

Aus dem Institut für Neuropathologie
(Prof. Dr. med. W. Brück)
im Zentrum Pathologie und Rechtsmedizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Der Einfluss unterschiedlicher Zellkulturmedien auf die
Makrophagen in einem Co-Kultur-Modell von
Nervengewebe und Peritonealzellen**

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

vorgelegt von
Jana Aline Schulte
aus
Recklinghausen

Göttingen 2013

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer

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

II. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Reichardt

III. Berichterstatter: Prof. Dr. med. M. Oppermann

Tag der mündlichen Prüfung: 13.05. 2014

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	9
1.1	Wallersche Degeneration im Allgemeinen	9
1.1.1	Wallersche Degeneration im peripheren Nervensystem	10
1.1.1.1	Axonale Degeneration	10
1.1.1.2	Rolle der Schwann-Zellen	11
1.1.1.3	Rolle der Makrophagen	13
1.1.1.4	Weitere Einflussfaktoren der Wallerschen Degeneration	15
1.2.1	Wallersche Degeneration im ZNS, grundlegende Unterschiede zum PNS	16
1.2.2	Wallersche Degeneration in demyelinisierenden Erkrankungen	17
1.3	Zellkulturen und Zellkulturmedien	18
1.3.1	In-vitro-Co-Kultur-Modell nach Hann-Bonnekoh.....	18
1.3.2	Anwendung unterschiedlicher Zellkulturmedien.....	19
1.4	Ziel der Arbeit.....	20
2.	Material und Methoden	22
2.1	Übersicht der angewendeten Methoden.....	22
2.2	Versuchstiere.....	22
2.3	Gewebekulturen	23
2.3.1	Thioglykollatinjektion	23
2.3.2	Peritoneallavage.....	23
2.3.3	Entnahme der Ischiasnerven	23
2.4	Aufarbeitung des degenerierten Nervengewebes.....	24
2.4.1	Co-Kultivierung der Peritonealmakrophagen und Ischiasnervensegmente	24
2.4.2	Zusammensetzung der Zellkulturmedien.....	24
2.4.3	Kryostatschnitte	26
2.5	Immunhistochemie.....	27
2.5.1	Funktionsweise der Immunhistochemie	27
2.5.2	Übersicht über Antigene und die Primärantikörper	28
2.5.3	Durchführung der Immunhistochemie	29
2.6	Oil-Red-O	30
2.6.1	Funktionsweise der Oil-Red-O-Färbung.....	30
2.6.2	Durchführung der Oil-Red-O-Färbung.....	30
2.7	Doppelimmunhistochemie	31
2.7.1	Funktionsweise der Doppelimmunhistochemie.....	31
2.7.2	Durchführung der Doppelimmunhistochemie von F4/80 und S100.....	31

2.8	Analyse der Makrophagen und migrationsfähigen Zellen	32
2.8.1	Zellzählung der Peritoneallavage.....	32
2.8.2	Kultivierung in 3D-Migrationskammern	33
2.8.3	FACS-Analyse	36
2.8.4	Zytozentrifugation	37
2.9	Chloracetatesterasefärbung und Toluidinblau-Färbung.....	37
2.9.1	Chloracetatesterasefärbung	37
2.9.2	Toluidinfärbung	38
2.10	Auswertung.....	38
2.10.1	Fotografische und computergestützte Auswertung.....	38
2.10.2	Statistik	39
3.	Ergebnisse	40
3.1	Charakterisierung der Ausgangspopulation von Peritonealzellen	40
3.1.1	FACS-Analyse	40
3.1.2	Immunhistochemie an Zytozentrifugaten	41
3.2	Makrophagen in den Co-Kulturen mit Panserin und DMEM.....	43
3.3	Makrophagen in den 3D-Migrationskammern.....	46
3.4	Immunhistochemie an den co-kultivierten Nervenstücken im Medienvergleich.....	48
3.5	Nachweis von fetthaltigen Zellen anhand der ORO-Färbung.....	56
3.6	Überlagerungen von Immunhistochemien mit ORO-Färbungen.....	58
3.7	Immunhistochemische Doppelfärbungen	62
4.	Diskussion.....	64
4.1	Populationszusammensetzung der Peritonealzellen.....	65
4.1.1	Expression von Oberflächenrezeptoren bei Peritonealzellen.....	66
4.1.2	Einfluss von Thioglykollat auf die Immunzellen.....	68
4.2	Makrophagen im Co-Kulturmodell.....	70
4.2.1	Migration: Ortsständige und eingewanderte Makrophagen.....	70
4.2.2	Phagozytose: Myelinphagozytose.....	71
4.2.3	Phagozytose: Verschiedene Phagozytoserezeptoren bei Makrophagen	73
4.2.4	Mitwirkung von Myelinproteinen.....	75
4.3	Vergleich zwischen Makrophagen im serumhaltigen und serumfreien Kulturmedium.....	76
4.3.1	Zellviabilität der Peritonealzellen in DMEM und Panserin.....	79
4.3.2	Unterschiedliche Größe und Anzahl der Peritonealzellen in DMEM und Panserin.....	80
4.3.3	Unterschiedliche Zellmorphologie in den Co-Kulturen.....	81
4.3.4	Unterschiedliche Oberflächenrezeptoren bei Makrophagen in Nervenstücken.....	82
4.3.5	Unterschiedliche Migrations- und Phagozytosefähigkeit	84

4.4	Effekte von serumfreiem Medium auf Schwann-Zellen.....	86
4.4.1	Rolle der Schwann-Zellen als Phagozytosezellen	87
4.5	Ausblick	88
5.	Zusammenfassung	90
	Anhang.....	92
	Literaturverzeichnis.....	105

Abkürzungsverzeichnis

AA	L-Ascorbinsäure
ANOVA	<i>analysis of variance</i> – Varianzanalyse
BDNF	<i>brain-derived neurotrophic factor</i>
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>
BME	<i>Basal Medium Eagle</i> – Eagle's Basalmedium
BNPP	bis-4-Nitrophenylphosphat
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CCL	<i>chemokine (C-C motif) ligand</i>
CMT	Morbus Charcot-Marie-Tooth
CR-3	<i>complementary receptor 3</i> – Komplementrezeptor Typ 3
CSF-1	<i>colony stimulating factor-1</i> – Kolonie-stimulierender Faktor-1
DAB	Diaminobenzidin (Tetrachlorid)
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle Medium</i>
EAN	experimentelle autoimmune Neuritis
EGF	<i>epidermal growth factor</i> – epidermaler Wachstumsfaktor
ErbB2	EGF-Rezeptor für Neuregulin 1
ErbB3	EGF-Rezeptor für Neuregulin 1
EZM	extrazelluläre Matrix
F4/80	Makrophagen-Antikörper
FACS	<i>fluorescence activated cell-sorting</i> – fluoreszenzbasierte Durchflusszytometrie
FcR	Fc-Rezeptor
FCS	<i>fetal calf serum</i> – fetales Kälberserum
GBS	Guillain-Barré-Syndrom

G-CSF	Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
GFP	<i>green fluorescent protein</i> – grün fluoreszierendes Protein
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
HS	<i>horse serum</i> – Pferdeserum
ICAM-1	interzelluläres Zelladhäsionsmolekül 1
IFN	Interferon
IFN- γ	Interferon-gamma
Ig's	Immunglobuline
IL	Interleukin
IMEM	<i>Iscove's modified Eagle Medium</i>
IVIg's	intravenöse Immunglobuline
MAC-1	Membran-Attack-Complex – Makrophagenantigen 1
MAC-3	Membran-Attack-Complex – Makrophagenantigen 3
MAG	Myelin-assoziiertes Glycoprotein
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MBP	Myelin-basisches Protein
MCP-1	Makrophagen-chemotaktisches Protein-1
MIP-1a	Macrophagen-inflammatorisches Protein-1Alpha
M-CSF	Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
MHC II	<i>major histocompatibility complex II</i> – Hauptkomplex der Histokompatibilitätsantigene
MMP's	Matrixmetalloproteinasen
MMP-9	Matrixmetalloproteinase-9
MPS	mononukleäres Phagozytensystem
MS	Multiple Sklerose

