

Aus der Abteilung Neuropathologie
(Prof. Dr. med. W. Brück)
im Zentrum Pathologie
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Die Rolle von Interleukin-6 beim
Myelinabbau durch Makrophagen**

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
für Zahnheilkunde
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Sören-Wibo Hilbert
aus
Göttingen

Göttingen 2007

Dekan : Prof. Dr. med. C. Frömmel

I. Berichterstatter : Prof. Dr. med. W. Brück

II. Berichterstatter/in :

III. Berichterstatter/in :

Tag der mündlichen Prüfung :

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungsverzeichnis.....	III
1. Einleitung.....	1
1.1 Makrophagen.....	1
1.1.1 Das mononukleäre Phagozytensystem.....	1
1.1.2 Identifikation der myelinphagozytierenden Zellen.....	2
1.2 Interleukin-6.....	3
1.2.1 IL-6-Rezeptor und Transduktionssignale.....	4
1.2.2 Therapeutische Effekte von IL-6.....	5
1.2.3 IL-6 im Nervensystem.....	6
1.2.4 IL-6 und Multiple Sklerose.....	7
1.3 Ziel der Arbeit.....	7
2. Material und Methoden.....	8
2.1 Versuchsmodell.....	8
2.2 Kultur der Peritonealmakrophagen mit den Nervensegmenten.....	9
2.3 Immunhistochemie.....	9
2.3.1 Immunhistochemisches Färbeprotokoll.....	10
2.3.2 Makrophagendichte.....	11
2.4 Myelinbeladung und Makrophagengröße.....	12
2.4.1 Herstellung der Semi-Dünn-Schnitte.....	12
2.4.2 Quantifizierung der Myelinbeladung und Makrophagengröße.....	12
2.5 ELISA (Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay).....	13
2.5.1 ELISA-Protokoll.....	14
2.6 Statistik.....	15

3. Ergebnisse	16
3.1. Identifikation der Makrophagen.....	16
3.2. Makrophageninvasion in den N. ischiadicus.....	17
3.2.1 Die Entwicklung der Makrophageninvasion.....	20
3.3. Myelinbeladung und Makrophagengröße	21
3.4. Produzierte Zytokine	24
3.5. Makrophageninvasion nach Manipulation des IL-6-Signals	25
3.6. Myelinbeladung nach Manipulation des IL-6-Signals	30
4. Diskussion	32
4.1 Expression von Oberflächenrezeptoren durch Makrophagen und deren Beteiligung an der Myelinphagozytose.....	32
4.2 Expression kostimulatorischer Moleküle durch Makrophagen.....	34
4.3 Die Rolle der Makrophagen beim Myelinabbau	35
4.4 Nicht-residente Makrophagen sind viel aktiver beteiligt an der Myelinphagozytose als residente Makrophagen	36
4.5 Einflüsse von Zytokinen auf Makrophageninvasion und Myelinphagozytose	37
4.6 Die Blockade des IL-6-Signals wirkt sich nicht auf die migratorische Aktivität der Makrophagen aus	39
4.7 Die Blockade des IL-6-Signals wirkt sich nicht auf die Phagozytoseaktivität der Makrophagen aus	41
5. Zusammenfassung.....	42
6. Literaturverzeichnis.....	43

Abkürzungsverzeichnis

aIL-6	anti-Interleukin-6-Antikörper
aIL-6R	Antikörper gegen den Interleukin-6-Rezeptor
BDNF	<i>brain-derived neurotrophic factor</i>
BNPP	bis(4-nitrophenyl)-Phosphat
BSF-2	<i>B-cell stimulating factor 2</i>
CCL	<i>chemokine (C-C motif) ligand</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CD80 ⁺	CD80-positiv
cDNA	<i>complementary desoxyribonucleic acid</i>
Cl ₂ MDP	Dichlormethylen-Diphosphonat
CNP	<i>cyclic nucleotide phosphodiesterase</i>
CNTF	<i>ciliary neurotrophic factor</i>
CR3	<i>complementary receptor 3</i>
CRP	C-reaktives Protein
CXCL	<i>chemokine (C-X-C motif) ligand</i>
DAB	Diaminobenzidin Tetrachlorid
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
EAE	Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay</i> (Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest)
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i> (Fluoreszenzbasierte Durchflusszytometrie)
FCS	<i>fetal calf serum</i> (fötales Kälberserum)
GM-CSF	Granulozyten-Monozyten <i>colony stimulating factor</i>

gp130	Glykoprotein 130
ICAM	intrazelluläres Adhäsionsmolekül
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IKB	inhibitorisches Kappa-B-Protein
IL	Interleukin
IL-6	Interleukin-6
JAK2	Janus-Kinase 2
KC/GRO α	<i>kreatingocyte-derived chemokine (KC) mouse equivalent to human growth regulated oncogen α, CXCL1</i>
kDa	Kilo-Dalton
LFA	<i>lymphocyte function antigen</i>
LPS	Lipopolysaccharide
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MCD	<i>multicentric castleman disease</i>
MCP-1	<i>monocyte chemoattractant protein-1</i>
M-CSF	Monozyten <i>colony stimulating factor</i>
MDC	<i>macrophage-derived chemokine, CCL22</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MIP-1	<i>macrophage inflammatory protein-1</i>
MOG	Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein
MPS	Mononukleäres Phagozytensystem
MS	Multiple Sklerose
M Φ	Makrophagen
NF-IL-6	<i>nuclear factor IL-6</i>
NF- κ B	<i>nuclear factor kappa B</i>
NT-3	Neurotrophin-3
OT	Objektträger
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (Phosphatgepufferte Salzlösung)
PGE2	Prostaglandin E2
PGF	<i>plasmocytoma growth factor</i>
PNS	peripheres Nervensystem

RANTES	<i>regulated upon activation, normal t-cell expressed and secreted protein, CCL5</i>
rIFN- γ	rekombinantes IFN- γ
RT	Raumtemperatur
SAA	Serumamyloid A
SEM	<i>standard error of the mean</i>
SHP-2	<i>src homology 2-containing tyrosine phosphatase</i>
sIL-6r	<u>s</u> oluble, lösliche Form des IL-6-Rezeptors
SRAI/II	<i>scavenger</i> Rezeptor AI/II
STAT3	<i>signal transducer and activator of transcription 3</i>
TARC	<i>thymus- and activation-regulated chemokine, CCL17</i>
TGF	<i>tumor growth factor</i>
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
VCAM	vaskuläres Zelladhäsionsmolekül
ZNS	zentrales Nervensystem

1. Einleitung

1.1 Makrophagen

1.1.1 Das mononukleäre Phagozytensystem

Das mononukleäre Phagozytensystem (MPS) ist Bestandteil des Immunsystems. Die Zellen des MPS sind mesodermaler Herkunft und entstammen dem Knochenmark. Aus den pluripotenten Stammzellen des Knochenmarks gehen Zellen der myeloischen Stammzellreihe hervor. Daraus entwickeln sich zunächst Monoblasten, dann Promonoblasten und später Monozyten. Die Differenzierung aus der Vorläuferzelle geschieht durch Einwirken verschiedener Wachstumsfaktoren. Hierzu zählen zunächst Granulozyten-Monozyten *colony stimulating factor* (GM-CSF) und später vor allem Monozyten *colony stimulating factor* (M-CSF). Die gereiften Monozyten migrieren aus dem Knochenmark ins Blut. Induziert durch Wachstumsfaktoren differenzieren sie zu Makrophagen. Nur ca. 8% der Makrophagen zirkulieren weiterhin im Blut. Die Mehrheit wandert nach bis zu 70 Stunden in verschiedene Zielgewebe ein, um dort als residente Makrophagen zu verbleiben. Typische Beispiele für Gewebsmakrophagen sind die Kupffer'schen Sternzellen in der Leber, die Langerhans-Zellen in der Haut oder die Alveolarmakrophagen der Lunge. Zellen des MPS im ZNS sind die Mikroglia (Ziegler-Heitbrock 1989). Im PNS sind residente Makrophagen lokalisiert (Arvidson 1977). Blutmakrophagen erreichen das ZNS nur im Falle einer geschädigten, offenen Blut-Hirn-Schranke.

Die Makrophagen sind die Zellen des MPS, deren Eigenschaften am besten erforscht sind. Die grundlegendste Funktion dieser Zellen ist die Phagozytose (Coleman 1986). Sie phagozytieren Fremdmaterial und Krankheitserreger, deren Antigene nach der Phagozytose auf der Zelloberfläche für die CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten präsentiert werden. So führen sie dem spezifischen Immunsystem Informationen über die Pathogenstruktur zu. Makrophagen produzieren Interleukine (IL), wie IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 (Janeway 2002), Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) sowie Stickstoffmonoxid und Arachidonsäurederivate.

Dank der Fortschritte auf dem Gebiet der Immunzytologie gelang es, die myelinphagozytierenden Zellen besser zu klassifizieren. Die Myelinophagen konnten immunhistochemisch dem MPS zugeordnet werden. Auf der Oberfläche der Makrophagen sind zahlreiche Rezeptoren lokalisiert, die Informationen über Aktivierung, Differenzierung, Migration, Phagozytose und weitere Funktionen der Makrophagen vermitteln. Myelinophagen weisen den Komplementrezeptor des Typs 3 (CR3/Mac-1) auf (Ross 1980) bzw. Komplementrezeptoren (C3b, C3bi) (Newman et al. 1985) sowie MPS-spezifische Marker wie zum Beispiel F4/80 bei der Maus (Perry et al. 1987). Makrophagen exprimieren weiterhin folgende Oberflächenproteine: Fc-Rezeptoren (IgG2a, 2b), Rezeptoren für Zytokine (IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, Interferon- α (IFN- α), IFN- β), MHC-II-Moleküle (Bo et al. 1994), Integrine (Mac-1, Mac-3), Lipoproteinrezeptoren sowie Hormonrezeptoren für Insulin, Angiotensin, Glukokortikoide und Wachstumsfaktoren. Der CR3/Mac-1-Rezeptor und der *scavenger*-Rezeptor AI/II (SRAI/II) übernehmen beide Schlüsselfunktionen bei der Vermittlung der Myelinphagozytose (Brück und Friede 1990, Reichert und Rotshenker 2003).

1.1.2 Identifikation der myelinphagozytierenden Zellen im PNS

Die Identität der myelinphagozytierenden Zelle war lange Zeit ungeklärt. Verschiedene Zellen, wie die Schwann-Zellen, endoneurale Fibroblasten, Zellen mesenchymalen Ursprungs sowie hämatogene und ortsständige Makrophagen wurden diskutiert. In ihrer Arbeit wiesen BEUCHE und FRIEDE die Beteiligung nicht ortsständiger Makrophagen an diesem Prozess nach (Beuche und Friede 1984). Da zur Identifikation der phagozytierenden Zellen damals noch keine spezifischen Zellmarker zur Verfügung standen, wählten sie folgende Methode: Diffusionskammern mit unterschiedlich großen Öffnungen im Mikrometerbereich enthielten den Nervus ischiadicus oder phrenicus und wurden in die Bauchhöhle anderer Mäuse implantiert. Bei den Diffusionskammern mit Kammeröffnungen von 0,22 μm war die Einwanderung von Zellen unmöglich. In diesen Kammern dauerte die Degeneration des Nervens wochenlang. Dafür konnten nur residente Makrophagen und Schwann-Zellen verantwortlich sein. Im Gegensatz dazu ließen die Kammern mit 5 μm großen Öffnungen die Migration nicht ortsständiger Makrophagen zu. Der hier festgestellte Myelinabbau verlief schneller. Er glich den Verhältnissen der Wallerschen Degeneration *in situ*. Die Wallersche Degeneration ist die elementare Reaktion des Nervens am distalen Nervenabschnitt, wenn die Kontinuität der Nervenfasern unterbrochen wird. Dieses Phänomen wurde erstmals 1850 durch

Augustus WALLER beschrieben (Waller 1850). Außer Makrophagen wurden in den 5 µm – Diffusionskammern Mastzellen und Neutrophile gefunden, aber sie waren nachweislich unbeteiligt an der Myelinphagozytose (Beuche und Friede 1984).

Diese vorangegangenen Versuche gaben Anlass dazu, den Prozess der monozytischen Myelinphagozytose detaillierter zu studieren. Der Nachteil des Versuchsmodells mit den Diffusionskammern lag in der Millipore-Membran selbst. Sie war Ziel der Chemotaxis der einwandernden Zellpopulationen. Es erforderte ein spezialisiertes Versuchsmodell, um zusätzliche Erkenntnisse über die Regulation der Myelinphagozytose zu gewinnen. BONNEKOH, SCHEIDT und FRIEDE etablierten 1989 dieses Versuchsmodell (Bonnekoh et al. 1989). Es lässt detaillierte Informationen zu über chemotaktische und aktivierende Signale, die Makrophagen zur Myelinerkennung und Phagozytose veranlassen. Hiermit kann die Myelinphagozytose experimentell gezielt manipuliert werden. Exzidierte Nervenfasern von Mäusen werden zusammen mit durch Thioglycollat stimulierten Makrophagen, die durch Peritoneallavage gewonnen wurden, in vitro kokultiviert. 1990 gelang es BRÜCK und FRIEDE, die Myelinphagozytose in vitro durch einen Antikörper gegen den Komplementrezeptor 3 (CR3) zu blockieren (Brück und Friede 1990). Diese Arbeit bewies gleichermaßen, dass der Komplementfaktor 3 auf degenerierten Myelinscheiden lokalisiert ist. Oponisiertes Myelin wird so von Makrophagen phagozytiert, die den CR3 exprimieren.

1.2 Interleukin-6

Die Interleukine zählen zu den Zytokinen. Sie sind körpereigene Botenstoffe, die eine Vielfalt biologischer Funktionen regulieren. Interleukin-6 (IL-6) ist maßgeblich an Inflammationsprozessen und an der Immunantwort beteiligt. IL-6 wirkt als endogenes Pyrogen, löst die Akute-Phase-Reaktion aus und führt zur Leukozytose. IL-6 selbst reguliert eine Vielzahl biologischer Funktionen verschiedenster Zellen. Als Mediator der akuten Inflammation fördert IL-6 auch die Proliferation und Aktivierung der T-Zellen und Differenzierung und Immunglobulinproduktion der B-Lymphozyten (Akira et al. 1993). Fieber, Lethargie und Inappetenz als Symptome einer Entzündung sind IL-6 vermittelt (Gabay und Kushner 1999). Es stimuliert die Differenzierung von Makrophagen (Nicola et al. 1983), Megakaryozyten (Ishibashi et al. 1989, Koike et al. 1990) und Osteoklasten (Tamura et

al. 1993). Daneben reguliert es die Hämatopoese sowie die Regeneration von Nerven- und Lebergewebe. Die Dysregulation der IL-6-Signale trägt zur Pathogenese vieler chronischer Krankheiten bei, wie Rheumatoider Arthritis, Osteoporose, Morbus Crohn, Systemischer Lupus Erythematosus, neoplastischer und hyperproliferativer Krankheiten und Multipler Sklerose (MS).

IL-6 wurde ursprünglich 1981 identifiziert als ein antigenunspezifischer B-Zell-Differenzierungsfaktor, der B-Zellen dazu veranlasst, Immunglobuline zu produzieren (Muraguchi et al. 1981, Yoshizaki et al. 1982). IL-6 wurde damals noch als B-Zell-stimulierender Faktor 2 (BSF-2) bezeichnet. 1986 gelang erstmalig die Reproduktion komplementärer DNA (cDNA) von humanem Interleukin-6 (Hirano et al. 1986, Kinashi et al. 1986).

IL-6 wird von vielen Zellen produziert: B-Zellen, T-Zellen, Monozyten, Fibroblasten, Keratinozyten, Endothelzellen, Tumorzellen, Makrophagen, Mesangialzellen (Kishimoto et al. 1995), Skelettmuskelzellen bei körperlicher Anstrengung (Weigert et al. 2005) und Osteoblasten (Ishimi et al. 1990). IL-1, TNF, bakterielle und virale Infektionen und deren Bestandteile (Lipopolysaccharide (LPS)) stimulieren die IL-6-Expression. Für die Expression von IL-6 ist der *nuclear factor kappa B* (NF- κ B) verantwortlich. NF- κ B liegt im Zytoplasma inaktiviert als Komplex mit inhibitorischen Kappa-B-Proteinen (IKB) vor (Ghosh et al. 1998). Die Aktivierung des NF- κ B verläuft über eine Phosphorylierung mit anschließender Ubiquitinierung des IKB. Diese Konformationsänderung am IKB ermöglicht es dem NF- κ B sich vom IKB zu lösen und in den Zellkern einzudringen (Karin und Ben Neriah 2000). Dort bindet NF- κ B an die jeweilige DNA-Sequenz und reguliert die Transkription seiner Zielgene; zu denen auch das des IL-6 gehört (Li und Verma 2002).

1.2.1 IL-6-Rezeptor und Transduktionssignale

Der Aufbau des IL-6-Rezeptors wurde 1988 und 1990 von HIBI und YAMASAKI beschrieben. Er besteht aus zwei Glykoproteinuntereinheiten. Die eine Untereinheit ist der 80 kDa schwere IL-6R, auch als *Cluster of Differentiation* 126 (CD126) bezeichnet. IL-6R ist extramembranständig und dient der spezifischen Erkennung des IL-6. Die 130 kDa schwere

Untereinheit, das gp130, ist für die Signaltransduktion zuständig (Hibi et al. 1990, Yamasaki et al. 1988). Die Bindung von IL-6 an den IL-6R bewirkt eine Homodimerisierung von gp130, die in zwei unterschiedliche Wege der Signaltransduktion resultiert. Weg 1: Die Phosphorylierung der Janus-Kinase 2 (JAK2) führt zur Phosphorylierung mit Dimerisierung des *signal transducer and activator of transcription 3* (STAT3). STAT3 ist es so möglich in den Zellkern zu translozieren, um dort die Zielgene zu aktivieren. Weg 2: Phosphorylierte JAK2 aktiviert über die *Src homology 2-containing tyrosine phosphatase* (SHP-2) den Ras/Raf Weg, der die Tätigkeit der *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) reguliert (Heinrich et al. 2003). Am Ende der MAPK-Kaskade steht *nuclear factor IL-6* (NF-IL-6). STAT3 und NF-IL-6 binden an unterschiedliche korrespondierende Promotorregionen ihrer Zielgene und ermöglichen so deren Transkription (Heinrich et al. 1998, Nakajima et al. 1993).

Der Rezeptor IL-6R befindet sich auf Hepatozyten, spezifischen Lymphozytenpopulationen, neutrophilen Granulozyten, Monozyten und auf Makrophagen (Bauer et al. 1989). Trotzdem interagiert IL-6 mit vielen anderen Zellen. Dies ist aufgrund einer löslichen Form des IL-6-Rezeptors (soluble = sIL-6r) möglich. IL-6 und sIL-6r bilden einen Komplex, der an gp130 binden kann. Das gp130 ist auf nahezu allen Zellen des menschlichen Körpers lokalisiert. Das erklärt die Pleiotropie des IL-6. Der Prozess der IL-6-Signalübermittlung über den IL-6/sIL-6r Komplex wird als „*trans-signaling*“ bezeichnet (Scheller und Rose-John 2006).

1.2.2 Therapeutische Effekte von IL-6

Seit den erstmaligen Veröffentlichungen über IL-6 wächst das Wissen um Beteiligungen des IL-6 an Immunprozessen. Eine Dysregulation des IL-6 verursacht die Entstehung verschiedenster Krankheiten (Kishimoto 2005). Zusätzliches Wissen um diese regulatorischen Funktionen des IL-6 und Wege seiner Signalübermittlung werden umso bedeutender, weil daraus gezielte Möglichkeiten der Therapie vieler Krankheiten resultieren. Das Ziel therapeutischer Strategie ist deshalb die IL-6-Signalübertragung.

