorstromungs-faktor (englisch "tumor growth factor ")
TIFF	englisch "tagged image file format"
TNF	Tumor-Nekrosefaktor
TNFR	Tumor-Nekrosefaktor-Rezeptor
TSP	Thrombospondin
TNF	Tumornekrosefaktor
V	Volt
VCAM	vaskuläres Zelladhäsionsmolekül (englisch "vascular cell adhesion molecule")
VIP	vasoaktives intestinales Polypeptid
WLD	Wallersche Degeneration
ZNS	Zentrales Nervensystem

8. Danksagung

Die Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Neurobiologie, in der Abteilung für Neuromorphologie, Am Klopferspitz 18a, in 82152 Martinsried durchgeführt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Kreutzberg für die großzügige Förderung, die motivierende Unterstützung und das entgegengebrachte Vertrauen.

Herrn Privat-Dozent Dr. Gennadij Raivich möchte ich meine tiefe Dankbarkeit für die Betreuung dieser Arbeit aussprechen. Mit seinem herausragenden fachlichen Wissen, den wertvollen Hinweisen und Anregungen trug er entscheidend zur Durchführung dieser Arbeit bei. Herzlichen Dank für das unermüdliche Engagement.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Andrea Koppius für die geduldige und zuverlässige Hilfe bei der Tierzucht bedanken. Ich danke insbesondere Helma Tyrlas für die umfangreiche Unterstützung bei der Betreuung der Zellkultur, Dietmute Büringer für die Hilfe bei der Elektronenmikroskopie und Karin Brückner, Dr. James-Paul Chalcraft und Sabine Richter für die Unterstützung bei den Fotoarbeiten.

Allen Mitarbeitern der Abteilung bin ich für Ihre unermüdliche Hilfsbereitschaft und die ausgesprochen angenehme und oft heitere Arbeitsatmosphäre zu Dank verpflichtet.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern für ihre unermüdliche Unterstützung, sowie meiner Frau Janna Krol für ihre stete Inspiration auf diesem Weg.

Schließlich möchte ich der vielen Mäuse aus der Tierzucht gedenken, ohne deren physischen Einsatz ihres Lebens diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

9. Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN:

Name	Roger Kalla
Geburtstag	19.01.1974
Geburtsort	München
Staatsangehörigkeit	Deutsch
Familienstand	verheiratet mit Janna Krol

SCHULBILDUNG:

1980 - 1983	Karl-Lederer-Grundschule Geretsried
1983 - 1984	Volksschule München-Grundschule
1984 - 1985	Maria-Theresia-Gymnasium München
1985 - 1993	Geretsried-Gymnasium, Abitur

STUDIUM:

1995	Halbjähriges Sprachstudium an der philologischen Fakultät der Lomonossov Universität in Moskau
1995 - 2001	Studium der Humanmedizin an der LMU- München
04/1998	Famulatur am Inst. für Pathologie im KH Mü-Harlaching
10/1999	Famulatur/ Gynäkologie an der MMA Setchenova/ Moskau
03/2000	Famulatur/ Neurologie MMA Setchenova/ Moskau
03/2001	2. Staatsexamen (1.66)
04/01 - 04/02	Praktisches Jahr am Klinikum Großhadern
06/02	3. Staatsexamen (1.83)
05/99 - 05/01	Doktorand am MPI für Neurobiologie/Abt. Neuromorphologie, Prof. GW Kreutzberg, Arbeitsgruppe PD Dr. G. Raivich

AUSLANDSAUFENTHALTE:

1993 - 1995	Trainingsaufenthalt bei Dynamo Moskau, Sprachstudium an der Lomonossov-Universität in Moskau
10/98 - 03/99	Aufenthalt im Zen-Kloster Eigen-Ji, Japan

SPORTLICHER WERDEGANG:

1985/86/88/92	Bayrischer Meister im Kunstturnen
1987	Deutscher Vizemeister im Kunstturnen
1988	Deutscher Jugendmeister im Kunstturnen
1991 - 1992	Mitglied der Jugendnationalmannschaft
1992	Dritter der Deutschen Meisterschaften
1993 - 1995	Trainingsaufenthalt bei Dynamo Moskau/ Start in der 1.Liga für den FC Bayern München

BERUFSERFAHRUNG:

07/2002 -	Arzt im Praktikum an der LMU München, Neurologische Klinik im Klinikum Großhadern (Prof. Dr. med. Dr. h. c. Thomas Brandt FRCP), Arbeitsgruppe: Prof. Dr. M. Strupp
-----------	---

10. Veröffentlichungen

Aus der vorgelegten Arbeit sind folgende Publikationen hervorgegangen:

Kalla R, Liu ZQ, Xu SL, Koppius A, Imai Y, Kloss CUA, Kohsaka S, Gschwendtner A, Möller JC, Werner A, Raivich G (2001) Microglia and the early phase of immune surveillance in the injured axotomized facial motor nucleus. *J Comp Neurology* 436:182-201

Kalla R, Bohatschek M, Kloss CUA, Janna Krol, Xenia von Maltzan, Raivich G (2003) Loss of microglial ramification in microglia-astrozyte cocultures: Biological and molecular stimuli. *Glia* 41:50-63

Bohatschek M, Kloss CUA, Kalla R, Raivich G (2001) Ramified microglia transform into amoeboid phagozytes following addition of brain cell membranes to microglia-astrozyte cocultures. *J Neurosci Res.* 64:508-22

Galliano M, Liu ZQ, Kalla R, Bohatschek M, Koppius A, Gschwendtner A, Wener A, Kloss CUA, Jones LL, Bluethmann H, Raivich G (2001) IL 6 and cellular response to facial nerve injury: effects on Lymphozyte recruitment, early microglial activation and axonal outgrowth in IL6-deficient mice. *Eur J Neurosci.* 14:327-41