MWU	Mann-Whitney-U-Test
NRG1	Neuregulin 1
NF-κB	<i>nuclear factor kappa B</i>
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
OMgp	Oligodendrozyten-Myelin Glycoprotein
ORO	Oil-Red-O
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> – Phosphatgepufferte Salzlösung
PDGF-BB	<i>platelet-derived growth factor BB</i>
PLA2	Phospholipase A2
PNS	peripheres Nervensystem
POX	Pentoxifyllin
RhoA	<i>ras homolog gene family, member A</i>
ScR	Scavenger-Rezeptor
TGF-β	<i>transforming growth factor</i> – transformierender Wachstumsfaktor Beta
TH-1	T-Helferzellen Subtyp1
TH-2	T-Helferzellen Subtyp2
TLR	<i>toll-like receptor</i> – Toll-ähnlicher Rezeptor
TNF-α	Tumornekrosefaktor Alpha
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
ZNS	zentrales Nervensystem

1. Einleitung

Die vorliegende Arbeit thematisiert die Wallersche Degeneration im peripheren Nervensystem, indem in Form eines experimentellen Modells von co-kultiviertem Nervengewebe mit Peritonealzellen der Einfluss verschiedener Zellkulturmedien auf den Prozess der Wallerschen Degeneration genauer bestimmt wird.

1.1 Wallersche Degeneration im Allgemeinen

Die Wallersche Degeneration im Nervensystem ist nach ihrem Erstbeschreiber, dem englischen Physiologen August V. Waller (1850), benannt. Er charakterisiert im Jahre 1850 die morphologischen Veränderungen degenerativer Prozesse an glossopharyngealen und hypoglossalen Nerven von Fröschen (Waller 1850). Die Wallersche Degeneration ist eine bedeutende Reaktion des Nervensystems auf die Unterbrechung zwischen einem Axon und seinem zugehörigen Nervenzellperikaryon (Griffin und Hoffman 1993). Mögliche Auslöser dieser Desintegration können z. B. ein Trauma, ein toxisches, ischämisches, metabolisches Geschehen oder ein degenerativer Prozess sein (Brück 1997). Hierbei führen ein Zusammenspiel von neuronalen und nicht-neuronalen Zellen und eine Kaskade von zellulären und molekularen Prozessen anfangs zu einer Art Entzündungsreaktion im distalen Anteil des Axons. Direkt betroffen von diesen Prozessen sind der distale Axonanteil, die umgebende Myelinscheide und die Myelinscheiden-bildenden Zellen (Jänisch et al. 1990). Die Kontinuitätsunterbrechung der Nervenfasern führt zu einem Kapazitätsverlust bei der Weiterleitung von Aktionspotentialen und letztendlich zu einem Innervationsverlust des Zielorgans (Griffin und Hoffman 1993).

Die Wallersche Degeneration findet sowohl im zentralen Nervensystem (ZNS) als auch im peripheren Nervensystem (PNS) statt, wobei sich zelluläre und molekulare Mechanismen in ihrem Schwerpunkt und in ihrer Kapazität deutlich unterscheiden (Gaudet et al. 2011). Die Abfolge der verschiedenen Phasen der Wallerschen Degeneration bleibt allerdings gleich (Raff et al. 2002) und gestaltet sich wie folgt: Der Insult am Axon führt als Erstes zu einer Degeneration des Axons, gefolgt von einer Degradierung der Myelinscheide. Daran schließt sich eine Proliferation der Myelinscheidenbildner (Schwann-Zellen im PNS) an und es folgt die Phagozytose der degenerierten Bestandteile (Griffin und Hoffman 1993). Die Wallersche

Degeneration wird durch die Beendigung der Abräum- bzw. Entzündungsreaktion abgeschlossen. Im PNS höherer Wirbeltiere und auch beim Menschen besteht an dieser Stelle die Besonderheit, dass sich ein regenerativer Prozess der Axone anschließt, der im ZNS hingegen in geringerem Umfang stattfindet (Brück 1997).

Diese oben beschriebene gleichbleibende Abfolge zeigt im Hinblick auf Spezies, Außentemperatur, Nervenfasergüte und Distanz zwischen Läsionsstelle und Zielgewebe allerdings morphologische Unterschiede (Jänisch et al. 1990). Auch unterscheidet sich die Koordination dieser Phasenabfolge in Abhängigkeit von der Art des Insults (Rotshenker 2011).

1.1.1 Wallersche Degeneration im peripheren Nervensystem

1.1.1.1 Axonale Degeneration

Die axonale Degeneration stellt die initiale Phase der Wallerschen Degeneration dar und zeichnet sich im PNS durch ein hocheffizientes Wechselspiel zwischen nichtneuronalen Zellen und den von ihnen produzierten Molekülen aus (Rotshenker 2011). Dabei spielt das angeborene Immunsystem mit seinen zellulären und humoralen Komponenten eine tragende Rolle. Eine initiale Entzündungsreaktion im distalen Axonanteil ist die Voraussetzung für den effizienten Ablauf der Wallerschen Degeneration mit Ausblick auf eine spätere axonale Regeneration (Bosse 2012).

Die axonale Degeneration setzt nicht unmittelbar nach der Schädigung ein. Vielmehr bleibt der abgetrennte distale Axonanteil zunächst intakt, sodass auch die Fähigkeit erhalten bleibt, nach gezielter Stimulation Aktionspotenziale weiterzuleiten (Luttges et al. 1976; Tsao et al. 1999). Hierbei beschreiben Gaudet et al. (2011), dass der Zeitraum zwischen Axoninsult und einsetzender Axondegeneration artspezifisch variiert (Gaudet et al. 2011). Bei Mäusen und Ratten setzt die axonale Degeneration bereits nach 24 bis 48 Stunden ein (Lubinska 1977; Miledi und Slater 1970), bei Menschen hingegen erst nach einigen Tagen (Chaudhry und Cornblath 1992).

Die axonale Degeneration kann im Hinblick auf morphologische Veränderungen weiter in unterschiedliche aufeinanderfolgende Phasen eingeteilt werden (Brück 1997). Zunächst kommt es aufgrund des traumatischen Insults zu einer Blockade des axonalen Transportes im distalen Bereich, sodass verschiedenste Moleküle nicht mehr abtransportiert werden können. Morphologisches Korrelat dieser Akkumulation ist eine Anschwellung im entsprechenden

distalen Axonbereich (Hall 2005). Bereits 24 Stunden nach dem Insult können intramembranöse Partikelunterschiede innerhalb des Axons und nach 36 bis 44 Stunden lichtmikroskopisch erste Axonfragmentationen im Mausgewebe beobachtet werden (Rotshenker 2011). Erst dann schließt sich die Desintegration von Axon und Zytoskelett an. Die granuläre Auflösung des Zytoskeletts dauert ungefähr eine Stunde und wird u. a. durch einen intrazellulären Kalziumanstieg initiiert (Gaudet et al. 2011). Dieser Kalziumanstieg resultiert aus einem Kalziumeinstrom aus extrazellulären und intrazellulären Kalziumspeichern (Nikolaeva et al. 2005) und führt zu einer kalziumabhängigen Aktivierung der Protease Calpain (Wang et al. 2004). Ebenfalls kalziumabhängig wird das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) aktiviert (Zhai et al. 2003). Beide Mechanismen führen zu einem Abbau des Zytoskeletts und axonaler Degeneration (Coleman und Perry 2002). An die Axondegradation schließt sich in einem nächsten Schritt der Myelinscheidenabbau an. Dieser Prozess wird sowohl durch ein Signal des anliegenden degradierten Axons als auch durch ein fehlendes Signal des sonst intakten Axons ausgelöst (Hirata und Kawabuchi 2002). Die Myelinsegmentation beginnt am Zytoplasma der anliegenden Schwann-Zelle an den Schmidt-Lantermann-Inzisuren (Ghabriel und Allt 1979) und den Ranvierschen Schnürringen (Liu et al. 1995). Anschließend werden die degradierten Myelinscheiden- und Axonanteile zu Zytoplasmavakuolen in der Schwann-Zelle inkorporiert. Auf die axonale Degeneration folgt eine Proliferation der Schwann-Zellen (Hirata und Kawabuchi 2002).