Ansatz am IL-6: Die Auswirkungen der Neutralisierung des IL-6 durch die Gabe von Antikörpern wurden in klinischen Studien getestet bei Patienten mit Nierenzellkarzinomen, multiplen Myelomen und cerebralen Lymphomen. Es führt zur Besserung der krebsassoziierten Symptome Fieber, Kachexie und Schmerz (Barton 2005).

Ansatz am IL-6R: Bei Patienten mit rheumatoider Arthritis besteht eine überhöhte IL-6-Produktion durch Synovialgewebe (Hirano et al. 1989). Im Tierversuch lässt sich zeigen, dass im Gegensatz zu Wildtyp-Mäusen die IL-6-*Knockout*-Mäuse nach antigeninduzierter Arthritis (Ohshima et al. 1998) eine geringfügige bis keine Arthritis entwickeln (Hata et al. 2004). Klinische Doppelblindversuche mit 523 Patienten ergeben Gleichwertigkeit der anti-IL-6-Therapie mit der anti-TNF-Therapie (Nishimoto et al. 2004). Die Effizienz des humanisierten anti-IL-6R-Antikörpers (Altizumab) in der Behandlung von rheumatoider Arthritis ist durch klinische Phase-I- und -II-Studien bewiesen (Choy et al. 2002).

1.2.3 IL-6 im Nervensystem

Die Hauptquelle von IL-6 im Gehirn sind aktivierte Mikroglia und Astrozyten. Im zentralen Nervensystem (ZNS) produzieren humane Mikroglia IL-6 als Antwort auf LPS und TNF- α . Astrozyten produzieren IL-6, stimuliert durch IL-1, TNF- α , TNF- β , Prostaglandin 2 (PGE2) und traumatische Nervenverletzung (Hariri et al. 1994). Diese Schäden des ZNS verursachen, ungeachtet ob durch mechanische Verletzung, Inflammation, Neurotoxine oder ob ischämisch sowie infektiös bedingt, einen Anstieg der Konzentration von IL-6 in der cerebrospinalen Flüssigkeit (CSF) durch die Freisetzung von IL-6 aus Astrozyten und Mikroglia (Arvin et al. 1996). Aber auch Neuronen (Schobitz et al. 1992) und cerebrales Endothel (Fabry et al. 1993, Jirik et al. 1989) produzieren eine geringe Menge an IL-6. Im peripheren Nervensystem (PNS) wird IL-6 von Schwann-Zellen als Folge einer Nervenverletzung (Bolin et al. 1995) produziert. Neben den hauptsächlich proinflammatorischen Eigenschaften des IL-6 bestehen auch antiinflammatorische Effekte. IL-6 sorgt für die Entwicklung und das Überleben von Neuronen. Seine neuroprotektiven Effekte liegen beispielsweise in der Eigenschaft, die TNF- und IL-1-Synthese zu unterdrücken (Norris et al. 1994).

1.2.4 IL-6 und Multiple Sklerose

Bisherige Untersuchungen werfen die Frage nach einer potentiellen Beteiligung des IL-6 an Multipler Sklerose auf. In akuten und chronischen Plaques aus dem Gehirn von MS-Patienten wurde IL-6 nachgewiesen. IL-6 ist besonders an den Stellen fortschreitender Demyelinisierung lokalisiert (Maimone et al. 1997). Es wurden Forschungsergebnisse über erhöht gemessene IL-6 Konzentrationen bei MS-Patienten publiziert (Frei et al. 1991). Andererseits konnte dieses nicht bestätigt werden (Hampel et al. 1997). BRÜCK und Kollegen konnten in ihrer Studie mit 36 MS-Fällen die Beteiligung von IL-6 an der MS nachweisen (Brück et al. 1995b). Die höchste Anzahl IL-6 exprimierender Zellen wurde in inaktiven demyelinisierenden Läsionen gefunden. Die Konzentrationen von IL-6 schienen mit Oligodendrozyten-protectiven Effekten einherzugehen und wichtig zu sein für das Überleben in MS- Läsionen (Schonrock et al. 2000). Die Rolle des IL-6 bei der Multiplen Sklerose bleibt bis heute jedoch ungeklärt.

1.3 Ziel der Arbeit

Die vorliegende Arbeit soll durch zellbiologische und immunhistochemische Methoden die Rolle des Interleukin-6 bei der Myelinphagozytose im PNS klären.

2. Material und Methoden

2.1 *Versuchsmodell*

Für die vorliegende Arbeit wurde ein spezielles *in-vitro*-Modell verwendet, das der *in-vivo*-Situation sehr nahe kommt. Dieses Zellkulturmodell basiert auf dem Modell von FRIEDE und BONNEKOH (Bonnekoh et al. 1989). Die dafür notwendigen Techniken wurden in dem Labor der Neuropathologie Göttingen weiterentwickelt (Brück und Friede 1990, Brück und Friede 1991, Brück et al. 1996, da Costa et al. 1997, Kuhlmann und Brück 1999, Vougioukas et al. 2000, Siebert et al. 2001, Kuhlmann et al. 2002).

Ischiasnerven von Mäusen wurden präpariert, von den umhüllenden Nervenscheiden - dem Perineurium - befreit und in mehrere gleich große Fragmente geteilt. Diese Nervenfragmente wurden entweder mit oder ohne Peritonealmakrophagen, die zuvor mit Thioglycollat aktiviert wurden, für 2, 5, oder 10 Tage kultiviert. Anschließend wurden die Nerven als Kryomaterial aufgearbeitet oder in Araldit eingebettet. Innerhalb des Nervengewebes konnte immunhistochemisch die Expression verschiedener Proteine untersucht werden. Dieses diente zur Charakterisierung der Makrophagenaktivität im Nervengewebe. Sie lässt sich durch die Anzahl der Makrophagen pro Quadratmillimeter sowie deren Myelingeht bestimmen. Die Überstände der Nährmedien, in denen die Nerven während der Kultivierung lagen, wurden mittels ELISA auf produzierte Chemokine und Zytokine hin untersucht. Zuerst wurde das System charakterisiert durch Identifizierung der molekularen Komponenten, die exprimiert wurden. Als zweites folgte die Untersuchung des Effekts einzelner Komponenten durch deren Manipulation. In dieser zweiten Versuchsreihe wurde das Zytokinsignal manipuliert durch Applikation von a) direkten Zytokinantikörpern und b) Antikörpern gegen den Zytokinrezeptor auf der Makrophagenmembran. Erneut wurden immunhistochemische Untersuchungen zur Makrophagenaktivität durchgeführt. Es galt, die Frage nach Unterschieden in der Makrophagenaktivität vor und nach der Signalmodulation zu klären.

2.2 *Kultur der Peritonealmakrophagen mit den Nervensegmenten*

Alle Tiere wurden in Übereinstimmung mit den Vorschriften zur Behandlung von Versuchstieren auf Basis der Tierschutzgesetze behandelt. Die Ischiasnerven von 8 bis 10 Wochen alten weiblichen C57BL/6-Mäusen wurden präpariert. Zuvor wurden die Mäuse in tiefer Ethernarkose dekapitiert. Das Perineurium wurde entfernt und die Nerven in 3-4 mm lange Segmente geteilt. Die Segmente wurden einzeln in hydrophoben - durch Silikon-Vierringe gekammerten - Petrischalen in Dulbecco's MEM (DMEM) unter 10 % CO₂ bei 37°C kultiviert. Das Medium wurde am Ende der Kulturdauer nach 2, 5 oder 10 Tagen gesammelt bzw. alle 3 Tage ausgetauscht. Alle diese Überstände wurden bei -20°C für spätere Untersuchungen gelagert. Jeder Zeitpunkt des Experiments beinhaltete 9 bis 40 Nervensegmente von 3 bis 10 verschiedenen Mäusen.

Die peritonealen Makrophagen wurden durch Ausspülung der Bauchhöhle gewonnen, nachdem den Mäusen 4 Tage zuvor intraperitoneal 0,5 ml Thioglycollat-Lösung (29g Thioglycollat pro Liter Dulbecco's PBS, *phosphate buffered saline*) injiziert wurde. Die Makrophagen wurden mittels intraperitonealer Injektion von jeweils 2 ml eiskaltem PBS ausgewaschen, zentrifugiert (mit 1000 U/min bei 4°C für 10 Minuten), in DMEM (enthält 5% *fetal calf serum* (FCS)) auf eine Konzentration von 1×10^6 pro ml verdünnt und zu den Nervensegmenten zur Kokultivierung dazugegeben.

2.3 *Immunhistochemie*

Ausgewählte Makrophagenmarker wurden verwendet, um in den Nervenschnitten die Makrophagen identifizieren und charakterisieren zu können. Der benutzte immunhistochemische Marker für Makrophagen generell ist F4/80 (Ratte anti-Maus F4/80; Firma Serotec, United Kingdom). Um aktivierte Makrophagen zu kennzeichnen, wurden CD11b (Ratte anti-Maus CR3 Rezeptor, Mac-1; Firma Serotec, UK), CD16/CD32 (Ratte anti-Maus, Fc-Rezeptor, FcγII/III Rezeptor; Firma BD Biosciences Pharmingen, Deutschland) und CD204 (Ratte anti-Maus Scavenger Rezeptor, 2F8; Serotec, UK) verwendet. Antigen präsentierende Zellen wurden markiert mit MHC-II (Ratte anti-Maus; Serotec, UK), CD80 (Hamster anti-Maus B7-1; BD Biosciences Pharmingen, Deutschland) und CD86 (Ratte anti-Maus B7-2; BD Biosciences Pharmingen, Deutschland). Zellen, die Zelladhäsionsmoleküle

exprimieren, wurden mit CD54 (Ratte anti-Maus ICAM, intrazelluläres Adhäsionsmolekül; Serotec, UK) markiert.

Nach Kulturrende wurden die Nervensegmente in stickstoffgekühltem Isopentan in Tissue Tek (Sakura Finetek, Holland) auf Korkplatten schockgefroren. Am Kryostat (2800 Frigocut, Reichert-Jung) wurden 5µm dünne Schnitte des Nervens angefertigt und auf Superfrostobjektträger (Menzel-Gläser, Braunschweig) appliziert.

2.3.1 Immunhistochemisches Färbeprotokoll

- 1 Die Schnitte auf den Objektträgern (OT) werden für 10 Minuten in eiskaltem Aceton in der Standkuvette unter der Abzugshaube fixiert.
- 2 Dann trocknen die Schnitte auf Objektträgern für 30 Minuten.
- 3 Zur Blockade der endogenen Peroxidase verbringen die OT 10 Minuten bei 4°C in 0,3%igem H₂O₂ (0,5ml 30%iges H₂O₂ in 49,5ml PBS aufgrund des 50-ml-Füllvolumens der Standkuvette)
- 4 Die OT werden mit einem Tropfen PBS auf das Färbekammergegenstück in die Färbebox gestellt.
- 5 1x mit PBS spülen.
- 6 Zugabe von 120 µl FCS pro Kammer.
- 7 10-20 Minuten einwirken lassen.
- 8 Der primäre Antikörper wird in die Färbekammern pipettiert.

Jeweils 150 µl pro Kammer in verschiedenen Konzentrationen (siehe Verdünnungsreihe)

Verdünnungsreihen:

CD86	1:15	10µl AK + 140 µl 10%FCS in PBS
F4/80	1:50	3µl AK + 147 µl 10%FCS in PBS
Mac1	1:50	3µl AK + 147 µl 10%FCS in PBS
CD80	1:50	3µl AK + 147 µl 10%FCS in PBS
2F8	1:75	2µl AK + 148 µl 10%FCS in PBS
CD16/32	1:100	1,5µl AK + 148,5 µl 10%FCS in PBS
ICAM	1:200	0,75 µl AK + 149,3 µl 10%FCS in PBS
MHC II	unverdünnt	

- 9 Die Inkubationszeit beträgt 90 Minuten bei Raumtemperatur (RT).

- 10 2x mit PBS spülen.
- 11 Speziesspezifischen sekundären Antikörper applizieren.
 - anti-*hamster* für B7-1 1:50 3 µl anti-*hamster* + 147 µl 10% FCS in PBS
 - IgM anti-*rat* für MHC II 1:100 1,5 µl anti-*rat* + 148,5 µl 10% FCS in PBS
 - IgG anti-*rat* 1:200 8µl anti-*rat*+792 µl 10% FCS in PBS
 für die 6 restlichen Rezeptoren: B7-2, F4/80, Mac1, 2F8, CD16/32, ICAM
- 12 Die Inkubationszeit des sekundären Antikörpers beträgt 45-60 Minuten.
- 13 2x mit PBS spülen.
- 14 120 µl Extravidin Peroxidase Konjugat (1:1000 in PBS, d.h.: 2x 749 µl PBS + 1,5 µl Extravidin) werden pro Kammer pipettiert und für 45-60 Minuten inkubiert.
- 15 2x mit PBS spülen.
- 16 Die Schnitte werden nun in 1ml Diaminobenzidin Tetrachlorid (DAB) mit 50ml PBS und 16µl 30%igem H₂O₂ in der Standküvette für 10 bis 20 Minuten entwickelt.
- 17 Entwicklung mit PBS stoppen.
- 18 Es folgt die Gegenfärbung in Mayers Hämalaun (Merck, Darmstadt) für 15 Sekunden.
- 19 OT für 2 Minuten in fließendem Leitungswasser spülen.
- 20 Eindeckeln der Schnitte mit Thermo Shandon (Immu-Mount, USA).

2.3.2 Makrophagendichte

Die Anzahl der Makrophagen, die positiv in der Färbung (d.h. braun umrandet waren) auf F4/80, CD11b (Mac-1), CD204 (2F8) und CD16/CD32 reagierten, wurde mit Hilfe eines Mikroskops (BX51, Olympus, Hamburg) bestimmt. Das Mikroskop war mit einem Computer über die Analysis Software (analySIS Soft Imaging System, Deutschland) verbunden, deren graphische Oberfläche die Bestimmung der Fläche des Nervenquerschnitts ermöglichte. Die Makrophagendichte ergibt sich aus dem Quotienten aus Anzahl und Fläche, sodass die Angabe der Makrophagendichte in Zellen/mm² erfolgte. Insgesamt wurden über 10.000 Schnitte untersucht.

2.4 Myelinbeladung und Makrophagengröße

2.4.1 Herstellung der Semi-Dünn-Schnitte

Nach Kulturrende wurden die Nervensegmente zweimalig in PBS gewaschen, um dann für eine Stunde in 3%igem Glutaraldehyd in PBS bei 4°C fixiert zu werden. Danach verbrachten sie eine Stunde in gepuffertem 1%igem Osmiumtetroxid. Daraufhin wurden sie für 2 mal 5 Minuten in PBS gewaschen. Es schloss sich die Dehydratation in Alkoholbädern aufsteigender Konzentration an (50%, 60%, 70%, 80%, 96% und 100%). Als nächstes wurden die Nervensegmente für 2 mal 20 Minuten in Propylenoxid inkubiert. Im Anschluss wurden sie 35 Minuten in Propylenoxid/Araldit im Verhältnis von 1:2 gelagert, gefolgt von weiteren 35 Minuten in 1:3 Propylenoxid/Araldit. Schlussendlich wurden die Nervensegmente in Araldit eingebettet, um für 20 Minuten bei RT und danach 40 Minuten bei 37°C auf einer Wärmeplatte (Schütt, Göttingen) trockengehärtet zu werden.

Nach dieser Behandlung wurden von den Nervensegmenten am Ultracut UCT (Leica, Wetzlar) 1 µm dünne Semi-Dünn-Schnitte angefertigt, auf OT (Knittel Glasbearbeitung, Braunschweig) aufgetrocknet, mit Toloudin Blau gefärbt und mit Araldit eingedeckelt.

2.4.2 Quantifizierung der Myelinbeladung und Makrophagengröße

Die Myelinbeladung wurde in Semi-Dünn-Schnitten von 1 µm bestimmt. Bei 1000facher Vergrößerung am Mikroskop (BX51, Olympus, Hamburg) wurde mit Hilfe der Analysis Software (analySIS Soft Imaging System, Deutschland) ein virtuelles morphometrisches Gitter von 3x3 µm über den Makrophagenquerschnitt projiziert. Die Anzahl der Gitterschnittpunkte über zytoplasmatischem Myelindebris innerhalb des Makrophagen wurde durch die Anzahl an Gitterschnittpunkten auf dem gesamten Makrophagen geteilt. Dieser Quotient ergab die prozentuale Myelinbeladung des einzelnen Makrophagen. Mindestens 6 Schnitte wurden pro Zeitpunkt untersucht. Jeder Schnitt beinhaltete 20 Makrophagen. Die Anzahl an Gitterschnittpunkten über der Gesamtfläche des Makrophagen ergab die relative Makrophagengröße. Eine Einheit entspricht einem Schnittpunkt.

2.5 ELISA (*Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay*)

Die Segmente der Ischiasnerven wurden mit oder ohne Peritonealmakrophagen, die zuvor mit Thioglycollat aktiviert wurden, für 2, 5 oder 10 Tage in Nährmedien kultiviert. Mit Hilfe einer Abwandlung des ELISA, dem *Sandwich-* oder *capture-ELISA*, lassen sich in den Überständen sezernierte Zytokine in Art und Konzentration nachweisen. Folgende Zytokine wurden in der vorliegenden Arbeit gemessen: IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12p40, IL-12p70, IFN γ , M-CSF, TGF β_1 , TNF- α , *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF), *ciliary neurotrophic factor* (CNTF) und Neurotrophin-3 (NT-3) sowie CCL2 (MCP-1/JE), CCL3 (MIP-1 α), CCL5 (RANTES), CCL11 (Eotaxin), CCL17 (TARC), CCL22 (MDC), CXCL1 (KC/GRO α). Die Funktionsweise des *capture-ELISA* setzt voraus, dass man vorher wissen muss, nach welchem Antigen man sucht. Der *capture-ELISA* basiert auf folgendem Prinzip:

Zu dem Antigen, das nachgewiesen werden soll, werden spezifische Antikörper am Boden einer Trägerplatte gebunden. Diese antigenspezifischen monoklonalen *capture-Antikörper* binden mit hoher Affinität an ein Epitop des Antigens und konzentrieren das Antigen auf der Trägeroberfläche. Nach Auswaschen allen ungebundenen Antigens wird biotinylierter Detektions-Antikörper hinzugefügt. Dieser ebenfalls monoklonale Antikörper bindet an ein weiteres bestimmtes Epitop des zu untersuchenden Moleküls. So entsteht eine Sandwichstruktur. Eine anschließende Auswaschung entfernt die ungebundenen Detektions-Antikörper. Ein Detektions-Reagenz wird hinzugefügt (z.B.: *Horseardish Peroxidase* gebundenes Streptavidin, Streptavidin-HRP). Das Streptavidin des Detektions-Reagenz bindet an das Biotin. Die Trägerplatte wird erneut gewaschen, um ungebundene Streptavidin-HRP zu entfernen. Die hinzugegebene Substrat-Lösung (z.B.: Tetramethylbenzidinperoxidase) verursacht eine Bläufärbung, deren Intensität von der Menge des gebundenen Antigens abhängt. Eine saure Stop-Lösung beendet die Reaktion. Die Farbe der Lösung ändert sich dabei von blau zu gelb. Die optische Dichte der Gelbfärbung wird jetzt in einem Microtiter-Lesegerät bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen. Mitgemessen werden müssen Kontrollproben, die bereits das zu untersuchende Antigen in verschiedenen bekannten Konzentrationen enthalten. Anhand der ermittelten optischen Dichten der bekannten Konzentrationen erstellt man Standardkurven. Im Folgenden lässt sich aus diesen Standardkurven ablesen, welchen Konzentrationen die ermittelten optischen Dichten der unbekannt Proben entsprechen. Diese Standardkontrollproben werden auf jeder Platte vorgenommen. Jede Platte enthält 96 kleine Reaktionskammern, sogenannte *wells*. In jeder

Reaktionskammer kann eine Probe untersucht werden. Insgesamt wurden über 250 ELISA Platten ausgemessen.