1.1.1.2 Rolle der Schwann-Zellen

Die Schwann-Zellen bilden die Myelinscheiden der Axone im PNS. Mit einem Anteil von 90% aller kernhaltigen Zellen im PNS sind diese nicht-neuronalen Zellen zuständig für diverse Nervenfunktionen und Reparaturmechanismen. Außerdem sind sie unerlässlich für die Entwicklung, Reifung und Regeneration von Axonen (Campana 2007). Darüber hinaus können diese Zellen über ihre Fähigkeit zur Expression von MHC II-Molekülen (*major histocompatibility complex II*) Antigene präsentieren und stehen somit in einer starken Vernetzung mit dem Immunsystem (Lüllmann-Rauch 2006).

Ihre Hauptfunktion als Myelinscheidenbildner ist für die Isolierung von Axonen erforderlich, sodass Aktionspotenziale effizient fortgeleitet werden können. Im Hinblick auf diese Funktion können die Schwann-Zellen weiter in zwei verschiedene Phänotypen eingeteilt werden. Der erste Phänotyp wird durch die myelinisierenden Schwann-Zellen dargestellt, welche für

die Myelinscheidenbildung von großkalibrigen Axonen der sensorischen und motorischen Nerven zuständig sind (Griffin und Thompson 2008). Diese Schwann-Zellen umgeben mit ihrer Zellmembran ein einzelnes Axonsegment und ermöglichen durch die effiziente Isolierung eine schnelle Weiterleitung von Aktionspotenzialen. Der zweite Phänotyp besteht aus den nicht-myelinisierenden Schwann-Zellen, die mit ihren Fortsätzen mehrere Axone mit einem geringeren Durchmesser umgeben. Diese Axone werden als nicht myelinisiert beschrieben, da durch den fehlenden Myelin-Mantel die Fortleitung von Aktionspotenzialen langsamer abläuft (Lüllmann-Rauch 2006). Eine Besonderheit hierbei ist, dass Schwann-Zellen als bereits ausdifferenzierte Zellen zwischen diesen beiden Phänotypen wechseln können. Geregelt ist dieser Mechanismus auf transkriptionaler Ebene (Jessen und Mirsky 2010).

Für den Prozess der Myelinisierung spielen zusätzlich verschiedene axonale Signale eine entscheidende Rolle. Neuregulin 1 (NRG1) übt zum Beispiel als axonales Oberflächenprotein über seine Rezeptoren ErbB2 und ErbB3 Einfluss auf die Myelinscheidendicke aus und reguliert die Expression von Myelingenen, welche die Myelinisierung initiieren. Darüber hinaus besitzt NRG1 eine mitogene und protektive Wirkung auf Schwann-Zellen (Brinkmann et al. 2008; Jessen und Mirsky 2010).

Im Hinblick auf die Wallersche Degeneration spielen die Schwann-Zellen vor allem in der frühen Phase die entscheidende Rolle in der Regulation der Myelinproduktion und Myelinphagozytose. Innerhalb des Ischiasnervengewebes der Ratte kommt es nach der Axonläsion beispielsweise zunächst zu einer Schwann-Zell-Proliferation mit einem Gipfel am vierten Tag. Durch verschiedenste Rezeptorkaskaden mit Einfluss auf die Genexpressionen werden anschließend die Funktionen der Schwann Zellen moduliert (Gaudet et al. 2011).

In den ersten fünf Tagen nach dem Axoninsult übernehmen Schwann-Zellen gemeinsam mit den ortsständigen Makrophagen die Phagozytose des degenerierten Myelins. Dabei können Schwann-Zellen ihr eigenes produziertes Myelin sowie das von geschädigten Schwann-Zellen produzierte extrazelluläre Myelin abbauen. Hierbei entstehen Myelinovoide, die sich aus Myelinresten und Molekülen mit inhibitorischer Wirkung auf die Regenerationsprozesse zusammensetzen (Brück 1997). Aufgrund dieser inhibitorischen Wirkung ist es von hoher Relevanz, dass eine frühe Phagozytose dieser Myelinreste ablaufen kann, damit diese mechanische Barriere für das Axonwachstum möglichst frühzeitig abgebaut wird (Gaudet et al. 2011). Auch besteht sonst die Gefahr, dass durch degeneriertes Myelin das Komplementsystem und folglich der Membran-Attack-Complex (MAC) aktiviert wird (Rotshenker 2011).

Da Schwann-Zellen nur eine eingeschränkte Phagozytosekapazität aufweisen, übernehmen nach ungefähr fünf Tagen mobilisierte Blut-Makrophagen diese Aufgabe (Perry et al. 1995). Die Mobilisierung der Makrophagen aus der Blutbahn zum distalen Degenerationsbereich des Axons hin wird u. a. von Schwann-Zellen durch die Produktion von verschiedenen Chemokinen wie zum Beispiel Makrophagen-chemotaktisches Protein-1 [MCP-1; (Siebert et al. 2000; Toews et al. 1998)], Makrophagen-inflammatorisches Protein-1 alpha [MIP-1a; (Martini et al. 2008)] und Matrixmetalloproteinasen [MMP's; (Siebert et al. 2001b)] ermöglicht.

Im Anschluss proliferieren die Schwann-Zellen. Ein enges Zusammenspiel zwischen Schwann-Zellen, Makrophagen, Fibroblasten, Endothelzellen und den von ihnen produzierten neurotrophen Faktoren wie beispielsweise *nerve growth factor* (NGF) und *bone-derived nerve factor* (BDNF) und weiteren Zytokinen, Chemokinen, Komponenten der Extrazellulärmatrix (EZM) und Adhäsionsmolekülen ermöglicht dann eine axonale Regeneration.

Die Schwann-Zellen, die eng assoziiert an Axonen liegen, beginnen nach einer proximalen Axoneinsprossung in den distalen Anteil erneut mit einer Myelinisierung dieser Axone. Als remyelinisierende Zellen und Produzenten der Hanken-Büngner-Bänder spielen die Schwann-Zellen in der späten Phase der Wallerschen Degeneration eine tragende Rolle für die anschließende Regeneration der Axone (Griffin und Hoffman 1993). Die Hanken-Büngner-Bänder sind hierbei eine wichtige Leitstruktur für die einsprossenden Tuben des proximalen Axonanteils, indem sie einen Übergang vom proximalen zum distalen Axonanteil bilden. Sie bestehen aus der Plasmamembran von proliferierenden Schwann-Zellen und Bestandteilen des Perineuriums des distalen Axonanteils (Mumenthaler et al. 2007).

Insgesamt besitzen die Schwann-Zellen somit einen direkten und notwendigen Effekt auf die axonale Regeneration.

1.1.1.3 Rolle der Makrophagen

Die Makrophagen sind als Zellen des angeborenen Immunsystems die hauptsächlichen Phagozytosezellen. Sie stehen in einer eng gekoppelten Interaktion mit weiteren Immunzellen und humoralen Komponenten (Coleman 1986). Aufgrund ihrer Oberflächenexpression von MHC-II-Molekülen besitzen sie die Fähigkeit zur Antigenpräsentation und stellen die Verbindung zum adaptiven Immunsystem dar.

Makrophagen differenzieren sich aus den myeloiden Stammzellen des Knochenmarks über mehrere Vorstufen des mononukleären Phagozytensystems (MPS) zunächst zu Monozyten.

Als Monozyten gelangen sie über die Blutbahn in ihre Zielgewebe, wo sie sich schließlich zu spezifischen, ortsständigen Gewebemakrophagen differenzieren. Diese Gewebemakrophagen präsentieren keine konstante Population, sondern werden regelmäßig durch einwandernde Blut-Makrophagen ersetzt. (Lüllmann-Rauch 2006).

Während der Wallerschen Degeneration wird die Mobilisierung der Blut-Makrophagen aufgrund einer Reaktion auf die oben beschriebenen, verschiedenen Zytokine, Chemokine, Serumkomponenten und das Komplementsystem initiiert. Mittels Diapedese gelangen die Phagozytosezellen nun zunächst als Monozyten durch intakte Gefäße zur Läsionsstelle des Axons und differenzieren sich. Die Permeabilisierung der Blut-Nerven-Schranke trägt ebenfalls zur Rekrutierung der Makrophagen bei. Aufgrund der Entzündungsreaktion erhöht sich ungefähr 48 Stunden nach der Axonläsion ihre Durchlässigkeit und ermöglicht den Einstrom der Makrophagen aufgrund von chemotaktisch wirksamen Serumkomponenten (Gaudet et al. 2011).

Im Rahmen der Myelinphagozytose spielen verschiedene Rezeptoren und Signalkaskaden eine wichtige Rolle. Der auf der Oberfläche der Makrophagen exprimierte Komplementrezeptor-3 (CR-3) erfüllt hierbei eine Schlüsselrolle für die Myelinphagozytose. Makrophagen können mittels dieses Rezeptors das C3-opsonierte, degenerierte Myelin detektieren und phagozytieren (Brück 1997). Die Makrophagen penetrieren zunächst die Schwann-Zell-Basallaminatuben. Anschließend verarbeiten sie dort die degenerierten Myelinreste, wobei dieser Phagozytosemechanismus hauptsächlich mittels eines Fc-Rezeptors (FcR) oder eines opsoninabhängigen Komplementrezeptors (CR) stattfindet. Weiter existiert ein opsoninunabhängiger Mechanismus über Carbohydrat-Rezeptoren (Hirata und Kawabuchi 2002). Eine weitere wichtige Rolle für die Myelinphagozytose spielt der Scavenger-Rezeptor (ScR), der auch unter dem Synonym CD 204 bekannt ist. Neben der Phagozytosefunktion besitzt der ScR die Fähigkeit, an Zellen und Proteine der EZM zu binden. Der ScR fördert als Adhäsionsmolekül auf der Makrophagenoberfläche die Mobilisierung und Migration der Blut-Makrophagen (da Costa et al. 1997).

Nach abgeschlossener Phagozytose verlassen die Makrophagen über eine durch Rho-A-Aktivierung (Rho-A; *ras homolog gene family, member A*) vermittelte Signalkaskade die Basallaminatuben der Schwann-Zellen (Fry et al. 2007; Gitik et al. 2011).

Bis zu mehrere Monate können die Makrophagen nun im Nerv verbleiben. Der Hauptanteil dieser Zellen verlässt anschließend das Nervengewebe und gelangt über die Blutbahn zu den lymphatischen Organen. Ein geringerer Zellanteil geht durch Apoptose zugrunde (Hirata und Kawabuchi 2002; Kuhlmann et al. 2001).

Neben ihrer Hauptfunktion als Phagozytosezellen besitzen die Makrophagen im Rahmen der Wallerschen Degeneration weitere wichtige Aufgaben. Anhand dieser Funktionen lassen sie sich in drei Hauptpopulationen einteilen. Dabei üben die meisten Makrophagen mehrere dieser Funktionen parallel aus, sodass viele verschiedene Subpopulationen entstehen. Die erste Hauptpopulation wird durch die oben beschriebenen Phagozytosezellen dargestellt und bildet die hauptsächliche Immunabwehrfunktion. Eine zweite Population trägt zur Wundheilung bei, wobei hier die Produktion von EZM-Komponenten im Vordergrund steht. Die dritte Makrophagengruppe dient der Immunsuppression, welche sich vor allem durch die Produktion von antiinflammatorischen Zytokinen auszeichnet. Diese Population spielt eine herausragende Rolle bei der Beendigung der inflammatorischen Reaktion in der Endphase der Wallerschen Degeneration und ermöglicht den Übergang zu den anschließenden regenerativen Vorgängen (Mosser und Edwards 2008).

1.1.1.4 Weitere Einflussfaktoren der Wallerschen Degeneration

Neben den Haupteffektorzellen, den Schwann-Zellen und Makrophagen, spielen die Interaktionen von weiteren Immunzellen und der Einfluss verschiedener Moleküle eine unverzichtbare Rolle für einen effizienten Ablauf der Wallerschen Degeneration.

In der frühen Phase der Wallerschen Degeneration unterstützen die Interaktionen von neutrophilen Granulozyten die Aufrechterhaltung des inflammatorischen Geschehens, indem sie die Mobilisierung von Monozyten für eine effiziente Phagozytose modulieren. Die neutrophilen Granulozyten unterstützen diese Prozesse ebenfalls durch die Freisetzung lytischer Komponenten, wodurch das beschädigte Gewebe besonders penetrierbar wird (Cawston 1998; Yong et al. 2001). Insgesamt machen die neutrophilen Granulozyten nur eine geringe Dichte im peripheren Nervengewebe aus. Dabei kommt es allerdings direkt an der Läsionsstelle des distalen Axons ungefähr acht Stunden nach der Läsion zu einer starken Akkumulation. Ungefähr 24 Stunden nach der Axonläsion erreichen die neutrophilen Granulozyten ihre höchste Zellzahl (Perkins und Tracey 2000; Siebert et al. 2001a). Hierbei ist eine hohe Umsatzrate dieser Zellen zu beobachten, da nach kurzer Phagozytoseaktivität keine neutrophilen Granulozyten mehr im Nervengewebe nachweisbar sind (Siebert et al. 2001a).

In der späten Phase der Wallerschen Degeneration im PNS stellen T-Lymphozyten eine weitere Effektorgruppe dar - mit einem Gipfel vom 14. bis 28. Tag nach der Axonläsion (Moalem et al. 2004). Durch ihre Produktion von proinflammatorischen und antiinflammatorischen

Zytokinen verknüpfen sie die Mechanismen des angeborenen Immunsystems mit dem des adaptiven Immunsystems (Mosmann et al. 1986). Die T-Lymphozyten lassen sich zunächst in die Gruppe der TH-1-Helferzellen (T-Helferzellen Subtyp1) einteilen, welche durch die Produktion proinflammatorischer Zytokine, wie z. B. TNF-alpha (Tumornekrosefaktor Alpha) und IFN-gamma (Interferon-gamma) charakterisiert ist. Über diese Funktion können sie Makrophagen, neutrophile Granulozyten und natürliche Killerzellen der Umgebung aktivieren und stimulieren. Durch die Produktion von antiinflammatorischen Zytokinen, wie z. B. IL-4 (Interleukin) und IL-10, lässt sich eine weitere Einteilung in TH-2-Helferzellen (T-Helferzellen, Subtyp2) vornehmen. Die Hauptfunktion dieser Zellen besteht in einer Immunsuppression und Herunterregulation der proinflammatorischen Signalkaskaden (London et al. 1998; Xin et al. 2011).