2.5.1 ELISA-Protokoll

Die ELISA wurden entsprechend der Herstelleranweisungen durchgeführt (DuoSet, ELISA Development System, R&D Systems, Wiesbaden).

Vorbereitung der Platte:

- 1 Der *capture*-Antikörper wird auf Arbeitskonzentration in PBS verdünnt.
- 2 100µl *capture*-Antikörper pro Reaktionskammer pipettieren.
- 3 Die Platte wird mit Parafilm abgedeckt und über Nacht bei RT inkubiert.
- 4 Es folgt ein dreimaliges Auswaschen jeder Reaktionskammer mit jeweils 400 µl Waschlösung.
- 5 300 µl Blockpuffer pro Reaktionskammer werden hinzugefügt und für 1 Stunde inkubiert.
- 6 3x Auswaschen mit 400 µl Waschlösung.

Durchführung des ELISA:

- 1 Applikation von 100 µl/Reaktionskammer der zu untersuchenden Mediumüberstände aus den Nervenkulturen. Sie werden mit dem zytokinspezifischen Reagenzverdünner auf die entsprechende Konzentration verdünnt, damit die zu messenden Werte innerhalb der Standardwerte bleiben.
- 2 Inkubation für 2 Stunden bei RT auf dem Schüttler (E. Bühler, Hechingen).
- 3 3x Auswaschen mit 400 µl Waschlösung.
- 4 Applikation von 100 µl/Reaktionskammer Detektions-Antikörper (in Detektionsverdünner verdünnt).
- 5 Inkubation für 2 Stunden bei RT auf dem Schüttler (E. Bühler, Hechingen).
- 6 3x Auswaschen mit 400 µl Waschlösung.
- 7 100 µl Streptavidin HRP werden pro Reaktionskammer hinzugefügt.
- 8 Es schließt sich eine 20minütige Inkubation im Dunkeln an.
- 9 3x Auswaschen mit 400 µl Waschlösung.
- 10 100 µl/Reaktionskammer Substrat-Lösung werden hinzugefügt,
- 11 gefolgt von 20 Minuten Inkubation im Dunkeln.

- 12 Applikation von 50 μ l Stop-Lösung pro Reaktionskammer.
- 13 Messung der optischen Dichte im Microtiter-Lesegerät (680 XR, Bio-Rad, USA) bei 450 nm.

2.6 Statistik

Die statistische Auswertung wurde mit GraphPad Prism 4 (GraphPad Software, USA) mittels ungepaarten T-Tests und p-Werts durchgeführt. Als statistisch signifikant wurden p-Werte von $p \leq 0,05$ angenommen. Die graphische Darstellung aller Ergebnisse wurde ebenfalls mit GraphPad Prism 4 vorgenommen.

3. Ergebnisse

3.1. Identifikation der Makrophagen

Die präparierten Segmente der Nn. ischiadici von Mäusen wurden wahlweise mit oder ohne Peritonealmakrophagen für eine Dauer von 2, 5 oder 10 Tagen kultiviert. Die Gefrierschnitte der Nervensegmente wurden nach Kulturrende immunhistochemisch mit spezifischen Antikörpern gegen Makrophagenoberflächenproteine gefärbt, um die Makrophagen (MΦ) im Gewebe identifizieren, charakterisieren und quantifizieren zu können.

F4/80 ist ein monoklonaler Antikörper, der spezifisch Makrophagen der Maus markiert (Austyn und Gordon 1981). Als wichtige an der Myelinphagozytose beteiligte Rezeptoren wurden die Fc-Rezeptoren (CD16/32), der Komplementrezeptor CR3/Mac-1 (CD11b) und der *scavenger*-Rezeptor (CD204) untersucht (Kuhlmann und Brück 1999, Brück und Friede 1990, da Costa et al. 1997). Diese Marker wurden ausgewählt, weil ihre Eigenschaften vielfach beschrieben sind. Ihre besonders hoch regulierte Expression in aktivierten Makrophagen ist bestens bekannt. In unserem Modell exprimierten die Makrophagen tatsächlich während der gesamten Kulturdauer eine hohe Anzahl dieser vier Marker.

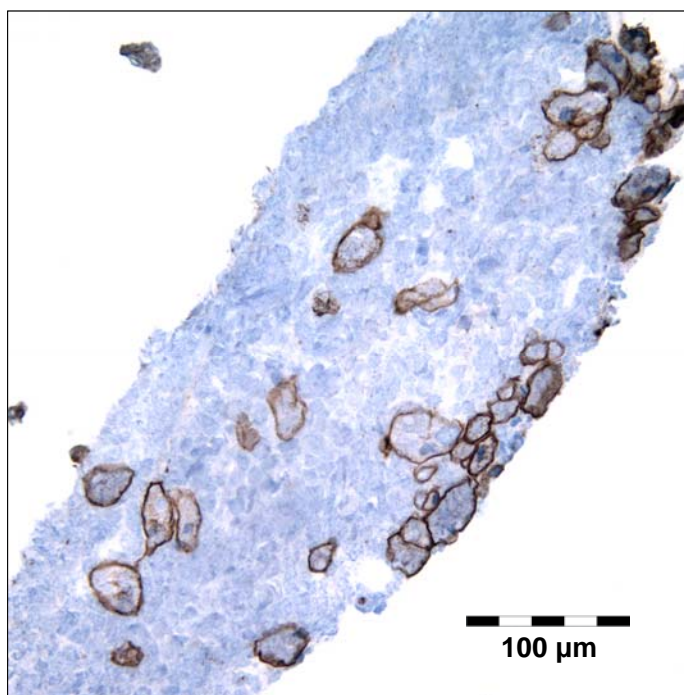


Abbildung 1:
Positiv markierte Makrophagen

Die Abbildung 1 zeigt einen repräsentativen Schnitt mit auf F4/80 positiv gefärbten Makrophagen. Es handelt sich um Peritonealmakrophagen und residente Makrophagen im N. ischiadicus nach 10 Tagen. Aufnahme bei 200facher Vergrößerung.

3.2 Makrophageninvasion in den *N. ischiadicus*

Die mit den Nervensegmenten kokultivierten Makrophagen wandern in das Nervengewebe ein. Bei den wenigen nachgewiesenen Makrophagen in den reinen Nervenkulturen ohne zusätzliche peritoneale Makrophagen handelt es sich um residente Makrophagen. Nach 2 Tagen betrug die Anzahl F4/80-positiver Makrophagen/mm² in dem Nervengewebe mit Peritonealmakrophagen 120 ± 19 und war damit signifikant höher ($p=0,0005$) als 10 ± 2 MΦ/mm² in der reinen Nervenkultur (Abb.3). Zum gleichen Zeitpunkt befanden sich 137 ± 19 zu 10 ± 4 ($p=0,0001$) CD11b-positive Zellen /mm² in den Nerven. Ähnliche Differenzen waren auch bei den Färbungen für CD204 zu sehen mit 111 ± 15 MΦ/mm² im Vergleich zu 7 ± 2 ($p<0,0001$) nach ebenfalls 2 Tagen. Dieselben signifikanten Unterschiede ergaben sich nach 5 und 10 Tagen für alle F4/80-, CD 11b-, CD204- und CD16/32-positiven Zellen. Immer war die Makrophagendichte in den mit Peritonealmakrophagen kultivierten Nervensegmenten signifikant höher als in den Nervenkulturen ohne Peritonealmakrophagen (vgl. Abb.3 und Tabelle 1). Der Anteil von residenten Makrophagen an den positiv markierten Makrophagen in den Nerv-Peritonealmakrophagen-Kokulturen lag bei 10 % nach 2 Tagen und 15 % nach 10 Tagen.

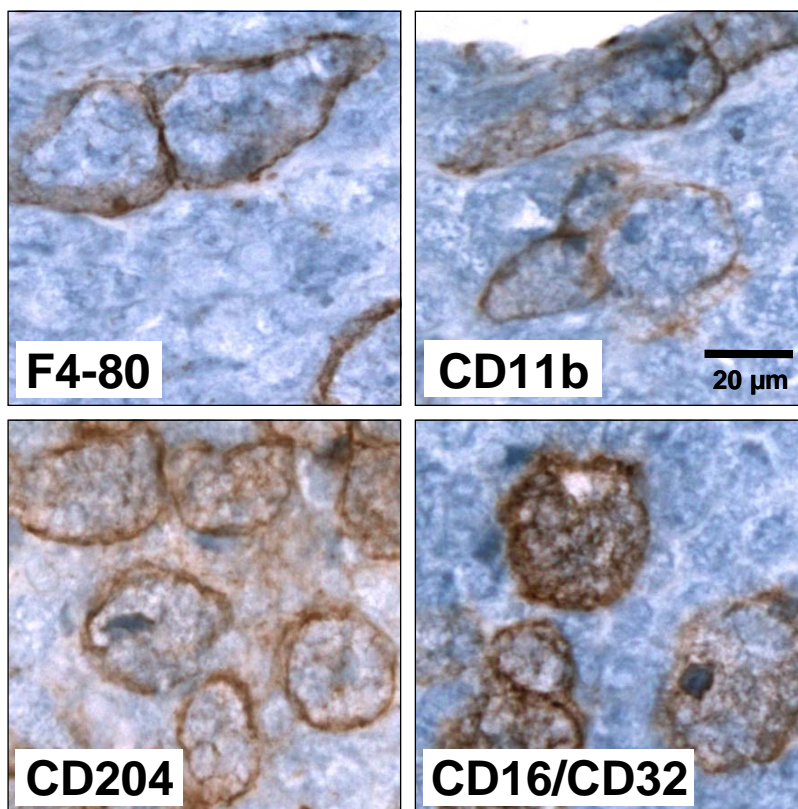
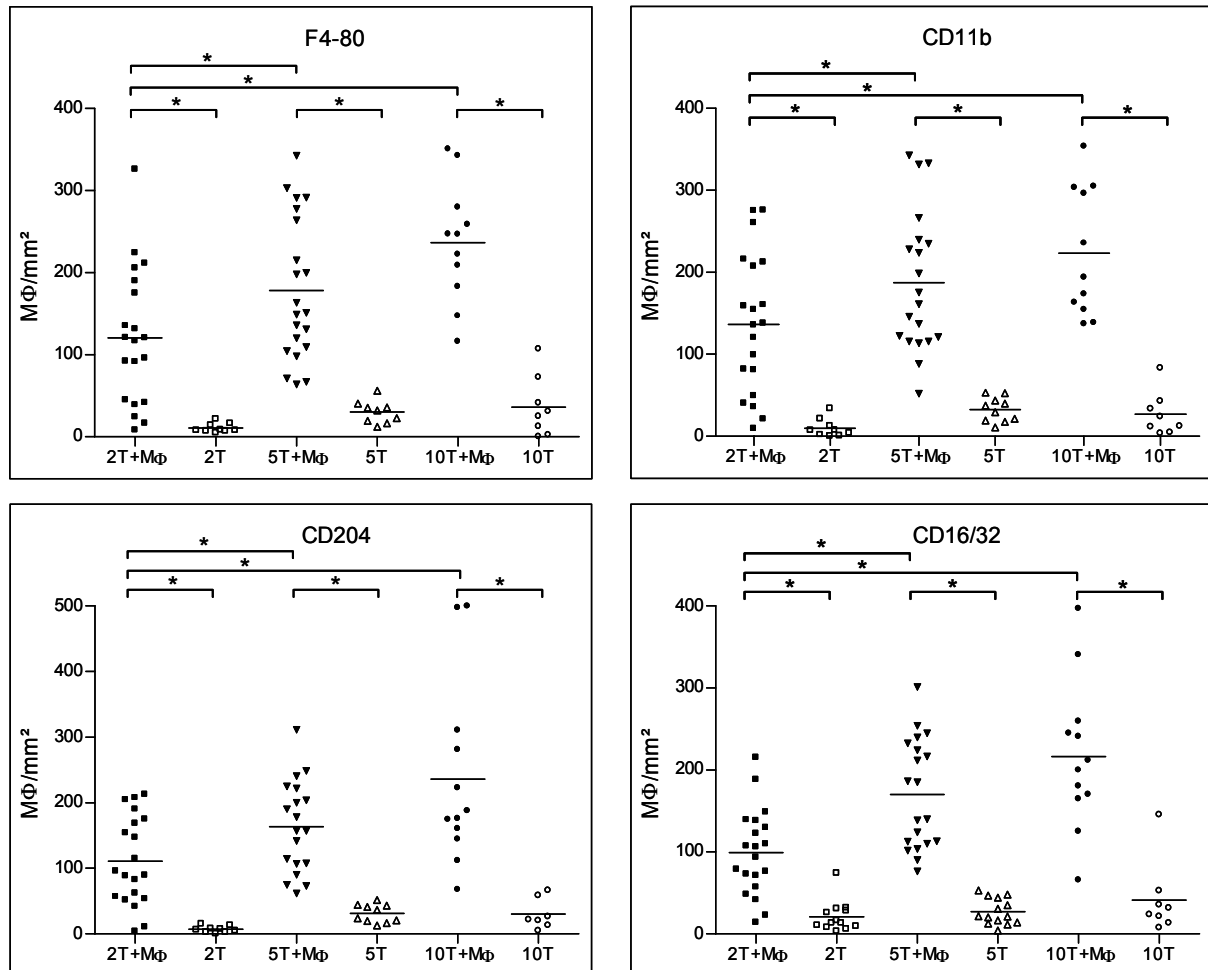


Abbildung 2: Deutliche Färbung positiv markierter Makrophagen

N. ischiadicus mit Peritonealmakrophagen nach 10 Tagen. Zu sehen sind positive Makrophagen die F4/80, CD11b, CD204 bzw. CD16-32 exprimieren. Aufnahme bei 400facher Vergrößerung.

Abbildung 3: Makrophageninvasion in den N. ischiadicus

Bestimmung der eingewanderten Makrophagen in MΦ /mm² anhand der Marker F4/80, CD11b, CD204 und CD16/32 nach 2, 5 und 10 Tagen. Die Peritonealmakrophagen migrieren in das Nervengewebe und führen dort zur signifikant höheren Makrophagendichte als in reinen Nervenkulturen, wo ausschließlich residente MΦ lokalisiert sind. Die Makrophageninvasion beginnt ab dem 2. Tag und nimmt über die 10 Tage zu.



Horizontale Balken geben das arithmetische Mittel an; * = statistisch signifikant ($p \leq 0,05$).

Jeder Punktwert ist das arithmetische Mittel aus bis zu 8 Schnitten.

Bei Vergleichen der Marker F4/80, CD11b, CD204 und CD16/32 miteinander entsteht der Eindruck eines harmonischen Profils der Makrophagendichten. Die Harmonie ist auch in der Färbung zu erkennen (vgl. Abb.2). Auffällig war, dass andere Marker wie MHC-II, CD80, CD86 und CD54 weniger zahlreiche Makrophagen/mm² oder eine geringer intensive Färbung der Makrophagen zeigten (vgl. Abb.4).

MHC-II-Moleküle werden auf der Makrophagenmembran exprimiert (Stevens et al. 1989). Die für die Auslösung einer Immunantwort notwendigen kostimulatorischen Moleküle sind CD80 und CD86 (Greenfield et al. 1998). Das CD54 (intrazelluläres Adhäsionsmolekül 1, ICAM-1) ist ebenfalls auf der Oberfläche der Makrophagen lokalisiert (Patarroyo 1994) und

an der Antigenpräsentation und der Interaktion zwischen Makrophagen und T-Zellen beteiligt (Springer 1990).

Folgende Werte beziehen sich auf die mit Peritonealmakrophagen kokultivierten Nervensegmente. CD54 positiv waren nur 56 ± 11 , 71 ± 15 und 66 ± 12 Zellen/mm² für die Dauer von 2, 5 und 10 Tagen. Diese Werte waren 2-3mal kleiner als die von F4/80 oder CD11b. Das deutet darauf hin, dass nur Subpopulationen der Makrophagen das Adhäsionsmolekül CD54 exprimieren. MHC-II-Strukturen wurden mit 17 ± 5 Zellen/mm² noch seltener präsentiert und dies auch nur nach 2 Tagen. Die schwache MHC-II-Immunreaktivität blieb nach 5 und 10 Tagen gänzlich aus. Ähnlich niedrige Anzahlen der CD86⁺ Zellen/mm² mit 20 ± 3 , 22 ± 5 und 19 ± 6 waren über einen Verlauf von 2, 5 und 10 Tagen feststellbar. Die Quantifizierung des exprimierten CD80 lieferte vergleichbar niedrige Werte, die bei 34 ± 7 Zellen/mm² nach 2 Tagen begannen und nach 10 Tagen mit 20 ± 6 auf knapp mehr als die Hälfte vom Anfangswert CD80-positiver Zellen/mm² gesunken waren.

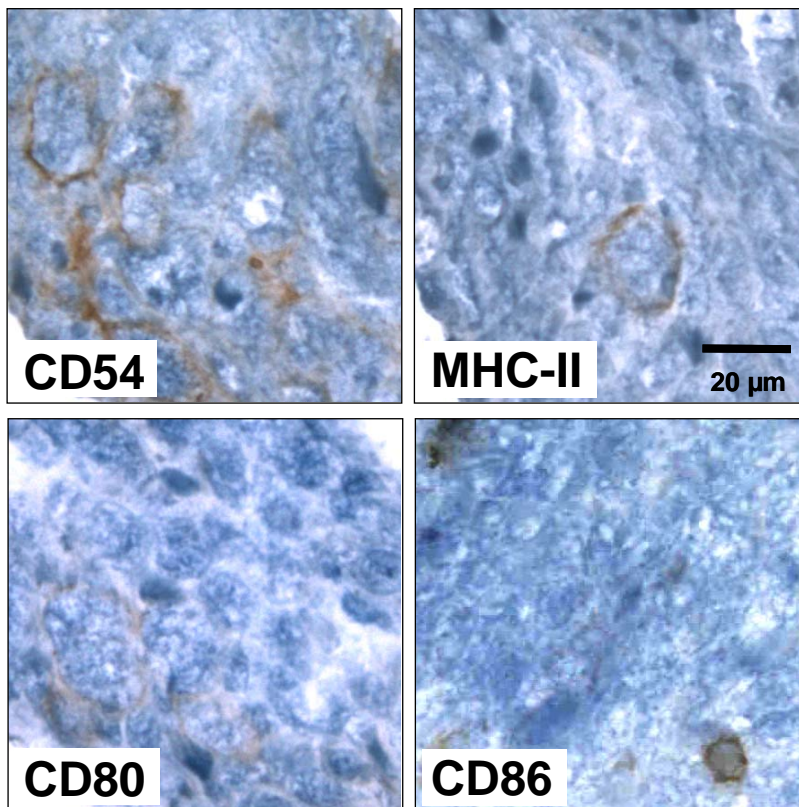


Abbildung 4: Schwach positiv markierte Makrophagen

N. ischiadicus mit Peritonealmakrophagen nach 10 Tagen. Zu sehen ist die deutlich schwächere Färbung der Makrophagen mit CD54, MHC-II, CD80 und CD86 im Vergleich zu den Markern in Abb. 2. Vergrößerung: 400fach.