1.2.1 Wallersche Degeneration im ZNS, grundlegende Unterschiede zum PNS

Die Wallersche Degeneration findet ebenfalls im ZNS statt, wobei hier im Vergleich zum PNS grundlegende Unterschiede bestehen.

Eine entscheidende Zellpopulation bilden die Oligodendrozyten, die als Markscheidenbildner der Axone im ZNS keine Basallamina besitzen und mit ihren Fortsätzen gleichzeitig mehrere Axonsegmente parallel myelinisieren (Lüllmann-Rauch 2006). Im Falle einer Wallerschen Degeneration werden die Oligodendrozyten nach dem Axoninsult entweder apoptotisch oder sie gehen in einen Ruhemodus über (Casha et al. 2001; Crowe et al. 1997). Insgesamt sind das Wachstum und die Phagozytosefähigkeit der Oligodendrozyten gering, sodass sie kaum eine Regenerationskapazität besitzen (Almad et al. 2011; Vaughn und Pease 1970).

Eine weitere Zellpopulation stellen die Astrozyten dar, die als Gliazellen des ZNS im Fall eines axonalen Insults mit einer starken Proliferation reagieren und dabei hypertrophieren. Hierbei bilden sie eine Glianarbe, welche die Läsion am distalen Axon umschließt und entscheidend zur Modulation der inflammatorischen Kaskade beiträgt. Astrozyten besitzen ebenfalls einen inhibitorischen Einfluss auf die axonale Regeneration, indem sie sogenannte Chondroitinsulfat-Proteoglykane produzieren (Gaudet et al. 2011).

Einen entscheidenden Unterschied im ZNS bilden die residenten Makrophagen, die als Mikrogliazellen bezeichnet werden. Diese Zellen gehören, wie auch die Makrophagen im PNS, dem MPS an. Sie besitzen die Fähigkeit zur Antigenpräsentation und produzieren sowohl zytotoxische als auch antiinflammatorische Substanzen (Lüllmann-Rauch 2006).

Im Hinblick auf die Wallersche Degeneration proliferieren die Mikrogliazellen im Gegensatz zum PNS bereits in der frühen Phase der Wallerschen Degeneration. Mit ihrer früh ausgeprägten inflammatorischen Kapazität sind sie die primären Effektorzellen bei traumatischen Insulten im Gehirn und wie Makrophagen sind auch sie dazu in der Lage zu phagozytieren. Im Hinblick auf diese Funktion können die Mikroglia weiter eingeteilt werden. Den ersten Typ bilden die M1-Zellen, welche durch die Produktion von inflammatorischen Zytokinen, proteolytischen Enzymen und freien Radikalen als "akut-proinflammatorisch" bezeichnet werden (Kigerl et al. 2009; Mosser und Edwards 2008). Den zweiten Typ stellen die M2-Zellen dar, bei denen die antiinflammatorischen Eigenschaften überwiegen (Laskin 2009; Mosser und Edwards 2008).

Insgesamt dominiert im ZNS der M1-Zelltyp, so dass dort die Wallersche Degeneration durch die zytotoxische inflammatorische Komponente geprägt ist. Im Unterschied zu den eingewanderten Makrophagen im PNS ist die Phagozytosekapazität der Mikrogliazellen im ZNS weniger effizient. Dies führt zu einer verspäteten Abräumung inhibitorisch wirkender Myelinreste und hat somit einen ungünstigen Einfluss auf Regenerationsprozesse der Axone (Gaudet et al. 2011).

Zusätzlich zeichnet sich die EZM des ZNS durch eine andere Zusammensetzung als im PNS aus, indem sie einen hohen Anteil an Hyaluronsäure und Glycoproteinen wie Tenascin-C und Thrombospondin besitzt (Gladson 1999). Eine Interaktion der EZM-Komponenten mit der Glianarbe der Astrozyten baut eine weitere Barrierefunktion auf und wirkt somit einer axonalen Regeneration entgegen (McKeon et al. 1991).

Weitere Komponenten, wie z. B. die Myelin-Bausteine Myelin-assoziiertes Glycoprotein (MAG), Oligodendrozyten-Myelin Glycoprotein (OMgp) und Nogo A, befinden sich um die geschädigten Axonstellen und verhindern ebenfalls einen Regenerationsprozess im ZNS (Chen et al. 2000).

Insgesamt tragen also die grundlegenden Unterschiede auf zellulärer und humoraler Ebene dazu bei, dass die Wallersche Degeneration im ZNS hinausgezögert wird. Die inhibitorischen Myelinreste werden nicht rechtzeitig abgeräumt und es kann keine effektive Axonregeneration stattfinden. Dies führt letztendlich zu der Konsequenz, dass demyelinisierende Prozesse im ZNS zu einer starken Funktionseinschränkung des Axons führen (Gaudet et al. 2011).

1.2.2 Wallersche Degeneration in demyelinisierenden Erkrankungen

Die Erkenntnisse über den Ablauf der Wallerschen Degeneration sind essenziell für die Entwicklung therapeutischer Ansätze im Hinblick auf angeborene demyelinisierende Erkrankungen im ZNS, z. B. Multiple Sklerose (MS), oder im PNS, z. B. Morbus Charcot-Marie-Tooth (CMT) oder Guillain-Barré-Syndrom (GBS). Bei der Übertragung von Erkenntnissen der Insult-induzierten Wallerschen Degeneration auf die Prozesse der chronischen, meist genetisch vorprogrammierten, angeborenen demyelinisierenden Erkrankungen sind allerdings grundlegende Unterschiede zu beachten (Martini et al. 2008).

Die konkreten Pathogenesemechanismen der angeborenen demyelinisierenden Erkrankungen sind nicht bekannt. Man geht jedoch von Genmutationen in Myelinproteinen, Transkriptionsfaktoren, Molekülen der Proteinsynthese und Komponenten des axonalen Transportes aus. Diese Genmutationen wirken sich vermutlich auf die Stabilität von Proteininteraktionen, die Assoziation von Schwann-Zell-Molekülen mit dem Axon oder EZM-Komponenten und die intrazellulären Signalkaskaden der Schwann-Zellen aus. Auf zellulärer Ebene spielen hierbei in der frühen Phase der Degeneration vor allem die ortsständigen Makrophagen für die Myelinphagozytose die wichtigste Rolle. Da Axonläsionen nicht durch chronisch demyelinisierende Prozesse induziert werden, bleiben die Axone intakt und nur das geschädigte Myelin wird degradiert (Martini et al. 2008).

Allerdings gibt es auch Gemeinsamkeiten zwischen einer läsionsbedingten Wallerschen Degeneration und chronischen demyelinisierenden Erkrankungen. So findet z. B. im PNS bei beiden Formen eine Penetration der Schwann-Zell-Basallamina durch aktivierte Makrophagen statt (Martini et al. 2008).

Die genaue Klärung der Unterschiede und Gemeinsamkeiten zwischen einer läsionsinduzierten Wallerschen Degeneration und den angeborenen demyelinisierenden Prozessen ist essenziell für den klinischen Fortschritt im Hinblick auf therapeutische Ansätze und Prävention.

1.3 Zellkulturen und Zellkulturmedien

1.3.1 In vitro Co-Kultur-Modell nach Hann-Bonnekoh

Im Jahr 1989 wurde von Hann-Bonnekoh ein vereinfachtes Modell der Wallerschen Degeneration im PNS vorgestellt. Es besteht aus der Co-Kultivierung von peripheren Nervensegmenten der Maus zusammen mit Makrophagen, die mittels einer Peritoneallavage ebenfalls aus der Maus gewonnen werden. Inzwischen stellt dieses Modell eine seit langem etablierte und reproduzierbare Methode dar, um die Interaktionen zwischen degeneriertem Nervengewebe, Makrophagen, Schwann Zellen, Myelin und Axonen zu untersuchen (Hann-Bonnekoh et al. 1989). Mit der Methode ist es möglich, die Rolle der Makrophagen im Hinblick auf die Erkennung von degeneriertem Nervengewebe und dem anschließenden Phagozytoseprozess genauer zu charakterisieren. Zudem ermöglicht es die Beeinflussung der Makrophagen unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen sowohl durch als auch auf zelluläre und humorale Komponenten während der Wallerschen Degeneration. Erkenntnisse aus diesem Modellansatz lassen Rückschlüsse auf mögliche Mechanismen im Rahmen von demyelinisierenden Erkrankungen zu und haben somit einen entscheidenden Einfluss auf die Analyse und Entwicklung therapeutischer Wirkmechanismen (Hann-Bonnekoh et al. 1989).

1.3.2 Anwendung unterschiedlicher Zellkulturmedien

Für eine erfolgreiche und reproduzierbare Kultivierung von Gewebe und Zellen unter *in vitro*-Bedingungen ist die Auswahl eines geeigneten Kulturmediums von immenser Bedeutung, damit das Wachstumspotenzial, die Proliferation, die Differenzierung und die Viabilität dem physiologischen Organismus entsprechen.

Bei der Kultivierung von neuronalen Zellen sind bisher serumhaltige Kulturmedien die erste Wahl, wobei der am meisten eingesetzte Mediumzusatz fetales Kälberserum ist (FCS, *fetal calf serum*). FCS zeichnet sich durch einen hohen Anteil an Wachstums-, Anheftungs- und Proliferationsfaktoren aus und kann sowohl für tierische als auch für menschliche Zellkulturen eingesetzt werden. Ebenfalls im Einsatz sind die Seren weiterer Tierarten wie vom Pferd, vom Schwein oder der Ziege (Lindl 2000).

Allerdings bringt die Verwendung tierischer Seren beträchtliche Nachteile mit sich. Entscheidend ist hier die unbekannt Definition des Serums hinsichtlich seiner Zusammensetzung, was zu qualitativen und quantitativen Abweichungen der Versuchs-Ergebnisse führen kann (Brunner et al. 2010; Gstraunthaler 2003), insbesondere Schwankungen in unterschiedlichen Serum-Chargen wirken sich darauf aus. Weitere Störfaktoren bilden mögliche Endotoxine, mikrobielle Kontaminationen und Immunreaktionen gegen fremde Serumproteine (Bouwer et

al. 2010; Gstraunthaler 2003). Darüber hinaus stellen ethische Aspekte die Verwendung von tierischen Seren stark in Frage (Brunner et al. 2010; Gstraunthaler 2003).

Insbesondere die nicht-definierte Zusammensetzung von tierischen Seren führt zu Nachteilen, die es zum Ziel der Forschung werden lassen, Alternativen zu diesen serumhaltigen Kulturmedien zu finden. Hierfür werden serumfreie Medien entwickelt (Gstraunthaler 2003) und Serumersatzstoffe für eine Optimierung eingesetzt (Rauch et al. 2008). Vorteile der serumfreien Medien sind zunächst deren chemisch genau definierte Zusammensetzung und die damit einhergehende Verminderung von qualitativen und quantitativen Abweichungen. Eine hohe Zellspezifität ermöglicht eine gezielte Selektion, sodass spezifische Zellen stimuliert und zu einer Differenzierung aktiviert werden können (Gstraunthaler 2003). Für die Entwicklung von serumfreien Kulturmedien wird zunächst ein Basalmedium eingesetzt, das durch Zugabe von weiteren Faktoren wie z. B. Wachstumsfaktoren, Vitamine und Hormone ergänzt wird (näheres im Kapitel 4.3 Vergleich zwischen Makrophagen im serumhaltigen und serumfreien Kulturmedium). Um den Einsatz der Medien zu optimieren, wird das Medium genau auf die Spezies, Organe/Gewebe, Zelltypen und Krankheiten in seiner Zusammensetzung abgestimmt (Brunner et al. 2010).

1.4 Ziel der Arbeit

Die vorliegende Arbeit wird an dem beschriebenen Co-Kulturmodell von Nervengewebe und Peritonealzellen durchgeführt und soll sowohl das Migrationsverhalten als auch die Phagozytosefähigkeit, insbesondere der Peritonealmakrophagen, herausarbeiten. Im Vordergrund steht hierbei der Vergleich zwischen dem serumfreien Kulturmedium Panzerin und dem serumhaltigen Kulturmedium DMEM (*Dulbecco's modified Eagle Medium*). Es geht dabei um die Frage, welchen Einfluss die beiden Kulturmedien auf die Peritonealzellen während der Degeneration von Nerven *in-vitro* haben.

Die Auswertungen werden anhand von immunhistochemischen Nachweisen und histologischen Oil-Red-O-Färbungen (ORO) sowie mikroskopischen Methoden und fotografischer Dokumentation des co-kultivierten Nervengewebes durchgeführt.

Einen weiteren Bestandteil dieser Arbeit stellt die Charakterisierung der Ausgangspopulation der Peritonealzellen mittels einer FACS-Analyse und Immunhistochemien an Zytocentrifugaten dar. Diese Charakterisierung wird durch die Kultivierung der Peritonealzellen in den Kulturmedien Panzerin und DMEM innerhalb von 3D-Migrationskammern ergänzt.

Anhand der Experimente wird der unterschiedliche Einfluss der Kulturmedien DMEM und Panserin im Hinblick auf die Zellviabilität, Zellgröße, Zellanzahl und weitere Ressourcen der Peritonealzellen herausgearbeitet. Insgesamt zeigen diese Ergebnisse die genauere Bewertung des serumfreien Kulturmediums Panserin und dessen möglichen gezielten Einsatz im Vergleich zum herkömmlichen serumhaltigen DMEM.

2. Material und Methoden

2.1 Übersicht der angewendeten Methoden

Die nachfolgenden Experimentreihen verwenden das *in-vitro*-Co-Kultur-Modell für die Wallersche Degeneration nach Hann-Bonnekoh (1989) und haben die Erzeugung von Peritonealmakrophagen mit anschließender Co-Kultivierung mit peripheren Nervenstücken zum Ziel. Im Vordergrund für diese Arbeit steht hierbei der Einfluss des serumfreien Kulturmedium Panserin im Vergleich zum herkömmlich verwendeten, serumhaltigen Kulturmedium DMEM auf diese Co-Kulturen.

Zu Beginn wird bei den Versuchstieren mittels einer Thioglykollatinjektion eine Peritonitis mit der daraus resultierenden Anhebung der Makrophagenanzahl verursacht. Anschließend werden diese Peritonealzellen und gleichzeitig die Ischiasnerven entnommen und für eine 8-tägige Co-Kultivierung in den beiden unterschiedlichen Nährmedien angesetzt. Nach der Kultivierung werden die Nervenstücke in Form von Kryostatschnitten aufbereitet und anhand von Immunhistochemie, Oil-Red-O- und Doppelimmunfluoreszenz-Färbungen detailliert analysiert.

In einem weiteren experimentellen Ansatz werden die aus der Peritoneallavage gewonnenen Zellen in drei Anteile aufgeteilt. Für einen Teil erfolgt die Kultivierung in 3D-Migrationskammern, mit dem zweiten Teil wird eine Durchflusszytometrie (FACS-Analyse) und mit dem dritten Teil eine Zytozentrifugation zur immunhistochemischen Analyse der Zellsuspension durchgeführt.