3.2.1 Die Entwicklung der Makrophageninvasion

Wie sich die Makrophageninvasion im Verlauf von 2, 5 und 10 Tagen entwickelt, wird durch die graphische Darstellung der Ergebnisse in Abb.3 besonders deutlich. Die Invasion der peritonealen Makrophagen in das Nervengewebe ist ab dem zweiten Tag nachweisbar und verstärkt sich bis zu Tag 10. Für CD204 beispielsweise ergeben sich für den Verlauf von 2, 5 und 10 Tagen ansteigende Werte von 111 ± 50 , 163 ± 19 und 236 ± 40 Makrophagen/mm² zu den gleichen Zeitpunkten. Für CD16/32 wurden 99 ± 12 , 170 ± 15 und 217 ± 27 Makrophagen/mm² gemessen (vgl. Tab.1).

Tabelle 1: Makrophageninvasion in den N. ischiadicus

Marker	Makrophagen /mm ²					
	2 Tage +MΦ	2 Tage	5 Tage +MΦ	5 Tage	10 Tage +MΦ	10 Tage
F4-80	121 ± 19	10 ± 2	178 ± 19	30 ± 5	237 ± 22	36 ± 13
CD11b	137 ± 19	10 ± 4	187 ± 19	32 ± 5	223 ± 24	27 ± 10
CD204	111 ± 15	7 ± 2	163 ± 16	31 ± 4	236 ± 40	30 ± 9
CD16/32	99 ± 12	21 ± 5	170 ± 15	27 ± 4	217 ± 27	41 ± 16
CD80	34 ± 7	2 ± 1	11 ± 4	4 ± 1	20 ± 6	3 ± 1
CD86	20 ± 3	6 ± 3	22 ± 5	4 ± 1	19 ± 6	8 ± 2
CD54	56 ± 11	10 ± 4	71 ± 15	16 ± 4	66 ± 12	24 ± 4
MHC II	17 ± 5	6 ± 3	5 ± 2	1 ± 1	3 ± 2	2 ± 1

Angegeben sind die Mittelwerte der jeweiligen Gruppe ± Standardabweichung (SEM).

3.3 Myelinbeladung und Makrophagengröße

Die Myelinbeladung der Makrophagen liefert auch Informationen über ihre Aktivität. Im vorangegangenen Kapitel 3.2 wurden der generelle Aktivierungszustand anhand der Expression von Makrophagenoberflächenproteinen und die migratorische Aktivität durch die Makrophageninvasion beschrieben. Die folgenden Betrachtungen gelten der spezifischen Aufnahme von Myelin in die Makrophagen. Es handelt sich um morphologische Analysen zur prozentualen Beladung der Fläche mit Myelin innerhalb eines Makrophagenquerschnitts. Daher sei darauf hingewiesen, dass es sich pro Wert nur um den Zustand einer geschnittenen Ebene pro Makrophagen handelt. Dieser Zustand entspricht nicht zwingend der räumlichen Füllung des Makrophagen mit Myelin.

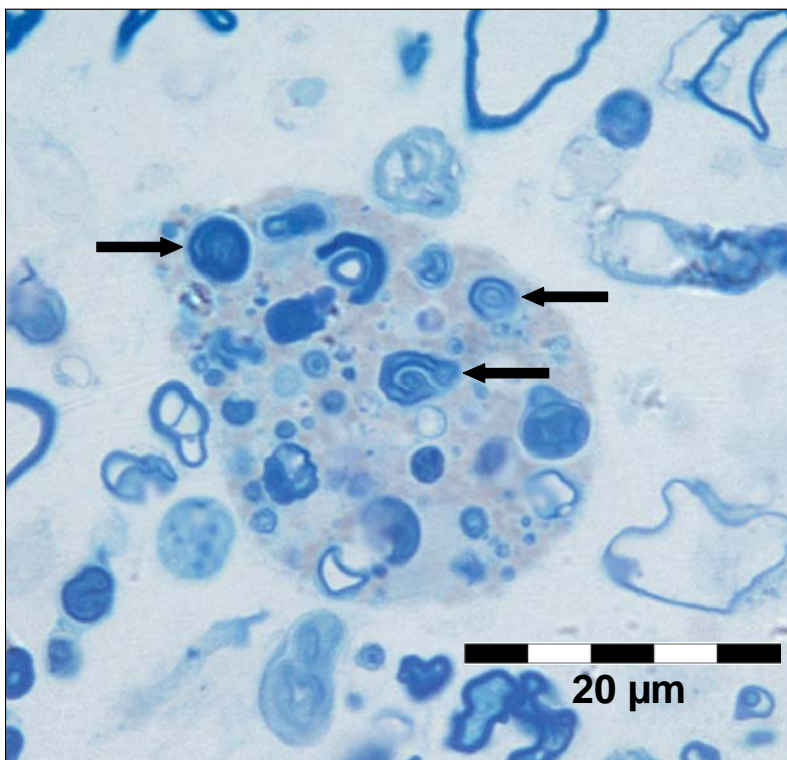


Abbildung 5: Makrophage im Semi-Dünn-Schnitt

Die Abbildung zeigt einen Makrophagen im 1 µm dünnen Semi-Dünn-Schnitt bei 1000facher Vergrößerung. Die schwarzen Pfeile zeigen auf das vom Makrophagen internalisierte Myelin. Die graue Körnung im Zytoplasma entsteht durch Lipide. Sie sind Produkte der Verdauung von Myelin.

Im Verlauf über 2, 5 und 10 Tage ändert sich die Myelinbeladung der Makrophagen (vgl. Abb.6). In den Nn. ischiadici mit kokultivierten Makrophagen beginnt sie mit $24 \pm 3\%$ nach 2 Tagen. Nach 5 Tagen sind $42 \pm 2\%$ der Fläche des Zytoplasmas der Makrophagen mit Myelin beladen und nach 10 Tagen $37 \pm 2\%$. Gleichwertig dazu ist die Myelinbeladung der residenten Makrophagen für den Zeitpunkt nach 2 und 10 Tagen mit $21 \pm 3\%$ und $37 \pm 2\%$. Allein nach 5 Tagen ist die Myelinbeladung residenter Makrophagen mit $25 \pm 4\%$ signifikant geringer ($p < 0,0001$) im Vergleich zu den $42 \pm 2\%$ der Peritonealmakrophagen. Die Myelinbeladung der residenten Makrophagen steigt ebenfalls im Verlauf der Zeit an. Die Myelinbeladung nach 2 und 5 Tagen ($21 \pm 3\%$ und $25 \pm 4\%$) ist vergleichbar aber signifikant geringer ($p = 0,0072$) als nach 10 Tagen ($37 \pm 2\%$).

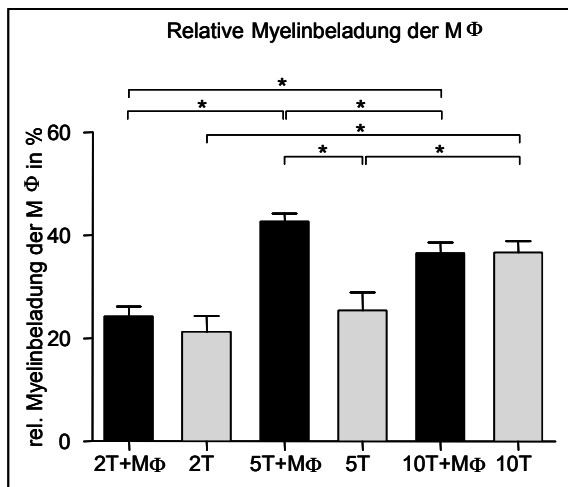


Abbildung 6: Relative Myelinbeladung der Makrophagen

Zu sehen ist die prozentuale Myelinbeladung nicht-residenter Makrophagen (schwarze Säulen) oder residenter Makrophagen (graue Säulen) an verschiedenen Tagen. Die Myelinbeladung wurde ermittelt als Quotient aus der Anzahl der Gitterschnittpunkte über Myelindebris und der Gesamtanzahl an Gitterschnittpunkten auf der Makrophagenfläche (Gitter von $3 \times 3 \mu\text{m}$).

Balken geben das arithmetische Mittel an, die T-Linien den SEM. * = statistisch signifikant ($p \leq 0,05$).

Im Verlauf der Zeit nimmt die relative Größe der mit Thioglycollat stimulierten Makrophagen stetig zu (vgl. Abb.7). Sie beträgt nach 2 Tagen 10 ± 1 Einheiten, erhöht sich nach 5 Tagen signifikant ($p < 0,0001$) auf 25 ± 2 und steigt nach 10 Tagen nochmals signifikant an ($p < 0,0001$) auf 40 ± 3 Einheiten. Die relative Größe der residenten Makrophagen ändert sich während der 2, 5 und 10 Tage nicht signifikant (8 ± 1 , 11 ± 2 , 14 ± 1 Einheiten). Die Peritonealmakrophagen waren zu jedem Zeitpunkt signifikant größer als die residenten Makrophagen. Vergleiche 10 ± 1 mit 7 ± 1 ($p = 0,0276$) nach 2 Tagen. 25 ± 2 und 11 ± 2 ($p < 0,0001$) nach 5 Tagen. 40 ± 3 mit 14 ± 1 ($p < 0,0001$) nach 10 Tagen.

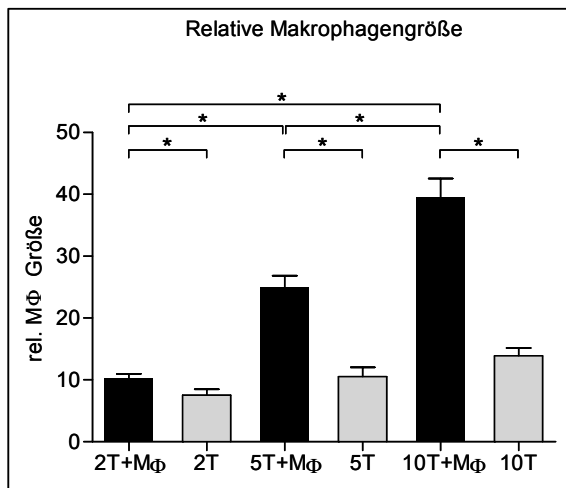


Abbildung 7: Relative Makrophagengröße

Die Abbildung zeigt die relative Makrophagengröße an verschiedenen Tagen mit nicht-residenten Makrophagen (schwarze Säulen) oder mit residenten Makrophagen (graue Säulen). Die Größe wurde ermittelt als Anzahl der Gitterschnittpunkte auf der Makrophagenfläche (Gitter von $3 \times 3 \mu\text{m}$). Eine Einheit entspricht einem Schnittpunkt. Deutlich zu erkennen ist die steigende Größe der Peritonealmakrophagen im Laufe der Zeit und deren signifikanter Größenunterschied zu den residenten Makrophagen.

Balken geben das arithmetische Mittel an, die T-Linien den SEM. * = statistisch signifikant ($p \leq 0,05$).

Kombiniert man die Aussagen aus Abb.6 mit denen aus Abb.7, so lässt sich folgende Aussage treffen, die für die migrierten Peritonealmakrophagen gilt: Sowohl deren relative Größe, als auch deren Myelinbeladung nehmen zu. Das bedeutet eine doppelte Beeinflussung der Steigerung der Myelinaufnahme.

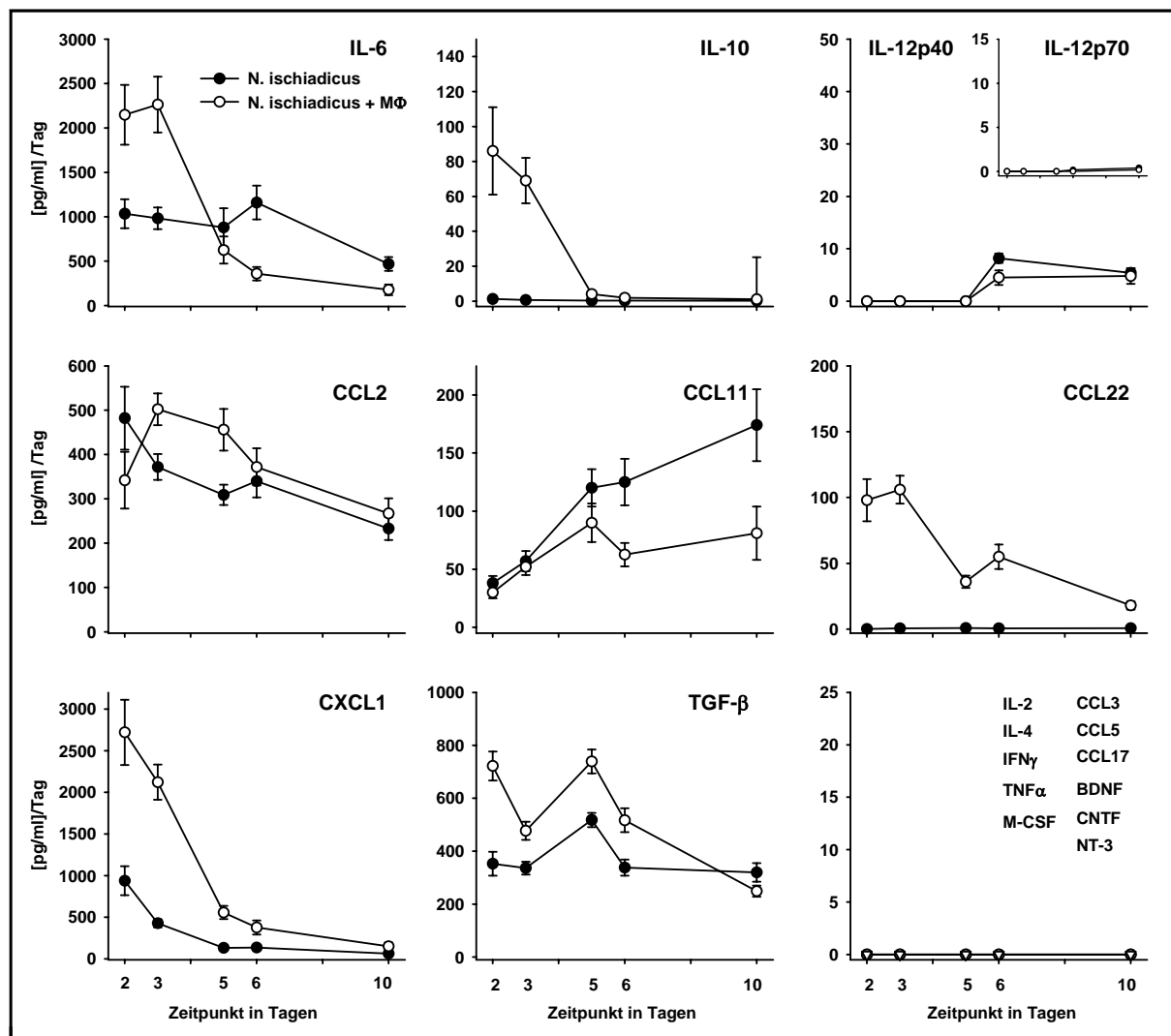
Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Peritonealmakrophagen das Vierfache an Myelin phagozytierten im Vergleich zu den residenten Makrophagen.

3.4 Produzierte Zytokine

Die gesammelten Überstände des Mediums aus den Nervenkulturen wurden mittels ELISA auf produzierte Zytokine und Chemokine untersucht. Die Zytokine IL-6, IL-10, IL-12p40, IL-12p70, CCL2, CCL11, CCL22, CXCL1, TGF- β wurden in den Medien nachgewiesen. Hierbei fielen IL-6 und CXCL1 durch ihre besonders hohen Konzentrationen bereits nach 2 Tagen auf. In den Kulturen von *N. ischiadicus* mit Peritonealmakrophagen betrug die messbaren Konzentrationen für IL-6 2148 ± 337 pg/ml und für CXCL1 2720 ± 392 pg/ml jeweils an den ersten beiden Tagen. Nicht nachzuweisen waren die Zytokine IL-2, IL-4, IFN- γ , TNF- α , M-CSF, CCL3, CCL5, CCL17, BDNF, CNTF und NT-3 (vgl. Abb.8).

Abbildung 8: Freigesetzte Zytokine

Die Abbildung beschreibt die Entwicklung der Konzentrationen der Zytokine in [pg/ml] in den Nervenmedien über die Dauer der Nervenkultur. Die Kurve mit den ungefüllten Kreisen beschreibt den Verlauf für den *N. ischiadicus* mit Kokultur von Peritonealmakrophagen. Die Kurve mit den gefüllten Kreisen beschreibt die Entwicklung in reiner *N. ischiadicus*-Kultur.



IL-10 und CCL22 wurden ausschließlich in den Medien gemessen, die Nerv und Peritonealmakrophagen enthielten. Daher kommen nur diese Zellen als deren Produzenten in Frage. In den Kulturen ohne Makrophagenzugabe wurden die Zytokine von den residenten Gewebszellen wie Schwann-Zellen, residenten Makrophagen und Fibroblasten produziert. Die Identifikation der Zellen, die an der Freisetzung der hier beschriebenen Zytokine beteiligt sind, lag außerhalb der Betrachtungen unserer Untersuchungen.

3.5 Makrophageninvasion nach Manipulation des IL-6-Signals

Aufgrund der frühen hohen Konzentration von IL-6 in den Medien und seiner bedeutenden sowie umfangreich dokumentierten Einflüsse auf Nervengewebe (Hirota et al. 1996, Bolin et al. 1995, Reichert et al. 1996, Gadiant und Otten 1997, Bourde et al. 1996, Rodriguez et al. 1994, Tilg et al. 1994) wurde IL-6 ausgewählt, um blockiert zu werden.

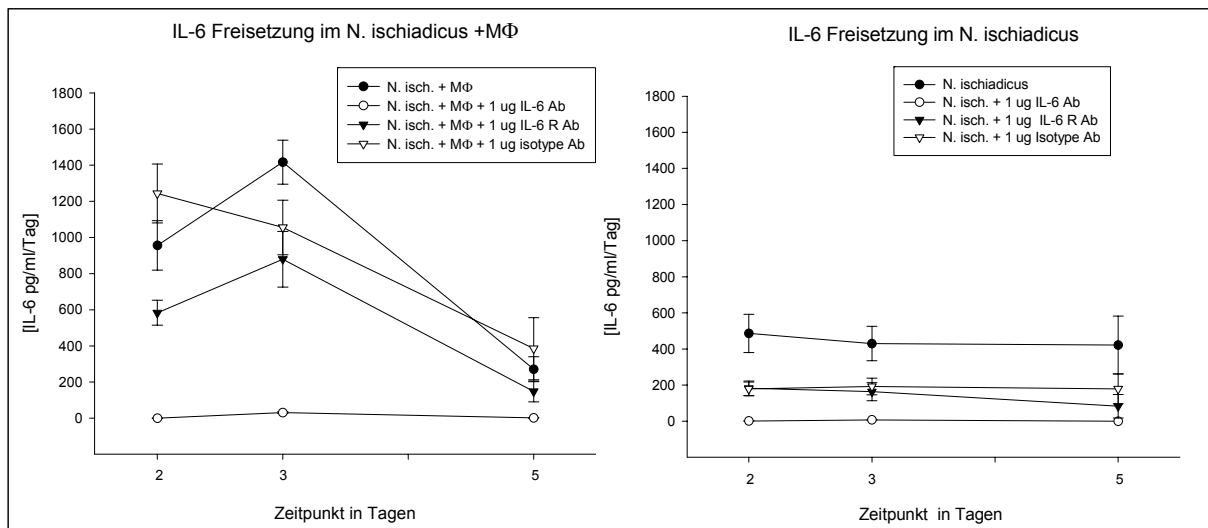
Das IL-6 Signal wurde manipuliert, um dessen Effekt auf die Makrophagenaktivität untersuchen zu können. Die Konzentrationen der IL-6-Antikörper (aIL-6) in den Nervenmedien betragen 0,01 , 0,1 und 1 µg/ml. Es wurden auch Versuche durchgeführt, in denen Antikörper gegen den auf der Makrophagenmembran lokalisierten IL-6-Rezeptor (aIL-6R) appliziert wurden, um so das IL-6-Signal zu stören. Dieser Versuch wurde mit einer Konzentration von 1 µg/ml aIL-6R vorgenommen. In selbiger Versuchsreihe wurde eine Isotypkontrolle durchgeführt. Die Konzentration des Isotypantikörpers im Medium betrug 1 µg/ml. Bei der Isotypkontrolle sind alle Versuchsbedingungen identisch, nur der ganz entscheidende Parameter ändert sich: Das bindende Epitop des aIL-6R ist beim Antikörper gleichen Isotyps anders. Es vermag nicht, an den IL-6-Rezeptor zu binden. Die Isotypkontrolle beweist, dass Veränderungen in der Makrophagenaktivität ausschließlich aufgrund des IL-6R-spezifischen aIL-6R-Antikörpers resultieren. Die hier angewandte Isotypkontrolle ergab in keinem Fall signifikante Abweichungen vom unveränderten System.