2.2 Versuchstiere

Für die experimentelle Durchführung dieser Arbeit werden weibliche, durchschnittlich 2-3 Monate alte Mäuse vom C57-B6/J-Stamm verwendet. Genehmigt wurden die Experimente durch die Behörde LAVES (Niedersächsisches Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, Oldenburg) mit der Tierversuchsnummer AZ: 33.42502-05-A-006/07.

2.3 Gewebekulturen

2.3.1 Thioglykollatinjektion

Zu Beginn des Experimentes werden einer Maus intraperitoneal 0,5 ml einer Thioglykollat-Lösung (2,9% in Aqua dest.; "NIH thioglycollate Broth"; Difco; 225710) injiziert. Diese Injektion verursacht eine chemische Peritonitis und führt somit zu einer Stimulation der Makrophagen, d. h. einer erheblichen Erhöhung ihrer Zellzahl innerhalb der Peritonealhöhle. Diese Zellen dienen zur späteren Co-Kultivierung mit den Ischiasnerven der Versuchstiere.

2.3.2 Peritoneallavage

Nach einer viertägigen Inkubationszeit des Thioglykollats (TG) innerhalb der Bauchhöhle werden die Mäuse mittels Diethylether narkotisiert und nach Wirkungseintritt der Narkose wird das Tier dekapitiert. Nach gründlichem Ausbluten wird anschließend ein Längsschnitt durch die Oberhaut des Bauchfells durchgeführt, wobei das Peritoneum zunächst unversehrt bleibt. Es folgt dann ein kleiner Anschnitt in das Peritoneum, um dieses für die Lavage zu eröffnen. Durch diesen wird über eine Pipette 2 ml eiskaltes PBS (phosphatgepufferte Saline) in den Bauchraum des Versuchstieres gegeben, mit Hilfe der Pipette verteilt und durch gründliches Durchspülen werden die dort befindlichen Zellen gelöst. Im Anschluss wird die Spülflüssigkeit über die Pipette wieder aufgenommen. Die hierbei gewonnene Zellsuspension wird in zwei Probenröhrchen gleichmäßig aufgeteilt und für fünf Minuten bei 1000 U zentrifugiert.

2.3.3 Entnahme der Ischiasnerven

Die nächsten Schritte des Experimentes sind die Präparation und die entsprechende Aufbereitung der beidseitigen Ischiasnerven der Versuchstiere. Hierzu werden die Ischiasnerven als Ganzes entnommen und dann in ca. 3 mm große Einzelsegmente geschnitten. Anschließend wird von diesen Einzelstücken das umgebende Perineurium abpräpariert, sodass im weiteren Experimentverlauf Makrophagen und weitere migrationsfähige Zellen ohne Hindernis in das Nervengewebe einwandern können. Die Nervenstücke werden unter mikroskopischer Kontrolle auf sterile, runde Deckgläschen (\varnothing 9 mm; Menzel) aufgesetzt.

2.4 Aufarbeitung des degenerierten Nervengewebes

2.4.1 Co-Kultivierung der Peritonealmakrophagen und Ischiasnervensegmente

Nach der Zentrifugation werden die Peritonealmakrophagen als Zellsuspension in Lumox-Schalen (Petriperm; A 2212; Greiner Bio-One) ausplattiert und die Deckgläschen werden, mit den Nervensegmenten nach unten weisend, auf den Makrophagenrasen in diese Schalen eingesetzt. In jeweils zwei Schalen erfolgt die Kultivierung mit dem Zellkulturmedium Panserin und in zwei weiteren Schalen die Kultivierung mit dem Zellkulturmedium DMEM. Insgesamt werden diese Experimente dreimal durchgeführt.

2.4.2 Zusammensetzung der Zellkulturmedien

Die Co-Kultivierung der Nervensegmentstücke mit den Peritonealzellen erfolgt zum einen mit dem serumfreien Kulturmedium Panserin und zum anderen mit dem serumhaltigen Kulturmedium DMEM.

Das Kulturmedium Panserin 401, als serumfreies Medium, basiert auf dem Zellkulturmedium *Iscove's modified Eagle Medium* (IMEM). Dieses serumfreie Medium beinhaltet diverse Spurenelemente, Albumin, Cholesterin, Sojalipide und Vitamine. Da keine Wachstums- oder Anheftungsfaktoren vorhanden sind, wird das Medium für die folgenden Versuchsdurchführungen durch weitere Faktoren ergänzt. Die Zugabe von N₂-Supplement verbessert hierbei die Bedingungen für das Nervengewebe. Für eine weitere Unterstützung des Zellwachstums sorgt der Zusatz von essenziellen und nicht-essenziellen Aminosäuren (Tab. 1).

Das Kulturmedium *Dulbecco's modified Eagle's Medium* (DMEM) ist als serumhaltiges Medium eine Modifizierung des *Basal Medium Eagle* (BME). Diese Modifizierung zeichnet sich durch eine vierfach erhöhte Konzentration an Aminosäuren und Vitaminen aus. Dieser Kulturmedienansatz ist herstellerseits bereits mit Glucose ergänzt, um die allgemeinen Wachstumsbedingungen zu verbessern. Als Serum wird hier fetales Kälberserum (10% FCS) zugesetzt, um Wachstum, Proliferation, Differenzierung und die allgemeine Vitalität der Zellen zu gewährleisten. Die Ergänzung durch L-Glutamin dient neben Glucose ebenfalls der Zellvitalität (Tab. 1).

Bei beiden Kulturmedienansätzen wird eine Mischung aus Penicillin/Streptomycin als Antibiotikum hinzugefügt, was einer bakteriellen Verunreinigung vorbeugt. Zusätzlich wird A-

raC-hydrochlorid (*cytosine arabinoside hydrochloride*) eingesetzt, um die Entwicklung von Fibroblasten und anderen proliferierenden Zellen zu unterdrücken (Tab. 1).

Die Kultivierungsdauer beträgt insgesamt acht Tage, wobei an jedem zweiten Tag ein Mediumwechsel nach mikroskopischer Kontrolle erfolgt. Hierbei werden die Veränderungen im Hinblick auf Zellzahlen und Zellgrößen für eine spätere Analyse fotografisch festgehalten. Am achten Kultivierungstag werden die Nervenstücke entnommen und in PBS gespült. Für die spätere Kryopreservation werden die Nervensegmente in OCT/Compound eingebettet und mit Hilfe von flüssigem Stickstoff eingefroren.

Tab. 1: Zusammensetzung der Zellkulturmedien

Zellkulturmedium	Mengenangabe:	Zellkulturmedium	Mengenangabe:
Panserin:		DMEM:	
Panserin 401	98 ml	DMEM + 4,5% Glucose	87 ml
+ N ₂ Supplement Insulin, humTransferrin, Progesteron, Putrascin, Selenit	0,5 ml	FCS (<i>fetal calf serum</i>)	10 ml
+ essenzielle Aminosäuren	1 ml	-	-
+ nicht-essenzielle Aminosäuren	0,5 ml	-	-
-	-	L-Glutamin	2 ml aus 200 mM
+ Penicillin/ Streptomycin	1 ml	+ Penicillin/ Streptomycin	1 ml
+ AraC-hydrochlorid (<i>cytosine arabinoside hydrochloride</i>)	100 µl	+ AraC-hydrochlorid (<i>cytosine arabinoside hydrochloride</i>)	100 µl

Detaillierte Herstellerangaben befinden sich in Tabelle 4 im Anhang.