Freies IL-6 im Medium ließ sich erfolgreich neutralisieren (vgl. Abb.9). Zur Kontrolle wurden ELISA-Untersuchungen auf IL-6 in den Nährmedien der Nerven durchgeführt. Signifikante Mengen von IL-6 konnten nach Applikation von IL-6-Antikörpern nicht mehr nachgewiesen werden. Werte von $1,1 \pm 0,7$, $7 \pm 3,4$ und 0 ± 0 pg/ml nach 2, 3 und 5 Tagen sind der Beweis für die Neutralisierung und Ausfällung des IL-6 durch die IL-6-Antikörper. Im Gegensatz dazu konnte beim Block des IL-6 Rezeptors auf der Makrophagenmembran mit aIL-6R freies IL-6 in den Nährmedien gemessen werden bei niedrigerer Gesamtkonzentration in Nervenkulturen mit ausschließlich residenten Makrophagen. Auch in den erprobten Isotypkontrollen der IL-6-Rezeptor-Manipulation wurde freies IL-6 gemessen. Auffällig ist der quantitative Vergleich der IL-6-Produktion von Peritonealmakrophagen auf der einen Seite und residenten Makrophagen auf der anderen Seite. Letztere produzierten an Tag 2 und 3 nur halb so viel IL-6 wie die eingewanderten Peritonealmakrophagen im selben Zeitraum. Interessanterweise produzierten beide Makrophagenpopulationen vergleichbare Mengen IL-6 nach 5 Tagen in Kultur.

Abbildung 9: IL-6-Freisetzung

Die Abbildung zeigt die IL-6-Konzentration im Medium in [pg/ml] nach 2, 3 und 5 Tagen.

Die Neutralisierung des IL-6 verlief erfolgreich, wie an der Gerade mit dem Symbol des ungefüllten Kreises zu sehen ist.



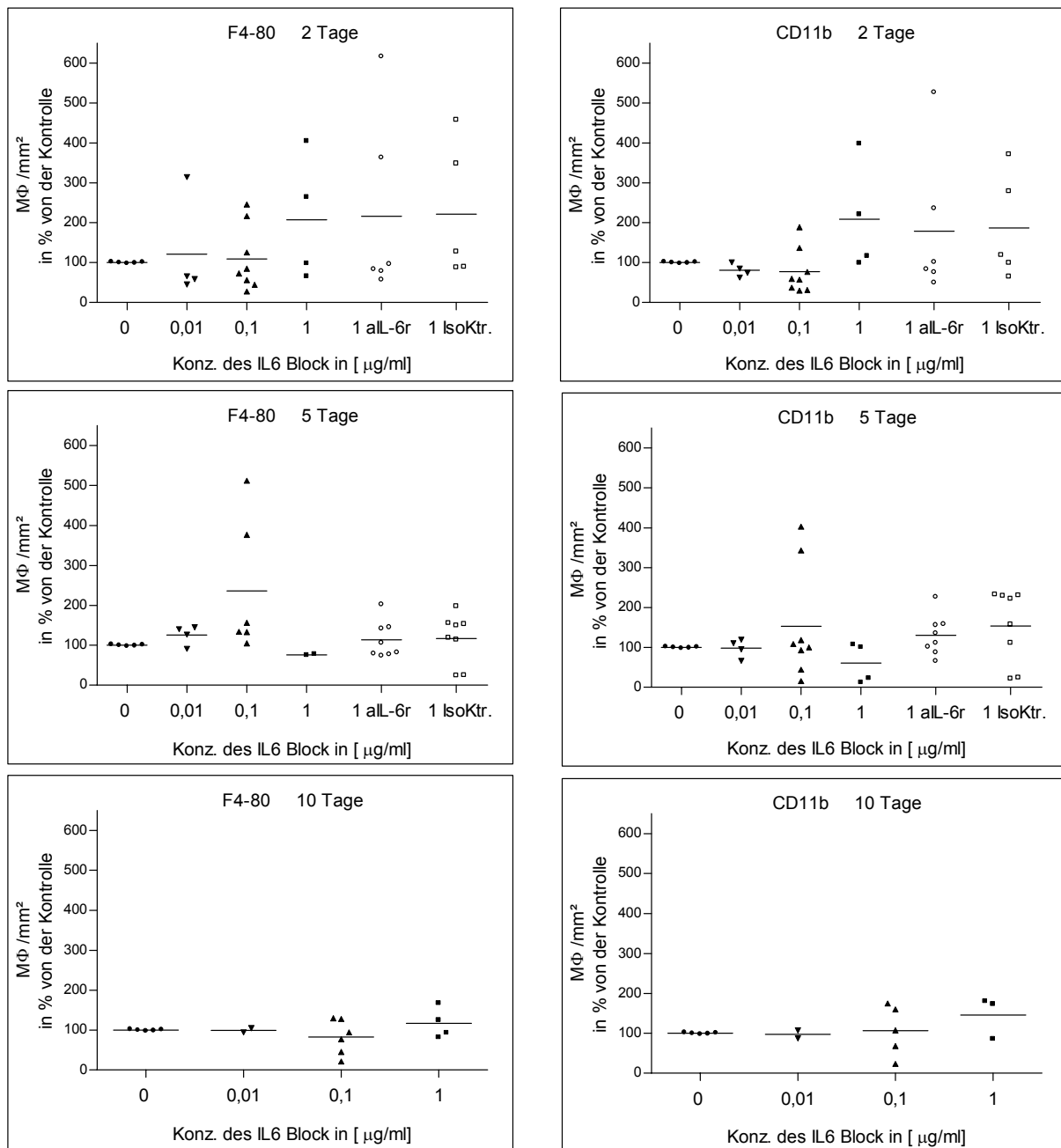
Für die Darstellung der Makrophagendichten bei unterschiedlichen IL-6-Block-Konzentrationen wurden nur die Marker F4/80, CD11b, CD204 und CD16/32 ausgewählt. CD54 eignete sich nicht dafür, weil nur eine Subpopulation der aktivierten Makrophagen CD54 auf der Oberfläche präsentiert. Die Antigen präsentierenden MHC-II-positiven Makrophagen waren zu wenige, als dass sie einem Vergleich der Makrophagendichte bei unterschiedlichen Konzentrationen von IL-6-Block dienlich gewesen wären (vgl. Tab.1). Dementsprechend schwach war ihre Färbung (vgl. Abb.4). Dieses gilt gleichermaßen für die Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86.

Die gemessenen Makrophagendichten nach Blockade des IL-6-Signals wurden in prozentuale Relation zu ihrer Kontrollgruppe gesetzt. Ein Vergleich absoluter Werte lieferte aufgrund der Varianz zwischen verschiedenen Individuen wenig verlässliche Werte. Andererseits ließ das limitierte Angebot an Nervengewebe pro Individuum keine andere Alternative zu, als mehrere verschiedene Mäuse für die umfangreichen Untersuchungen zu verwenden. Pro Individuum konnten somit maximal 2 von den angegebenen Konzentrationen (0,01 , 0,1 und 1 µg/ml aIL-6 bzw. 1 µg/ml aIL-6R oder Isotypkontrolle) plus Kontrolle an ein und derselben Maus untersucht werden. Um diese Ergebnisse mit denen anderer getesteter Konzentrationen an anderen Mäusen vergleichen zu können, wurden die Ergebnisse in prozentuale Relation zu ihrer eigenen Kontrollgruppe gesetzt.

Für die F4/80⁺ und CD11b⁺ Makrophagen waren keine signifikanten Differenzen der Makrophagendichte zwischen der Kontrollgruppe und den IL-6-Blockierungen zu beobachten, weder in den Nerven mit Peritonealmakrophagen, noch in den reinen Nervenkulturen. Dies gilt für alle drei Zeitpunkte nach 2, 5 und 10 Tagen (vgl. Abb. 10).

Abbildung 10: Makrophageninvasion bei Blockade des IL-6-Signals

Die Makrophagendichten unter Blockade des IL-6-Signals wurden in prozentuale Relation zu ihrer Kontrollgruppe gesetzt. Es ergeben sich keine signifikanten Unterschiede in der Makrophagendichte zwischen der Kontrollgruppe und den IL-6-Modifikationen.

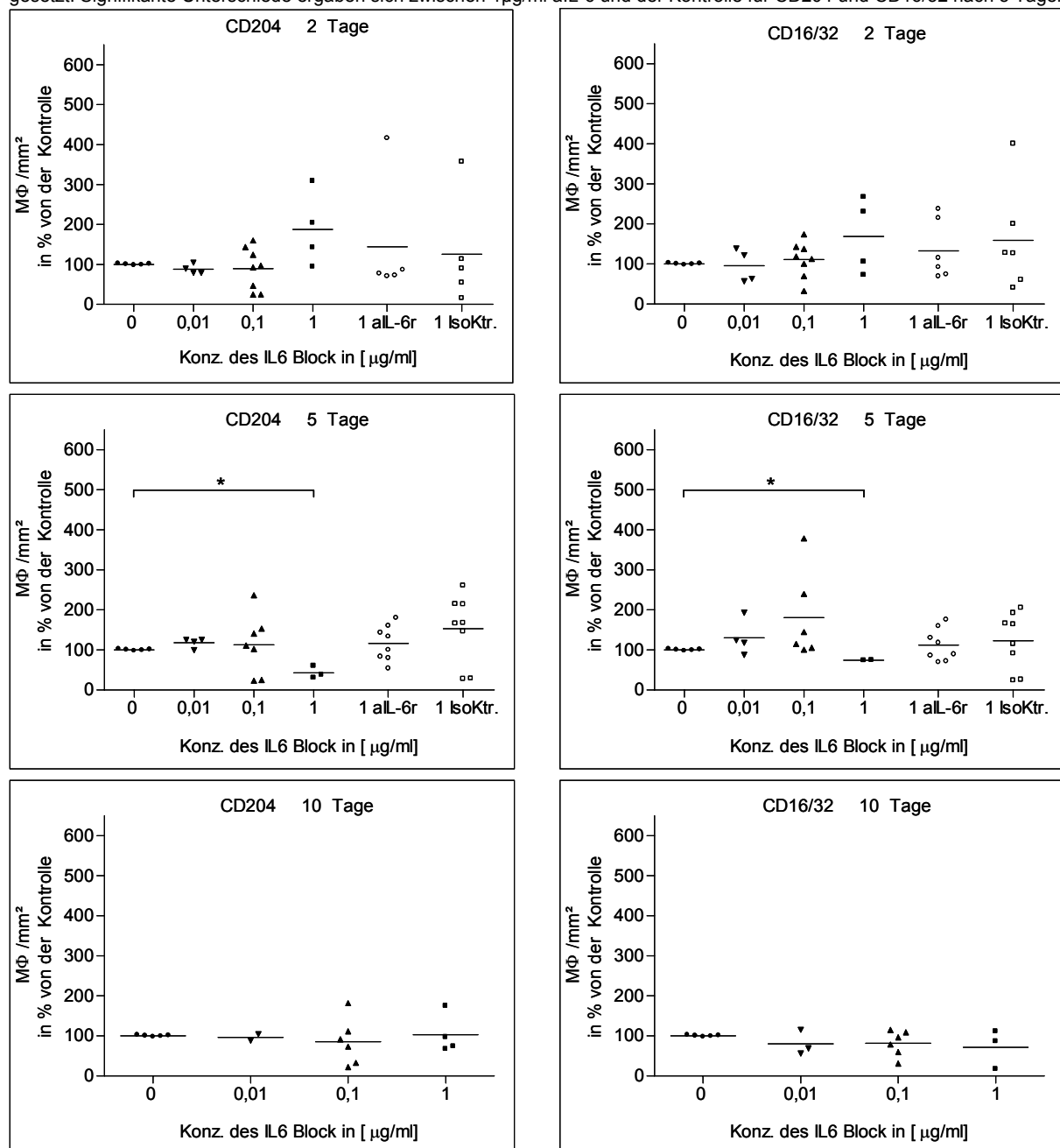


Horizontale Balken geben das arithmetische Mittel an; * = statistisch signifikant (p ≤ 0,05). Jeder Punktwert ist das arithmetische Mittel aus bis zu 8 Schnitten.

Die Veränderung der Makrophageninvasion nach Gabe von 1 µg/ml anti-IL-6-Antikörper war signifikant sichtbar in der CD204-Färbung nach 5 Tagen mit einer relativen Makrophagendichte von $32 \pm 12\%$ von der Makrophagendichte der Kontrollen. Derselbe signifikante Unterschied wurde bei CD16/32 nach 5 Tagen festgestellt. Die relative Makrophagendichte betrug hier $74 \pm 1\%$ von der Kontrollgruppe (vgl. Abb.11). Allerdings ist aufgrund der hier kleinen N die Aussagekraft der Signifikanz fragwürdig.

Abbildung 11: Makrophageninvasion bei Blockade des IL-6-Signals

Die Makrophagendichten unter Blockade des IL-6-Signals wurden in prozentuale Relation zu ihrer eigenen Kontrollgruppe gesetzt. Signifikante Unterschiede ergaben sich zwischen 1µg/ml aIL-6 und der Kontrolle für CD204 und CD16/32 nach 5 Tagen.



Horizontale Balken geben das arithmetische Mittel an; *= statistisch signifikant ($p \leq 0,05$). Jeder Punktwert ist das arithmetische Mittel aus bis zu 8 Schnitten.

Zusammenfassend lässt sich folgendes sagen:

Der Aktivierungsstatus und die migratorische Aktivität der peritonealen Makrophagen schienen nicht direkt durch IL-6 beeinflusst zu sein. Die Dynamik unseres Modells mag möglicherweise leicht verändert sein, wie an den Markern für CD204 und CD16/32 nach 5 Tagen zu sehen ist (Abb.11). Ansonsten waren die Nervenbeschädigung und die einwandernden Makrophagen in den verschiedenen Milieus vergleichbar.

3.6 Myelinbeladung nach Manipulation des IL-6-Signals

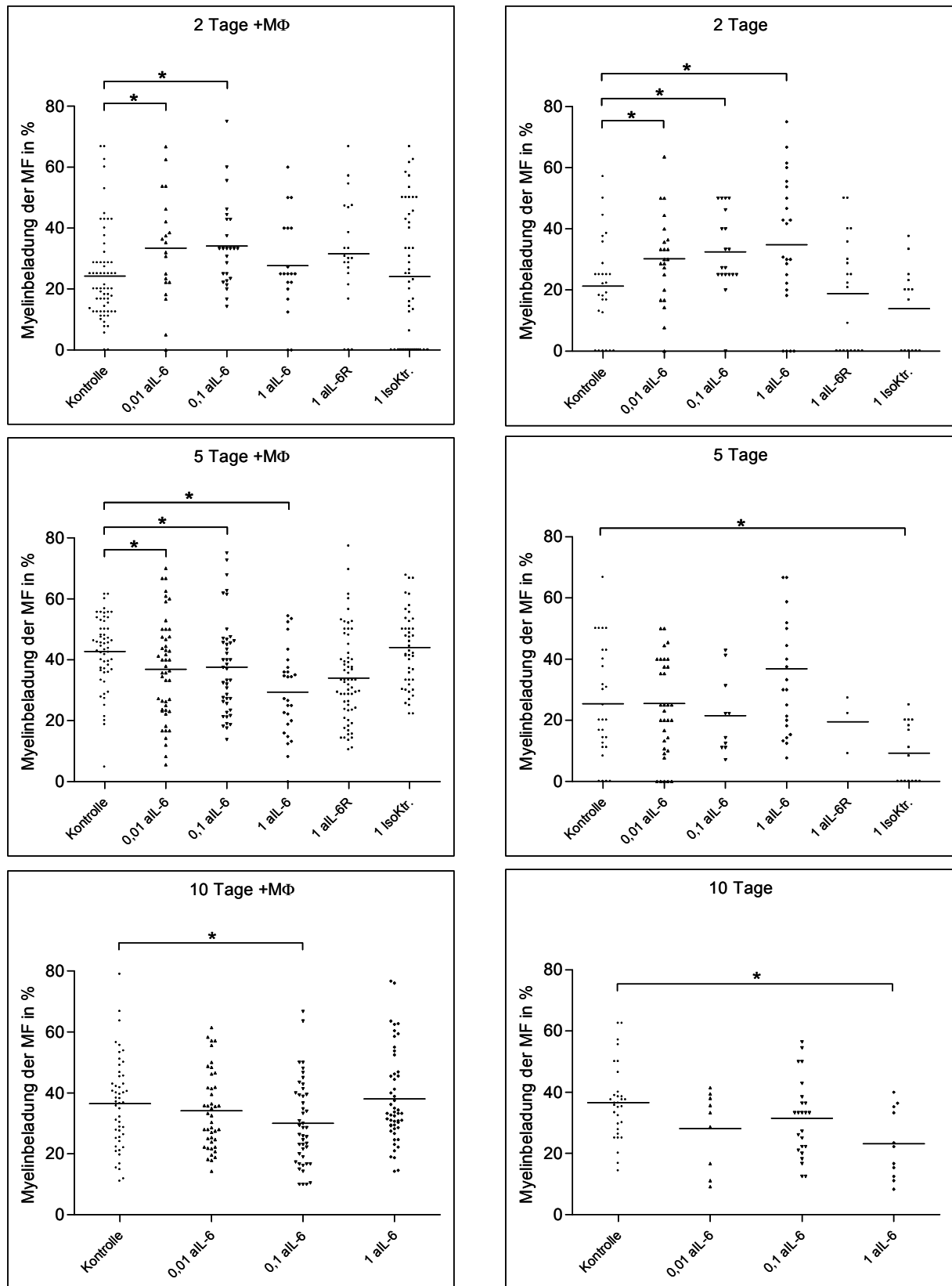
Betrachtet man vergleichend die verschiedenen Konzentrationen und Arten des IL-6-Block, so lässt sich zusammenfassend formulieren, dass die Myelinbeladung zwischen den verschiedenen Gruppen nach 2, 5 und 10 Tagen gleich war.

Es zeigen sich zwar stellenweise signifikante Unterschiede in der Myelinbeladung zwischen unveränderter Kontrollgruppe und IL-6-manipulierten Versuchsgruppen. Allerdings besitzen diese Unterschiede gegensätzliche Tendenzen. Die Myelinbeladung der Peritonealmakrophagen nach 2 Tagen betrug in der Kontrolle $24 \pm 2\%$. Im Vergleich dazu war die Myelinbeladung mit $33 \pm 4\%$ bei der Anwendung von $0,01 \mu\text{g/ml}$ aIL-6 signifikant höher ($p=0,0264$). Die Myelinbeladung der Peritonealmakrophagen betrug in der Kontrolle $43 \pm 2\%$ nach 5 Tagen gegenüber einer signifikant kleineren ($p=0,0371$) Myelinbeladung von $37 \pm 2\%$ nach Anwendung von $0,01 \mu\text{g/ml}$ aIL-6.

Alle anderen signifikanten Differenzen liegen innerhalb der biologischen Streuung oder ließen sich nur zu vereinzelt Zeitpunkten nachweisen, was keine Rückschlüsse auf einen generellen Trend zuließ.

Abbildung 12: Prozentuale Myelinbeladung der Makrophagen.

Zu sehen ist die prozentuale Myelinbeladung der Makrophagen in Abhängigkeit von der Art und Konzentration des IL-6-Antikörpers in [µg/ml]. Linke Spalte N. ischiadicus mit Peritonealmakrophagen an 2, 5 und 10 Tagen. Rechte Spalte reine Kultur des N. ischiadicus an denselben Tagen.



Horizontale Balken geben das arithmetische Mittel an; * = statistisch signifikant (p ≤ 0,05).

4. Diskussion

Die Makrophagen verrichten die Hauptarbeit bei der Myelinphagozytose. Die Oberflächenproteine F4/80, CD11b, CD204 und CD16/32 werden von den Makrophagen exprimiert und sind dabei an der Myelinphagozytose beteiligt. Ein Zusammenhang zwischen Myelinphagozytose und Expression kostimulatorischer Moleküle wie CD80 und CD86 lässt sich nicht vermuten. Nicht residente, peritoneale Makrophagen sind aktiver beteiligt an der Myelinphagozytose als residente. Hierbei zeigt das Zytokin IL-6 weder Einflüsse auf das Migrationsverhalten der Makrophagen noch auf deren Phagozytoseaktivität.

4.1 Expression von Oberflächenrezeptoren durch Makrophagen und deren Beteiligung an der Myelinphagozytose

Die Expression von F4/80 auf der Makrophagenmembran findet außerhalb der Immunantwort auch physiologischerweise statt. Anhand von F4/80 lassen sich immunhistochemisch Zellen des MPS identifizieren. Nur bei wenigen Populationen wie den Alveolarmakrophagen der Lunge, den Makrophagen lymphatischer Gewebe und den fötalen Makrophagen gelingt das nicht, weil diese Makrophagen kein F4/80 exprimieren (Austyn und Gordon 1981).

Makrophagen exprimieren eine Vielzahl von Rezeptoren auf ihrer Oberfläche, die ihnen erlauben, mit verschiedenen Partnern zu interagieren (Gordon et al. 1988). Die wichtigsten Rezeptoren bei der Myelinphagozytose sind die Fc-Rezeptoren (CD16/32), der *scavenger*-Rezeptor (CD204) und der Komplementrezeptor 3 (CR3 oder Mac1), der aus zwei Untereinheiten besteht; α_M (CD11b) und β_2 (CD18). Unsere Versuche bestätigten die Expression dieser Oberflächenmoleküle vielfach (vgl. Abschn.3.2 und Abb.3).

CR3 ist an der Phagozytose opsonisierten Materials beteiligt (Brück und Friede 1990, Brück und Friede 1991, Reichert und Rotshenker 2003, Rotshenker 2003). Aber auch nicht opsonisiertes Myelin wird CR3 vermittelt internalisiert (Brück und Friede 1991, Brück und Friede 1990, van der Laan et al. 1996). Sowohl in *in-vivo*-Untersuchungen an Mäusen als

auch in *in-vitro*-Kokulturen von Nervensegmenten mit Makrophagen konnte bestätigt werden, dass die Blockade des CR3 zu einer deutlichen Reduktion der Myelinphagozytose im PNS führt (Brück und Friede 1991, Brück et al. 1995a). REICHERT und Kollegen zeigten ebenfalls, dass sich *in vitro* die Myelinphagozytose von mit Thioglycollat stimulierten Makrophagen durch CR3 Antikörper reduzieren lässt (Reichert et al. 2001). Die Blockade des CR3 trägt *in vivo* zur Verringerung der klinischen Symptomatik der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE), einem Tiermodell der Multiplen Sklerose, bei (Huitinga et al. 1993).

Mit den Fc-Rezeptoren interagieren verschiedene Subtypen von Immunglobulinen. CD16 (Fc γ RIII) und CD32 (Fc γ RII) binden vor allem an IgG. Die Applikation von Immunglobulinen fördert die Myelinphagozytose (Kuhlmann und Brück 1999), wie an Zellkulturen der Maus demonstriert werden konnte. Die Abwesenheit von Immunglobulinen scheint die Myelinphagozytose nicht zu beeinträchtigen (Hann et al. 1988). Daraus lässt sich der Schluss ziehen, dass die Anwesenheit von Immunglobulinen die Myelinphagozytose begünstigt, dafür aber nicht erforderlich ist.

Das CD204, der *scavenger*-Rezeptor, ist ein membranständiges Glykoprotein. Eine Blockade dieses Rezeptors hat in Nerv-Makrophagen-Kokulturen eine dosisabhängig verminderte Makrophageninvasion und Myelinphagozytose zur Folge (da Costa et al. 1997).

Das CD54 (intrazelluläres Adhäsionsmolekül 1, ICAM-1) gehört zur Immunglobulin Super-Familie der Adhäsionsmoleküle (Springer 1990) und ist auf der Oberfläche der Makrophagen lokalisiert (Patarroyo 1994). Bereits hämatogene Monozyten exprimieren CD54 (Most et al. 1992), was im Verlauf der Differenzierung zu Gewebsmakrophagen zunimmt (Prieto et al. 1994). Möglicherweise spielt CD54 eine Rolle bei der transepithelialen Migration der Makrophagen durch das Perineurium (Cramer 1992). CD54 spielt eine wichtige Rolle bei der Antigenpräsentation und der Interaktion zwischen Makrophagen und T-Zellen (Springer 1990). Die Interaktion zwischen CD54 und dem *lymphocyte function antigen 1* (LFA-1) sowie mit dem CR3 ist bekannt (Rothlein et al. 1986). Mehrere Arbeiten demonstrieren die Beteiligung der Adhäsionsmoleküle an pathologischen und immunologischen Prozessen des ZNS und PNS (Springer 1990, Soriano et al. 1996, Greenwood et al. 1995). Fehlt ICAM, wie in CD54-defizienten Mäusen, so resultiert eine verminderte Einwanderung der Makrophagen in den Nerven (Vougioukas et al. 1998) und infolgedessen eine reduzierte Myelinphagozytose

(Vougioukas et al. 2000). Aufgrund unserer Ergebnisse erscheint es so, als ob nur Subpopulationen der Makrophagen CD54 exprimieren (vgl. Abschn. 3.2). Die Gesamtzahl aller Makrophagen im Gewebe wurde mittels der vier oben genannten generellen Makrophagenmarker determiniert. Die Anzahlen der F4/80-, CD11b-, CD204- und CD16/32-positiven Zellen präsentierten sich außerordentlich homogen. Der Anteil CD54⁺ Zellen an der Gesamtanzahl der Makrophagen betrug 48, 40 und 29% nach 2, 5 und 10 Tagen, was eine verringerte Expression von CD54 in den invadierenden Makrophagen nahe legt. Trotz einer geringeren absoluten Anzahl an residenten Makrophagen -gemessen in reinen N. ischiadicus-Kulturen- ist der Anteil CD54-positiver Zellen mit 100% nach 2 und 70% nach 10 Tagen höher (vgl. Tab.1). Das legt die Vermutung nahe, dass eine Hoch-Regulation dieses Adhäsionsmoleküls in beiden Makrophagenpopulationen zu einem frühen Zeitpunkt relevant sein könnte.

4.2 Expression kostimulatorischer Moleküle durch Makrophagen

Mehrere Autoren berichteten über die Expression von MHC-II-Molekülen auf Makrophagen im ZNS (Perry 1998) und PNS (Stevens et al. 1989). Wir konnten mit unseren Versuchen ebenfalls die MHC-II-Expression im PNS von Mäusen bestätigen. Allerdings sei darauf hingewiesen, dass es sich dabei nur um sehr schwache Immunreaktivitäten handelte im Vergleich zu denen von CD11b⁺ oder F4/80⁺ Zellen (vgl. Abschn. 3.2. und Tab.1).

In unserer Arbeit lässt sich kein proportionaler Zusammenhang zwischen Myelinphagozytose und der Expression kostimulatorischer Moleküle vermuten. Wir konnten zeigen, dass die Anzahl der CD80⁺ und CD86⁺ Makrophagen zu Beginn der Makrophageninvasion nach 2 Tagen niedrig ist und es auch selbst nach 10 Tagen bleibt (vgl. Abschn. 3.2). Ein Zeitpunkt zu dem die Makrophagen hingegen eine sehr hohe Phagozytoseaktivität zeigen (vgl. Abschn. 3.5).

Für die Auslösung einer Immunantwort reicht die Expression von MHC-II-Molekülen allein nicht aus. Zusätzliche kostimulatorische Faktoren sind CD80 und CD86 (Greenfield et al. 1998). Die Wechselwirkung zwischen CD80 bzw. CD86 und ihrem Rezeptor auf der T-Lymphozytenmembran, dem CD28, entscheidet über das Ausmaß der Immunantwort. Bei

entzündlichen demyelinisierenden Erkrankungen des humanen PNS kommt es zu einer vermehrten Expression von CD80. CD86 wird hierbei nur schwach exprimiert (Kiefer et al. 2000). In humanen MS-Läsionen ist CD80 hochreguliert. Bei der EAE unterbindet eine Therapie mit CD80-Antikörpern die Symptomatik. Antikörper gegen CD86 zeigen hier keinen Effekt (Miller et al. 1995, Perrin PJ et al. 1996, Vanderlugt et al. 1997).

4.3 Die Rolle der Makrophagen beim Myelinabbau

Dass die Makrophagen eine zentrale Rolle bei der Myelinentfernung übernehmen, ist heute unumstritten (Brück 1997).

Makrophagen und Mikroglia spielen eine wesentliche Rolle bei der Myelinphagozytose im ZNS und PNS. Im Rahmen von entzündlichen Erkrankungen wie Multipler Sklerose und dem Guillain-Barré-Syndrom kommt es zu einer Destruktion der Myelinscheiden und deren Phagozytose durch Makrophagen und Mikroglia (Benveniste 1997, Kiefer et al. 2001, Bauer et al. 1995).

In frühen Beobachtungen wurden die einwandernden Zellen rein morphologisch als Makrophagen identifiziert (Gibson 1979, Schubert und Friede 1981). Wann immer sich das PNS entzündet oder traumatisiert wird, wandert eine große Anzahl hämatogener Makrophagen in den Nerven ein (Hartung et al. 1988, Griffin et al. 1992). Unsere Untersuchungen bestätigen, dass die Makrophagen den N. ischiadicus infiltrieren (vgl. Abschn. 3.2) und Myelin phagozytieren (vgl. Abschn. 3.3 und Abb.5).

In Abwesenheit von Makrophagen findet kein Myelinabbau statt (Beuche und Friede 1984, Scheidt et al. 1986). Eine nicht spezifische Depletion der Makrophagenpopulation mittels Silikastaub führte zu einer Verzögerung des Myelinabbaus (Beuche und Friede 1986, Muller und Minwegen 1987). Ein angewandtes Verfahren zur selektiven Zerstörung von Makrophagen *in vivo* ist die intravenöse Injektion von Dichloromethylen-Diphosphonat(Cl_2MDP)-haltigen Liposomen (Huitinga et al. 1992, van Rooijen et al. 1990, van Rooijen und Sanders 1994, van Rooijen 1989). Bei diesen *in-vivo*-Versuchen lief die

Wallersche Degeneration in Abwesenheit von hämatogenen Makrophagen ab. Die residenten Makrophagen blieben intakt, weil Cl₂MDP-haltige Liposomen nicht zur Passage der Blut-Nerv-Schranke befähigt sind. Dadurch gelang eine signifikante Reduktion des monozytischen Myelinabbaus (Brück et al. 1996, Jung et al. 1993). Weitere interessante Untersuchungen zeigten, dass die Eliminierung oder Deaktivierung der Makrophagen den Ausbruch der EAE verzögern (Huitinga et al. 1990, Martiney et al. 1998). Ähnliche Ergebnisse wurden durch Radiatio bedingte Makrophagenreduktion erzielt (Perry et al. 1995). Ein weiteres Modell zur Definierung der Rolle von Makrophagen beim Myelinabbau liefern die Ola-Mäuse. Bei diesem Mäusestamm ist die Makrophagenmigration eingeschränkt. In diesen Tieren vollzieht sich die Nervendegeneration sehr langsam (Lunn et al. 1989).

Diese Sachverhalte legen nahe, dass für einen Myelinabbau Makrophagen vorhanden sein müssen. Makrophagen sind aber nicht nur für den Myelinabbau zuständig, sondern sie sind auch an der Nervenregeneration maßgeblich beteiligt (Griffin und Hoffmann 1993), denn der Myelinabbau per se ist gleichermaßen *conditio sine qua non* für die Nervenregeneration (Reichert et al. 2001).

4.4 Nicht-residente Makrophagen sind viel aktiver beteiligt an der Myelinphagozytose als residente Makrophagen

Im PNS finden sich residente Makrophagen, wie 1977 erstmalig demonstriert wurde (Arvidson 1977). Davon ist ein beachtenswerter Anteil im Endoneurium lokalisiert (Griffin et al. 1993). Die Beteiligung der residenten Makrophagen an der Myelinphagozytose ist bekannt, aber sehr gering (Stoll et al. 1989, Brück et al. 1996, Huitinga et al. 1990). Unsere Ergebnisse unterstreichen das. Sowohl die Myelinbeladung, als auch die Größe der peritonealen, nicht-residenten Makrophagen nahmen im Verlauf der 2, 5 und 10 Tage zu, während die residenten Makrophagen bei identischer Myelinbeladung nach 2 und 10 Tagen keinen annähernd vergleichbaren Größenzuwachs zeigten (vgl. Abschn. 3.3 und Abb.6 und Abb.7). Nach 5 Tagen ist die Dominanz der peritonealen Makrophagen an der Myelinphagozytose sogar noch deutlicher, aufgrund einer signifikant höheren Myelinbeladung ihres Zytoplasmas und der gleichzeitigen umfangreicheren Gesamtgröße. Zu

diesem Zeitpunkt beträgt die Myelinbeladung der Peritonealmakrophagen $43 \pm 2\%$ bei einer Größe von 25 ± 2 , verglichen mit einer Myelinbeladung der residenten Makrophagen von nur $25 \pm 4\%$ bei einer durchschnittlichen Größe von 11 ± 2 .

Es kann durchaus in Frage gestellt werden, ob die gesteigerte Aktivität der Peritonealmakrophagen gegenüber den residenten Makrophagen auf die Stimulation mit Thioglycollat zurückzuführen ist. Vorläufige Daten von *in-vitro*-Kulturen von Peritonealmakrophagen unterstützen nicht die Vermutung eines direkten Effekts der Thioglycollat-Stimulierung auf die Myelinphagozytose. Tatsächlich zeigt sich eine vergleichbare Myelinaufnahme in beiden Gruppen von Peritonealmakrophagen; solche die durch Thioglycollat stimuliert wurden und die der Kontrollgruppe (van Rossum et al. 2006).

4.5 Einflüsse von Zytokinen auf Makrophageninvasion und Myelinphagozytose

Die Aktivität der Makrophagen lässt sich durch Migrationsaktivität und Phagozytosekapazität beschreiben. Mit zunehmendem Wissen um die pleiotropen regulatorischen Funktionen von Zytokinen auf Wachstums- und Differenzierungsprozesse rückten auch zunehmend die Einflüsse von Zytokinen auf die Makrophagenaktivität in den Focus wissenschaftlichen Interesses. Hierzu wurde eine Vielzahl an Untersuchungen durchgeführt.

In *in-vivo*-Versuchen der Wallerschen Degeneration an TNF- α defizienten Mäusen fällt die Makrophageninvasion geringer aus und die Myelinphagozytose war dadurch verzögert. Jedoch war die Phagozytosekapazität der Makrophagen nicht beeinflusst durch die Abwesenheit von TNF- α und mit der von den Wildtyp-Mäusen vergleichbar (Liefner et al. 2000). Ohne TNF- α scheint folglich die Makrophageninvasion reduziert, nicht aber die Myelinaufnahmerate des einzelnen Makrophagen. Allerdings wird die Myelinphagozytose *in vitro* durch TNF- α reduziert. Dieser Effekt wird wahrscheinlich durch eine verminderte Expression des Komplementrezeptors CR3 hervorgerufen (Brück et al. 1992). Weitere Studien belegen die erhöhte Myelinphagozytoserate der Makrophagen unter dem Einfluss erhöhter Konzentrationen von TNF- α , IL-1 α und IL-1 β *in vitro* (Shamash et al. 2002).

In anderen Studien wurde der Einfluss von *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1), *macrophage inflammatory protein-1* (MIP-1) und IL-1 β auf die Myelinphagozytose im PNS untersucht. Im Rahmen der Wallerschen Degeneration wurden *in-vivo*-Antikörper in das distale Nervenende appliziert. Die Folge war eine Abnahme der Invasion hämatogener Makrophagen in den Nerv mit vermehrt intakt bleibenden Myelinhüllen. MCP-1 und IL-1 β Antikörper scheinen also die Rekrutierung der Makrophagen ins Nervengewebe zu reduzieren (Perrin FE et al. 2005). Dieselben Effekte erzielen MIP-1 α , MCP-1 und TNF- α auf das ZNS, wie mit Hilfe von Antikörpern gegen diese Zytokine nachgewiesen werden konnte (Ousman und David 2001).

In *in-vitro*-Studien wurden Makrophagenpopulationen -in Kokulturen mit Nerven gezüchtet-rekombinantem IFN- γ (rIFN- γ) ausgesetzt. Es konnte gezeigt werden, dass rIFN- γ die Makrophageninvasion stoppt. Die Myelinphagozytose bleibt unverändert (Brück und Friede 1989). In anderen Untersuchungen inhibierte IFN- γ die Phagozytoseaktivität von Makrophagen (Smith et al. 1998). Interessant wäre es, unter diesen Experimentbedingungen die Phagozytoserate mittels *fluorescence-activated-cell-sorting*(FACS)-Analyse zu messen, oder die Bestimmung der Produkte des Myelinabbaus mittels ELISA nachzuweisen, um die Regulation des Myelinmetabolismus besser zu verstehen.

Die Anwesenheit von IL-4 und IL-10, Zytokine die überwiegend als antiinflammatorisch beschrieben werden, verstärkt überraschenderweise die Myelinphagozytose durch Makrophagen in homogenen *in-vitro*-Kulturen. TGF- β und TNF- α hatten hier keinen Effekt auf die Phagozytoseaktivität (Smith et al. 1998).

Auch die Auswirkungen von TGF- β 2 auf Makrophageninvasion und Myeliningestion wurden in einem *in-vitro*-Modell der Wallerschen Degeneration untersucht. STOLL et al. fanden heraus, dass TGF- β 2 zu einer geringeren zytoplasmatischen Myelinbeladung in Makrophagen führt. Die Migration der Makrophagen in die Segmente des N. ischiadicus bleibt allerdings unbeeinflusst (Stoll et al. 2004).

4.6 Die Blockade des IL-6-Signals wirkt sich nicht auf die migratorische Aktivität der Makrophagen aus

Zahlreiche Veröffentlichungen legen die besonderen Einflüsse des IL-6 auf Nervengewebe dar. IL-6 vermag sowohl antiinflammatorische (Rodriguez et al. 1994, Tilg et al. 1994) als auch proinflammatorische Effekte (Baumann und Gauldie 1994, Fattori et al. 1994) auf das Nervensystem auszuüben. IL-6 beeinflusst direkt das Wachstum, Überleben und die Differenzierung peripherer und zentraler Neurone (Reichert et al. 1996). Die Mehrzahl der Autoren beschreibt überwiegend neuroprotektive Effekte des IL-6 (Gadient und Otten 1997). IL-6 wird im PNS als Antwort auf axonale Schädigungen produziert (Bourde et al. 1996, Hirota et al. 1996, Murphy et al. 1995) von Schwann-Zellen, Neuronen und residenten Makrophagen (Bolin et al. 1995). Ob IL-6 hierbei eine eindeutige schädigende oder heilsame Auswirkung besitzt, wird kontrovers diskutiert.

Mehrere Gruppen demonstrierten auf unterschiedlichen Wegen die Auswirkungen des IL-6-Signals auf den Verlauf entzündlicher Erkrankungen im Tiermodell. IL-6-defiziente *Knockout*-Mäuse sind sehr wahrscheinlich resistent gegenüber Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein (MOG) induzierter EAE, was mit der fehlenden Hochregulation von VCAM-1 auf den Endothelzellen des ZNS zusammenhängt. Die Th1-Zellen können so die Blut-Hirn-Schranke nicht überwinden (Eugster et al. 1998). Über den Effekt von anti-IL-6-Antikörpern auf den Verlauf der EAE bestehen widersprüchliche Angaben. Es wurden mildernde Effekte berichtet (Gijbels et al. 1995, Okuda et al. 1998). Andererseits konnte sich die Gabe eines IL-6-Antikörpers nicht mäßigend auf die Symptomatik der EAE auswirken (Willenborg et al. 1995).

In unserer Arbeit wurden Ischiasnerven von Mäusen *in vitro* kultiviert, entweder mit Zusatz von Peritonealmakrophagen oder in reinen Kulturen. Den Nervenkulturen wurden anti-IL-6-Antikörper in den Konzentrationen 0,01 bzw. 0,1 oder 1 µg/ml zugegeben oder 1 µg/ml anti-IL-6-Rezeptor-Antikörper.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass sich die Invasion der Makrophagen in den N. ischiadicus und deren Phagozytoseaktivität nach Applikation von IL-6-Antikörpern nicht verändert. Für die F4/80⁺ und CD11b⁺ Makrophagen waren keine signifikanten Differenzen der Makrophagendichte zwischen Kontrollgruppe und den IL-6-

Blockierungen zu beobachten. Dies gilt für alle drei Zeitpunkte nach 2, 5 und 10 Tagen (vgl. Abb.10).

Unsere Untersuchungen ergaben nur für zwei Makrophagenmarker, CD204 und CD16/32, signifikante Veränderungen in der Makrophageninvasion in den N. ischiadicus nach 5 Tagen Kulturdauer zwischen der Kontrollgruppe und 1 µg/ml anti-IL-6-Antikörper. Die relative Makrophagendichte war reduziert für CD204⁺ Makrophagen auf 32 ±12% von der Kontrollgruppe. Die Anzahl CD16/32⁺ Makrophagen/mm² war ebenfalls verringert auf 74 ±1%. Allerdings ergaben sich keine weiteren signifikanten Unterschiede in der Makrophagendichte zwischen den unveränderten Nervenkulturen und den IL-6-manipulierten (für F4/80⁺, CD11b⁺, CD204⁺ und CD16/32⁺ Zellen zu allen anderen Zeitpunkten). Diese Werte stehen durch größere N auf einem breiteren Fundament. Außerdem präsentierte sich die Makrophageninvasion in Abhängigkeit von den vier unterschiedlichen Markern bemerkenswert konsistent (vgl. Abb.3). In Anbetracht dieses überwiegend geschlossenen identischen Verhaltens darf die Bedeutung der wenigen gefundenen Differenzen kritisch hinterfragt werden. In Abwesenheit von IL-6 scheint sich das Migrationsverhalten der Peritonealmakrophagen nicht zu ändern.

Insofern stimmen unsere Ergebnisse mit denen von BRÜCK und SIEBERT überein. Sie untersuchten das Ausmaß des axonalen Schadens nach Durchtrennung des N. ischiadicus und fanden heraus, dass die Makrophageninvasion in den N. ischiadicus von IL-6-Knockout-Mäusen bei der *in vivo* ablaufenden Wallerschen Degeneration unverändert ist gegenüber der in den Wildtyp-Mäusen (Siebert und Brück 2003).

Im Gegensatz dazu konnte eine massive inflammatorische Reaktion des PNS auf gezielte Applikation von IL-6 gezeigt werden (Deretzi et al. 1999). Die intraneurale Injektion von rekombinanten Ratten IL-6 *in vivo* in den N. ischiadicus von Ratten hatte eine hochgradige Inflammation und schwere Demyelinisierung zur Folge, was sich in einem vielfach erhöhten Makrophageninfiltrat/mm² im Vergleich zur Kontrollgruppe äußerte. Die *in-vivo*-Traumatisierung von Nerven provoziert Myelinantigen-autoreaktive Immunantworten der T- und B-Lymphozyten (Olsson et al. 1993), deren proinflammatorische, nicht IL-6-vermittelte Einflussnahmen in der isolierten Betrachtung in unserem Versuchmodell keine Rolle spielen. Das mag eine Erklärung dafür sein, dass DERETZI und Kollegen eine Auswirkung des IL-6 auf die Migrationsaktivität der Makrophagen nachwiesen.

4.7 Die Blockade des IL-6-Signals wirkt sich nicht auf die Phagozytoseaktivität der Makrophagen aus

Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass die Myelinaufnahme in die Makrophagen nach Blockade des IL-6-Signals unverändert bleibt.

Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass in der Literatur weitere Möglichkeiten beschrieben sind, die Phagozytosekapazität der Makrophagen zu regulieren. So lässt sich eine Reduzierung der Myelinaufnahme in die Makrophagen durch bis(4-nitrophenyl)-Phosphat (BNPP) vermittelte Esterasehemmung erzielen (Siebert et al. 2001). Versuche mit ICAM-defizienten *Knockout*-Mäusen unterstreichen die Relevanz der Zelladhäsionsmoleküle für die Myelinaufnahme in die Makrophagen (Vougioukas et al. 1998, Vougioukas et al. 2000). Ebenso beweist die Blockade des CR3 auf der Makrophagenmembran seine wichtige Funktion für die Myelinaufnahme (Brück und Friede 1990).

5. Zusammenfassung

In den letzten Jahren sind die Einflüsse von Zytokinen auf die Myelinbeseitigung immer mehr in den Focus wissenschaftlichen Interesses gerückt. Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Klärung der Rolle des IL-6 beim Myelinabbau im peripheren Nerv. Die vorliegende Arbeit bietet Anhalt dafür, dass das IL-6 nicht direkt an der Regulation des Myelinabbaus beteiligt ist.

Es wurden Segmente der Nn. ischiadici von Mäusen wahlweise mit Zusatz von Peritonealmakrophagen kokultiviert. Unter unveränderten Bedingungen wurden Kontrollgruppen kultiviert. Die Medien anderer Gruppen wurden mit Antikörpern gegen IL-6 versetzt, um die Wege der IL-6-Signalübertragung zu blockieren. Die Makrophagen exprimieren alle die Oberflächenproteine F4/80, CD11b, CD204 und CD16/32, anhand derer sie sich im Gewebe nachweisen lassen. Anschließend durchgeführte immunhistologische Untersuchungen des N. ischiadicus ermöglichten die Beurteilung der Makrophagenaktivität. Die Makrophagenaktivität lässt sich anhand der Makrophageninvasion (Zellen/mm²) in das Nervengewebe und der prozentualen zytoplasmatischen Myelinbeladung der Makrophagen bestimmen. Verglichen wurde nun die Myelinbeladung und Makrophageninvasion in den Kontrollgruppen mit der Myelinbeladung und Makrophageninvasion in den Gruppen, in denen das IL-6-Signal blockiert wurde. Es ergaben sich keine generellen Differenzen zwischen den Gruppen.

Die Ergebnisse zeigen, dass der Aktivierungsstatus und die migratorische Aktivität der Makrophagen nicht direkt durch IL-6 beeinflusst zu sein scheinen.

6. Literaturverzeichnis

- Akira S, Taga T, Kishimoto T (1993): Interleukin-6 in biology and medicine. *Adv Immunol* 54, 1-78
- Arvidson B (1977): Cellular uptake of exogenous horseradish peroxidase in mouse peripheral nerve. *Acta Neuropathol (Berl)* 37, 35-41
- Arvin B, Neville LF, Barone FC, Feuerstein GZ (1996): The role of inflammation and cytokines in brain injury. *Neurosci Biobehav Rev* 20, 445-452
- Austyn JM, Gordon S (1981): F4/80, a monoclonal antibody directed specifically against the mouse macrophage. *Eur J Immunol* 11, 805-815
- Barton BE (2005): Interleukin-6 and new strategies for the treatment of cancer, hyperproliferative diseases and paraneoplastic syndromes. *Expert Opin Ther Targets* 9, 737-752
- Bauer J, Bauer TM, Kalb T, Taga T, Lengyel G, Hirano T, Kishimoto T, Acs G, Mayer L, Gerok W (1989): Regulation of interleukin 6 receptor expression in human monocytes and monocyte-derived macrophages. Comparison with the expression in human hepatocytes. *J Exp Med* 170, 1537-1549
- Bauer J, Huitinga I, Zhao W, Lassmann H, Hickey WF, Dijkstra CD (1995): The role of macrophages, perivascular cells, and microglial cells in the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Glia* 15, 437-446
- Baumann H, Gauldie J (1994): The acute phase response. *Immunol Today* 15, 74-80
- Benveniste EN (1997): Role of macrophages/microglia in multiple sclerosis and experimental allergic encephalomyelitis. *J Mol Med* 75, 165-173
- Beuche W, Friede RL (1984): The role of non-resident cells in Wallerian degeneration. *J Neurocytol* 13, 767-796
- Beuche W, Friede RL (1986): Myelin phagocytosis in Wallerian degeneration of peripheral nerves depends on silica-sensitive, bg/bg-negative and Fc-positive monocytes. *Brain Res* 378, 97-106

- Bo L, Mork S, Kong PA, Nyland H, Pardo CA, Trapp BD (1994): Detection of MHC class II-antigens on macrophages and microglia, but not on astrocytes and endothelia in active multiple sclerosis lesions. *J Neuroimmunol* 51, 135-146
- 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
- Bonnekoh PG, Scheidt P, Friede RL (1989): Myelin phagocytosis by peritoneal macrophages in organ cultures of mouse peripheral nerve. A new model for studying myelin phagocytosis in vitro. *J Neuropathol Exp Neurol* 48, 140-153
- Bourde O, Kiefer R, Toyka KV, Hartung HP (1996): Quantification of interleukin-6 mRNA in wallerian degeneration by competitive reverse transcription polymerase chain reaction. *J Neuroimmunol* 69, 135-140
- Brück W (1997): The role of macrophages in Wallerian degeneration. *Brain Pathol* 7, 741-752
- Brück W, Friede RL (1989): Activation of macrophages by recombinant interferon-gamma has no effect on myelin phagocytosis but hinders invasion of nerves in organ culture. *J Neuroimmunol* 25, 47-55
- Brück W, Friede RL (1990): Anti-macrophage CR3 antibody blocks myelin phagocytosis by macrophages in vitro. *Acta Neuropathol (Berl)* 80, 415-418
- Brück W, Friede RL (1991): The role of complement in myelin phagocytosis during PNS Wallerian degeneration. *J Neurol Sci* 103, 182-187
- Brück W, Brück Y, Friede RL (1992): TNF-alpha suppresses CR3-mediated myelin removal by macrophages. *J Neuroimmunol* 38, 9-17
- Brück W, Maruschak B, Brück Y (1995a): CD11b and CD18 antisense oligonucleotides suppress myelin removal by macrophages. *E J Pathol* 13, 953-1003
- Brück W, Porada P, Poser S, Rieckmann P, Hanefeld F, Kretzschmar HA, Lassmann H (1995b): Monocyte/macrophage differentiation in early multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol* 38, 788-796
- Brück W, Huitinga I, Dijkstra CD (1996): Liposome-mediated monocyte depletion during wallerian degeneration defines the role of hematogenous phagocytes in myelin removal. *J Neurosci Res* 46, 477-484

- Choy EH, Isenberg DA, Garrood T, Farrow S, Ioannou Y, Bird H, Cheung N, Williams B, Hazleman B, Price R, Yoshizaki K, Nishimoto N, Kishimoto T, Panayi GS (2002): Therapeutic benefit of blocking interleukin-6 activity with an anti-interleukin-6 receptor monoclonal antibody in rheumatoid arthritis: a randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation trial. *Arthritis Rheum* 46, 3143-3150
- Coleman DL (1986): Regulation of macrophage phagocytosis. *Eur J Clin Microbiol* 5, 1-5
- Cramer EB: Cell biology of phagocyte migration from the bone marrow, out of the bloodstream and across organ epithelia. In: *Inflammation: Basic principles and clinical correlates*, 2nd edition; hrsg. v. Gallin JI, Goldstein IM, Snyderman R; Raven Press, Ltd., New York 1992, 341-351
- da Costa CC, van der Laan LJ, Dijkstra CD, Brück W (1997): The role of the mouse macrophage scavenger receptor in myelin phagocytosis. *Eur J Neurosci* 9, 2650-2657
- Deretzi G, Pelidou SH, Zou LP, Quiding C, Zhu J (1999): Local effects of recombinant rat interleukin-6 on the peripheral nervous system. *Immunology* 97, 582-587
- Eugster HP, Frei K, Kopf M, Lassmann H, Fontana A (1998): IL-6-deficient mice resist myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced autoimmune encephalomyelitis. *Eur J Immunol* 28, 2178-2187
- Fabry Z, Fitzsimmons KM, Herlein JA, Moninger TO, Dobbs MB, Hart MN (1993): Production of the cytokines interleukin 1 and 6 by murine brain microvessel endothelium and smooth muscle pericytes. *J Neuroimmunol* 47, 23-34
- Fattori E, Cappelletti M, Costa P, Sellitto C, Cantoni L, Carelli M, Faggioni R, Fantuzzi G, Ghezzi P, Poli V (1994): Defective inflammatory response in interleukin 6-deficient mice. *J Exp Med* 180, 1243-1250
- Frei K, Fredrikson S, Fontana A, Link H (1991): Interleukin-6 is elevated in plasma in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 31, 147-153
- Gabay C, Kushner I (1999): Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med* 340, 448-454
- Gadient RA, Otten UH (1997): Interleukin-6 (IL-6)--a molecule with both beneficial and destructive potentials. *Prog Neurobiol* 52, 379-390
- Ghosh S, May MJ, Kopp EB (1998): NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* 16, 225-260

- Gibson JD (1979): The origin of the neural macrophage: a quantitative ultrastructural study of cell population changes during Wallerian degeneration. *J Anat* 129, 1-19
- Gijbels K, Brocke S, Abrams JS, Steinman L (1995): Administration of neutralizing antibodies to interleukin-6 (IL-6) reduces experimental autoimmune encephalomyelitis and is associated with elevated levels of IL-6 bioactivity in central nervous system and circulation. *Mol Med* 1, 795-805
- Gordon S, Perry VH, Rabinowitz S, Chung LP, Rosen H (1988): Plasma membrane receptors of the mononuclear phagocyte system. *J Cell Sci Suppl* 9, 1-26
- Greenfield EA, Nguyen KA, Kuchroo VK (1998): CD28/B7 costimulation: a review. *Crit Rev Immunol* 18, 389-418
- Greenwood J, Wang Y, Calder VL (1995): Lymphocyte adhesion and transendothelial migration in the central nervous system: the role of LFA-1, ICAM-1, VLA-4 and VCAM-1. *off. Immunology* 86, 408-415
- Griffin JW, Hoffman PN: Degeneration and Regeneration in peripheral nervous system. In: *Peripheral Neuropathy*, hrsg. v. Dyck PJ, Thomas PK, Griffin JW, Low PA, Podulso JF, 3. Auflage, Band 1, W.B Saunders Company, Philadelphia 1993, 317-330
- Griffin JW, George R, Lobato C, Tyor WR, Yan LC, Glass JD (1992): Macrophage responses and myelin clearance during Wallerian degeneration: relevance to immune-mediated demyelination. *J Neuroimmunol* 40, 153-165
- Griffin JW, George R, Ho T (1993): Macrophage systems in peripheral nerves. A review. *J Neuropathol Exp Neurol* 52, 553-560
- Hampel H, Schoen D, Schwarz MJ, Kotter HU, Schneider C, Sunderland T, Dukoff R, Levy J, Padberg F, Stubner S, Buch K, Muller N, Moller HJ (1997): Interleukin-6 is not altered in cerebrospinal fluid of first-degree relatives and patients with Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 228, 143-146
- Hann PG, Beuche W, Neumann U, Friede RL (1988): The rate of Wallerian degeneration in the absence of immunoglobulins. A study in chick and mouse peripheral nerve. *Brain Res* 451, 126-132
- Hariri RJ, Chang VA, Barie PS, Wang RS, Sharif SF, Ghajar JB (1994): Traumatic injury induces interleukin-6 production by human astrocytes. *Brain Res* 636, 139-142
- Hartung HP, Schafer B, Heining K, Stoll G, Toyka KV (1988): The role of macrophages and eicosanoids in the pathogenesis of experimental allergic neuritis. *Serial clinical,*

- electrophysiological, biochemical and morphological observations. *Brain* 111 (Pt 5), 1039-1059
- Hata H, Sakaguchi N, Yoshitomi H, Iwakura Y, Sekikawa K, Azuma Y, Kanai C, Moriizumi E, Nomura T, Nakamura T, Sakaguchi S (2004): Distinct contribution of IL-6, TNF-alpha, IL-1, and IL-10 to T cell-mediated spontaneous autoimmune arthritis in mice. *J Clin Invest* 114, 582-588
- Heinrich PC, Behrmann I, Muller-Newen G, Schaper F, Graeve L (1998): Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem J* 334 (Pt 2), 297-314
- Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Muller-Newen G, Schaper F (2003): Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J* 374, 1-20
- Hibi M, Murakami M, Saito M, Hirano T, Taga T, Kishimoto T (1990): Molecular cloning and expression of an IL-6 signal transducer, gp130. *Cell* 63, 1149-1157
- Hirano T, Taga T, Yamasaki K, Matsuda T, Yasukawa K, Hirata Y, Yawata H, Tanabe O, Akira S, Kishimoto T (1989): Molecular cloning of the cDNAs for interleukin-6/B cell stimulatory factor 2 and its receptor. *Ann N Y Acad Sci* 557, 167-78, discussion
- Hirano T, Yasukawa K, Harada H, Taga T, Watanabe Y, Matsuda T, Kashiwamura S, Nakajima K, Koyama K, Iwamatsu A (1986): Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. *Nature* 324, 73-76
- Hirota H, Kiyama H, Kishimoto T, Taga T (1996): Accelerated Nerve Regeneration in Mice by upregulated expression of interleukin (IL) 6 and IL-6 receptor after trauma. *J Exp Med* 183, 2627-2634
- Huitinga I, van Rooijen N, De Groot CJ, Uitdehaag BM, Dijkstra CD (1990): Suppression of experimental allergic encephalomyelitis in Lewis rats after elimination of macrophages. *J Exp Med* 172, 1025-1033
- Huitinga I, Damoiseaux JG, van Rooijen N, Dopp EA, Dijkstra CD (1992): Liposome mediated affection of monocytes. *Immunobiology* 185, 11-19
- Huitinga I, Damoiseaux JG, Dopp EA, Dijkstra CD (1993): Treatment with anti-CR3 antibodies ED7 and ED8 suppresses experimental allergic encephalomyelitis in Lewis rats. *Eur J Immunol* 23, 709-715

- Ishibashi T, Kimura H, Uchida T, Kariyone S, Friese P, Burstein SA (1989): Human interleukin 6 is a direct promoter of maturation of megakaryocytes in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 5953-5957
- Ishimi Y, Miyaura C, Jin CH, Akatsu T, Abe E, Nakamura Y, Yamaguchi A, Yoshiki S, Matsuda T, Hirano T, . (1990): IL-6 is produced by osteoblasts and induces bone resorption. *J Immunol* 145, 3297-3303
- Janeway CA: Die Angeborene Immunität. In: *Immunologie*; 5. Auflage; hrsg. v. Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomick M; Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg Berlin 2002, Seite 74)
- Jirik FR, Podor TJ, Hirano T, Kishimoto T, Loskutoff DJ, Carson DA, Lotz M (1989): Bacterial lipopolysaccharide and inflammatory mediators augment IL-6 secretion by human endothelial cells. *J Immunol* 142, 144-147
- Jung S, Huitinga I, Schmidt B, Zielasek J, Dijkstra CD, Toyka KV, Hartung HP (1993): Selective elimination of macrophages by dichloromethylene diphosphonate-containing liposomes suppresses experimental autoimmune neuritis. *J Neurol Sci* 119, 195-202
- Karin M, Ben Neriah Y (2000): Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu Rev Immunol* 18, 621-663
- Kiefer R, Dangond F, Mueller M, Toyka KV, Hafler DA, Hartung HP (2000): Enhanced B7 costimulatory molecule expression in inflammatory human sural nerve biopsies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 69, 362-368
- Kiefer R, Kieseier BC, Stoll G, Hartung HP (2001): The role of macrophages in immune-mediated damage to the peripheral nervous system. *Prog Neurobiol* 64, 109-127
- Kinashi T, Harada N, Severinson E, Tanabe T, Sideras P, Konishi M, Azuma C, Tominaga A, Bergstedt-Lindqvist S, Takahashi M, . (1986): Cloning of complementary DNA encoding T-cell replacing factor and identity with B-cell growth factor II. *Nature* 324, 70-73
- Kishimoto T (2005): Interleukin-6: from basic science to medicine--40 years in immunology. *Annu Rev Immunol* 23, 1-21
- Kishimoto T, Akira S, Narazaki M, Taga T (1995): Interleukin-6 family of cytokines and gp130. *Blood* 86, 1243-1254
- Koike K, Nakahata T, Kubo T, Kikuchi T, Takagi M, Ishiguro A, Tsuji K, Naganuma K, Okano A, Akiyama Y, . (1990): Interleukin-6 enhances murine megakaryocytopoiesis in serum-free culture. *Blood* 75, 2286-2291

- Kuhlmann T, Brück W (1999): Immunoglobulins induce increased myelin debris clearance by mouse macrophages. *Neurosci Lett* 275, 191-194
- Kuhlmann T, Wendling U, Nolte C, Zipp F, Maruschak B, Stadelmann C, Siebert H, Brück W (2002): Differential regulation of myelin phagocytosis by macrophages/microglia, involvement of target myelin, Fc receptors and activation by intravenous immunoglobulins. *J Neurosci Res* 67, 185-190
- Li Q, Verma IM (2002): NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol* 2, 725-734
- Liefner M, Siebert H, Sachse T, Michel U, Kollias G, Brück W (2000): The role of TNF-alpha during Wallerian degeneration. *J Neuroimmunol* 108, 147-152
- Lucchinetti CF, Brück W, Rodriguez M, Lassmann H (1996): Distinct patterns of multiple sclerosis pathology indicates heterogeneity on pathogenesis. *Brain Pathol* 6, 259-274
- Lunn ER, Perry VH, Brown MC, Rosen H, Gordon S (1989): Absence of Wallerian Degeneration does not Hinder Regeneration in Peripheral Nerve. *Eur J Neurosci* 1, 27-33
- Maimone D, Guazzi GC, Annunziata P (1997): IL-6 detection in multiple sclerosis brain. *J Neurol Sci* 146, 59-65
- Martiney JA, Rajan AJ, Charles PC, Cerami A, Ulrich PC, Macphail S, Tracey KJ, Brosnan CF (1998): Prevention and treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis by CNI-1493, a macrophage-deactivating agent. *J Immunol* 160, 5588-5595
- Miller SD, Vanderlugt CL, Lenschow DJ, Pope JG, Karandikar NJ, Dal Canto MC, Bluestone JA (1995): Blockade of CD28/B7-1 interaction prevents epitope spreading and clinical relapses of murine EAE. *Immunity* 3, 739-745
- Most J, Schwaeble W, Dierich MP (1992): Expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) on human monocytes. *Immunobiology* 185, 327-336
- Muller HW, Minwegen P (1987): Nonresident macrophages in peripheral nerve of rat: effect of silica on migration, myelin phagocytosis, and apolipoprotein E expression during Wallerian degeneration. *J Neurosci Res* 18, 222-229
- Muraguchi A, Kishimoto T, Miki Y, Kuritani T, Kaieda T, Yoshizaki K, Yamamura Y (1981): T cell-replacing factor- (TRF) induced IgG secretion in a human B blastoid cell line and demonstration of acceptors for TRF. *J Immunol* 127, 412-416

- Murphy PG, Grondin J, Altares M, Richardson PM (1995): Induction of interleukin-6 in axotomized sensory neurons. *J Neurosci* 15, 5130-5138
- Nakajima T, Kinoshita S, Sasagawa T, Sasaki K, Naruto M, Kishimoto T, Akira S (1993): Phosphorylation at threonine-235 by a ras-dependent mitogen-activated protein kinase cascade is essential for transcription factor NF-IL6. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 2207-2211
- Newman SL, Becker S, Halme J (1985): Phagocytosis by receptors for C3b (CR1), iC3b (CR3), and IgG (Fc) on human peritoneal macrophages. *J Leukoc Biol* 38, 267-278
- Nicola NA, Metcalf D, Matsumoto M, Johnson GR (1983): Purification of a factor inducing differentiation in murine myelomonocytic leukemia cells. Identification as granulocyte colony-stimulating factor. *J Biol Chem* 258, 9017-9023
- Nishimoto N, Yoshizaki K, Miyasaka N, Yamamoto K, Kawai S, Takeuchi T, Hashimoto J, Azuma J, Kishimoto T (2004): Treatment of rheumatoid arthritis with humanized anti-interleukin-6 receptor antibody: a multicenter, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum* 50, 1761-1769
- Norris JG, Tang LP, Sparacio SM, Benveniste EN (1994): Signal transduction pathways mediating astrocyte IL-6 induction by IL-1 beta and tumor necrosis factor-alpha. *J Immunol* 152, 841-850
- Ohshima S, Saeki Y, Mima T, Sasai M, Nishioka K, Nomura S, Kopf M, Katada Y, Tanaka T, Suemura M, Kishimoto T (1998): Interleukin 6 plays a key role in the development of antigen-induced arthritis. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 8222-8226
- Okuda Y, Sakoda S, Bernard CC, Fujimura H, Saeki Y, Kishimoto T, Yanagihara T (1998): IL-6-deficient mice are resistant to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis provoked by myelin oligodendrocyte glycoprotein. *Int Immunol* 10, 703-708
- Olsson T, Sun JB, Solders G, Xiao BG, Hojberg B, Ekre HP, Link H (1993): Autoreactive T and B cell responses to myelin antigens after diagnostic sural nerve biopsy. *J Neurol Sci* 117, 130-139
- Ousman SS, David S (2001): MIP-1alpha, MCP-1, GM-CSF, and TNF-alpha control the immune cell response that mediates rapid phagocytosis of myelin from the adult mouse spinal cord. *J Neurosci* 21, 4649-4656
- Patarroyo M (1994): Adhesion molecules mediating recruitment of monocytes to inflamed tissue. *Immunobiology* 191, 474-477

- Perrin FE, Lacroix S, Aviles-Trigueros M, David S (2005): Involvement of monocyte chemoattractant protein-1, macrophage inflammatory protein-1alpha and interleukin-1beta in Wallerian degeneration. *Brain* 128, 854-866
- Perrin PJ, Scott D, Davis TA, Gray GS, Doggett MJ, Abe R, June CH, Racke MK (1996): Opposing effects of CTLA4-Ig and anti-CD80 (B7-1) plus anti-CD86 (B7-2) on experimental allergic encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 65, 31-39
- Perry VH (1998): A revised view of the central nervous system microenvironment and major histocompatibility complex class II antigen presentation. *J Neuroimmunol* 90, 113-121
- Perry VH, Brown MC, Gordon S (1987): The macrophage response to central and peripheral nerve injury. A possible role for macrophages in regeneration. *J Exp Med* 165, 1218-1223
- Perry VH, Tsao JW, Fearn S, Brown MC (1995): Radiation-induced reductions in macrophage recruitment have only slight effects on myelin degeneration in sectioned peripheral nerves of mice. *Eur J Neurosci* 7, 271-280
- Prieto J, Eklund A, Patarroyo M (1994): Regulated expression of integrins and other adhesion molecules during differentiation of monocytes into macrophages. *Cell Immunol* 156, 191-211
- Reichert F, Rotshenker S (2003): Complement-receptor-3 and scavenger-receptor-AI/II mediated myelin phagocytosis in microglia and macrophages. *Neurobiol Dis* 12, 65-72
- Reichert F, Levitzky R, Rotshenker S (1996): Interleukin 6 in intact and injured mouse peripheral nerves. *Eur J Neurosci* 8, 530-535
- Reichert F, Slobodov U, Makranz C, Rotshenker S (2001): Modulation (inhibition and augmentation) of complement receptor-3-mediated myelin phagocytosis. *Neurobiol Dis* 8, 504-512
- Rodriguez M, Pavelko KD, McKinney CW, Leibowitz JL (1994): Recombinant human IL-6 suppresses demyelination in a viral model of multiple sclerosis. *J Immunol* 153, 3811-3821
- Ross GD (1980): Analysis of the different types of leukocyte membrane complement receptors and their interaction with the complement system. *J Immunol Methods* 37, 197-211
- Rothlein R, Dustin ML, Marlin SD, Springer TA (1986): A human intercellular adhesion molecule (ICAM-1) distinct from LFA-1. *J Immunol* 137, 1270-1274

- Rotshenker S (2003): Microglia and macrophage activation and the regulation of complement-receptor-3 (CR3/MAC-1)-mediated myelin phagocytosis in injury and disease. *J Mol Neurosci* 21, 65-72
- Scheidt P, Friede RL (1987): Myelin phagocytosis in Wallerian degeneration. Properties of millipore diffusion chambers and immunohistochemical identification of cell populations. *Acta Neuropathol (Berl)* 75, 77-84
- Scheidt P, Waehneldt TV, Beuche W, Friede RL (1986): Changes of myelin proteins during Wallerian degeneration in situ and in millipore diffusion chambers preventing active phagocytosis. *Brain Res* 379, 380-384
- Scheller J, Rose-John S (2006): Interleukin-6 and its receptor: from bench to bedside. *Med Microbiol Immunol (Berl)* 195 (4), 173-183
- Schobitz B, Voorhuis DA, de Kloet ER (1992): Localization of interleukin 6 mRNA and interleukin 6 receptor mRNA in rat brain. *Neurosci Lett* 136, 189-192
- Schonrock LM, Gawlowski G, Brück W (2000): Interleukin-6 expression in human multiple sclerosis lesions. *Neurosci Lett* 294, 45-48
- Schubert T, Friede RL (1981): The role of endoneurial fibroblasts in myelin degradation. *J Neuropathol Exp Neurol* 40, 134-154
- Shamash S, Reichert F, Rotshenker S (2002): The cytokine network of Wallerian degeneration: tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1alpha, and interleukin-1beta. *J Neurosci* 22, 3052-3060
- Siebert H, Brück W (2003): The role of cytokines and adhesion molecules in axon degeneration after peripheral nerve axotomy: a study in different knockout mice. *Brain Res* 960, 152-156
- Siebert H, Engelke S, Maruschak B, Brück W (2001): Concentration-dependent effects of the esterase inhibitor BNPP on macrophage migration and myelin phagocytosis. *Brain Res* 916, 159-164
- Smith ME, van der MK, Somera FP (1998): Macrophage and microglial responses to cytokines in vitro: phagocytic activity, proteolytic enzyme release, and free radical production. *J Neurosci Res* 54, 68-78
- Soriano SG, Lipton SA, Wang YF, Xiao M, Springer TA, Gutierrez-Ramos JC, Hickey PR (1996): Intercellular adhesion molecule-1-deficient mice are less susceptible to cerebral ischemia-reperfusion injury. *Ann Neurol* 39, 618-624

- Springer TA (1990): Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 346, 425-434
- Stevens A, Schabet M, Schott K, Wietholter H (1989): Role of endoneural cells in experimental allergic neuritis and characterisation of a resident phagocytic cell. *Acta Neuropathol (Berl)* 77, 412-419
- 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, 671-683
- Stoll G, Schroeter M, Jander S, Siebert H, Wollrath A, Kleinschnitz C, Brück W (2004): Lesion-associated expression of transforming growth factor-beta-2 in the rat nervous system: evidence for down-regulating the phagocytic activity of microglia and macrophages. *Brain Pathol* 14, 51-58
- Tamura T, Udagawa N, Takahashi N, Miyaura C, Tanaka S, Yamada Y, Koishihara Y, Ohsugi Y, Kumaki K, Taga T, . (1993): Soluble interleukin-6 receptor triggers osteoclast formation by interleukin 6. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 11924-11928
- Tilg H, Trehu E, Atkins MB, Dinarello CA, Mier JW (1994): Interleukin-6 (IL-6) as an anti-inflammatory cytokine: induction of circulating IL-1 receptor antagonist and soluble tumor necrosis factor receptor p55. *Blood* 83, 113-118
- 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 Rooijen N (1989): The liposome-mediated macrophage 'suicide' technique. *J Immunol Methods* 124, 1-6
- van Rooijen N, Sanders A (1994): Liposome mediated depletion of macrophages: mechanism of action, preparation of liposomes and applications. *J Immunol Methods* 174, 83-93
- van Rooijen N, Kors N, vd EM, Dijkstra CD (1990): Depletion and repopulation of macrophages in spleen and liver of rat after intravenous treatment with liposome-encapsulated dichloromethylene diphosphonate. *Cell Tissue Res* 260, 215-222
- van Rossum D, Hilbert SW, Straßenburg S, Hanisch UK, Brück W, Göttingen: Persönliche Mitteilungen 2006

- Vanderlugt CL, Karandikar NJ, Lenschow DJ, Dal Canto MC, Bluestone JA, Miller SD (1997): Treatment with intact anti-B7-1 mAb during disease remission enhances epitope spreading and exacerbates relapses in R-EAE. *J Neuroimmunol* 79, 113-118
- Vougioukas VI, Roeske S, Michel U, Brück W (1998): Wallerian degeneration in ICAM-1-deficient mice. *Am J Pathol* 152, 241-249
- Vougioukas VI, Roeske S, Brück W (2000): Involvement of intercellular adhesion molecule-1 in myelin recognition by macrophages. *Acta Neuropathol (Berl)* 99, 673-679
- Waller A (1850): Experiments on the section of the glossopharyngeal and hypoglossal nerves of the frog, and observations of the alterations produced thereby in the structure of their primitive fibers. *Phil Trans R Soc Lond (Biol)* 140, 423-429
- Weigert C, Hennige AM, Brodbeck K, Haring HU, Schleicher ED (2005): Interleukin-6 acts as insulin sensitizer on glycogen synthesis in human skeletal muscle cells by phosphorylation of Ser473 of Akt. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 289, E251-E257
- Willenborg DO, Fordham SA, Cowden WB, Ramshaw IA (1995): Cytokines and murine autoimmune encephalomyelitis: inhibition or enhancement of disease with antibodies to select cytokines, or by delivery of exogenous cytokines using a recombinant vaccinia virus system. *Scand J Immunol* 41, 31-41
- Yamasaki K, Taga T, Hirata Y, Yawata H, Kawanishi Y, Seed B, Taniguchi T, Hirano T, Kishimoto T (1988): Cloning and expression of the human interleukin-6 (BSF-2/IFN beta 2) receptor. *Science* 241, 825-828
- Yoshizaki K, Nakagawa T, Kaieda T, Muraguchi A, Yamamura Y, Kishimoto T (1982): Induction of proliferation and Ig production in human B leukemic cells by anti-immunoglobulins and T cell factors. *J Immunol* 128, 1296-1301
- Ziegler-Heitbrock HW (1989): The biology of the monocyte system. *Eur J Cell Biol* 49, 1-12

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Wolfgang Brück als Leiter der Abteilung Neuropathologie im Zentrum Pathologie für die Überlassung des Themas. Seine Abteilung bietet einem Doktoranden ein freundliches Arbeitsklima und angenehmes Umfeld für wissenschaftliches Arbeiten.

Mein recht herzlicher Dank gilt Frau Dr. rer. nat. Denise van Rossum für die ausgezeichnete und überaus engagierte Betreuung meiner Dissertation. Ich glaube kaum, dass man sich eine bessere Betreuerin wünschen kann.

Frau Silke Straßenburg danke ich für die geduldige Einführung in die Labortechniken. Sie war mir bei den anfallenden Arbeiten stets eine freundliche und sorgfältige Unterstützung.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. rer. nat. Uwe Karsten Harnisch für das immer hilfsbereite und motivierende Backup.

Es war mir eine Freude 3 Jahre mit Euch zusammengearbeitet zu haben.

Für die freundliche Unterstützung und die kleinen Hilfen zwischendurch sei sich bei den gesamten Mitarbeitern der Abteilung Neuropathologie bedankt. Sie alle haben dazu beigetragen, dass ich mich von Anfang an in ihrer Abteilung sehr wohl gefühlt habe und alle Arbeiten reibungslos verlaufen konnten.

Vielen Dank insbesondere an die Tages-Besetzung des „Doktorandenzimmers“ mit Karina Wolter, Akki Mildner, Jenni Raasch, Christiane Menzfeld, Wiebke Wemheuer und die Mitdoktoranden Vanessa Tatje und Jens Pehlke für die lustige Zeit.

Ich danke meinen Eltern, meinem Bruder Jan und Dir, Lilli, für die liebevolle Unterstützung bei meiner Promotion.

Lebenslauf

Am 26. Juni 1981 wurde ich, Sören-Wibo Hilbert, als Sohn von Dr. med. Michael Hilbert und dessen Ehefrau Hannelore Hilbert, geb. Patzelt, in Göttingen geboren.

Dort besuchte ich von 1987 bis 1991 die Bonifatius Grundschule, woran sich zwei Jahre in der Orientierungsstufe der Bonifatius Schule Göttingen anschlossen.

Ab 1993 verbrachte ich 7 Jahre am Theodor-Heuss-Gymnasium in Göttingen, das ich 2000 mit der allgemeinen Hochschulreife verließ.

Im Facharztzentrum für Dermatologie in Hannover leistete ich anschließend meinen 10 monatigen Wehrdienst.

Von 2001 bis 2006 absolvierte ich mein Studium der Zahnmedizin an der Georg-August-Universität in Göttingen.

Am 24. Juni 2006 wurde mir die Approbation als Zahnarzt erteilt.