2.4.3 Kryostatschnitte

Das in OCT/Compound eingebettete Nervengewebe wird nun weiter zu Kryostatschnitten verarbeitet. Dazu werden am Kryostat (Fa. Reichert-Jung, 2800 Frigocut E) ca. 7 µm dicke Gewebeschnitte angefertigt und auf Objektträger aufgenommen. Hierbei werden die Kryostatschnitte in Serien auf aufeinander folgende Objektträger aufgenommen, sodass Folgeschnitte miteinander kombiniert werden können. Somit ist eine Überlagerung der methodisch verschiedenen behandelten Objektträger, wie z. B. eine Immunhistochemie mit einer ORO-Färbung, möglich. Ein Teil der Objektträger wird anschließend in eiskaltem Azeton bei -20 °C fixiert. Die restlichen Schnitte bleiben zunächst unfixiert. Aufbewahrt werden alle Kryostatschnitte bei -20 °C. Mittels Immunhistochemie-, ORO- und Doppel-Immunfluoreszenzfärbungen wird das degenerierte Nervengewebe weiter bearbeitet.

2.5 Immunhistochemie

2.5.1 Funktionsweise der Immunhistochemie

Bei den immunhistochemischen Färbungen an degeneriertem Nervengewebe wird die hohe Spezifität und Affinität von Primärantikörpern zu ihren jeweiligen Antigenen genutzt, um das Verteilungsmuster dieser Antigene nachzuweisen. Durch diesen Nachweis der spezifischen Antigene sind in den Experimenten zu dieser Arbeit Rückschlüsse auf die vorhandenen Zellpopulationen auf dem co-kultivierten Nervengewebe möglich.

Die angewendete immunhistochemische Färbung basiert auf dem Prinzip der Streptavidin-Biotin-Methode und anschließender DAB-Visualisierung (3,3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride hydrate; Sigma; D5637).

Um unspezifischen Bindungen des Primärantikörpers an Proteinstrukturen vorzubeugen, wird das Nervengewebe zunächst in einem Blockierungsschritt mit 10%igem Serum, das aus der Spezies des Sekundärantikörpers abstammt, inkubiert. Für unsere Antikörper-Nachweise wird daher 10%iges Ziegen Serum eingesetzt.

Es folgt die Inkubation des jeweiligen Primärantikörpers, der spezifisch an seine entsprechende Epitopstelle des nachzuweisenden Antigens bindet. Im nachfolgenden Schritt wird ein Sekundärantikörper eingesetzt, der sich gegen Immunglobuline einer bestimmten Tierart richtet. Da alle hier verwendeten Primärantikörper aus der Ratte stammen, kann ein und derselbe gegen Ratte gerichtete Sekundärantikörper eingesetzt werden. Durch seine Bindung markiert der Sekundärantikörper den Primärantikörper. Gleichzeitig ist dieser Sekundärantikörper ein sog. biotinylierter Antikörper, d.h. er ist mit einem Marker-Protein (Biotin) gekoppelt, was relevant für die daran anschließende Streptavidin-Biotin-Methode ist. In einem dritten Schritt dient ein Streptavidin-Komplex zur Verstärkung des Biotin-Markers. Dieses Prinzip basiert auf der hohen Affinität von Streptavidin zu Biotin und es kommt zu einer Komplexbildung der beiden Substrate. Die hohe Sensitivität dieser Methode begründet sich aus drei Bindungsstellen des Streptavidin, die an weitere biotinylierte Sekundärantikörper binden können. Anschließend werden die Biotin-Streptavidin-Komplexe über eine DAB-Markierung visualisiert. Dies resultiert in einer braunen Darstellung der positiven Zellen, welche die zu detektierenden Antigenstrukturen aufweisen.

2.5.2 Übersicht über Antigene und die Primärantikörper

In der Tabelle 2 ist eine Übersicht über die für die immunhistochemischen Färbungen angewendeten verschiedenen Primärantikörper sowie die jeweils von ihnen detektierten Zellentypen dargestellt.

Tab. 2: Übersicht der Primärantikörper der Immunhistochemien

Primärantikörper/Antigen	Detektion:
Mac-1 = CD 11b	- myeloide Zellen - NK-Zellen
Mac-3 = CD107b/LAMP-2	- Maus-Phagozytenzellen - aktivierte Thrombozyten - aktivierte neutrophile Granulozyten - aktivierte T-Zellen - Endothelzellen
CD 3	- Thymozyten - T-Zellen
CD 34	- hämatopoetische Vorläuferzellen - Kapillarendothelzellen - Fibroblasten
CD 68 = Mikrosialin/Ki-M6/Ki-M7	- Phagozytosemarker - Monozyten/Makrophagen - Neutrophile/Basophile Granulozyten - große Lymphozyten
CD 204	- myeloide Zellen - Makrophagen (M2-Typ) - negativ-beladene Makromoleküle
F4/80	- aktivierte Maus-Makrophagen - aktivierte Mikrogliazellen

Weitere Angaben zu den Herstellern, dem Verdünnungsverhältnis und dem jeweiligen Sekundärantikörper befinden sich in den Tabellen 5, 6 und 7 im Anhang.

2.5.3 Durchführung der Immunhistochemie

Die jeweilige immunhistochemische Färbung mit entsprechendem Primärantikörper wird sowohl an den azetonfixierten Schnitten mit degeneriertem Nervengewebe aus den Co-Kulturen als auch an den azetonfixierten Zytozentrifugaten durchgeführt.

Zunächst werden die Objektträger bei Raumtemperatur in PBS inkubiert, dann für zehn Minuten in eiskaltem PBS plus 0,3% H₂O₂ (Wasserstoffperoxid 30%; Merck; 1.08597) gequentscht und dreimal mit PBS gespült. Es schließt sich ein Blockierungsschritt mit 10%igen Ziegen-Serum in PBS an, das nach einer Inkubationszeit von zehn Minuten abgekippt wird. Direkt im Anschluss folgt, ohne mit PBS zu spülen, das Auftragen des jeweiligen Primärantikörpers im angegebenen Verdünnungsverhältnis in PBS (Tab. 5). Die Inkubation erfolgt über Nacht im Kühlschrank. Am nächsten Tag wird zuerst dreimal mit PBS gespült. Als nächstes wird die Inkubation des jeweiligen Sekundärantikörpers, 1:500 verdünnt in PBS, für ca. 1-2 Stunden bei Raumtemperatur durchgeführt. Hier schließt sich ebenfalls ein dreimaliger PBS-Spülvorgang an. Für die nun folgende Streptavidin-Biotin-Methode wird ein sogenannter „POX“-Komplex (Streptavidin; E2886; Sigma) angewendet. Hierfür werden die Objektträger für eine weitere Stunde mit dem POX-Komplex im Verdünnungsverhältnis von 1:1000 in PBS inkubiert und wiederum dreimal mit PBS gespült. Die Objektträger werden mittels DAB-Methode visualisiert. Hierzu wird eine DAB-Stammlösung aus 1 ml DAB, 20 µl H₂O₂ und 50 ml PBS angesetzt. Die Inkubationszeit im DAB variiert in Abhängigkeit von der Primärantikörperfärbung von ca. 2 bis 10 Minuten. Im Anschluss werden die Objektträger nach einer konventionellen Hämalaun-Gegenfärbung mit wässrigem Eindeckmedium (Microscopy Aquatex[®]; Merck; HC 109850) eingedeckt.

Abschließend werden von den immunhistochemisch gefärbten Nervenstücken Fotos angefertigt, die hinsichtlich der verschiedenen Zellpopulationen und Zellanzahlen mit einer computergestützten Software ausgewertet werden.

2.6 Oil-Red-O

2.6.1 Funktionsweise der Oil-Red-O-Färbung

Mit Hilfe einer Oil-Red-O-Färbung (ORO-Färbung) ist es möglich, den Lipidgehalt einer Zelle darzustellen, da der Farbstoff ORO Neutralfette, vor allem Triacylglycerine, orange-rot anfärbt. Die Zellen absorbieren hierbei die ORO-Färbelösung und der Lipidgehalt wird in Form von intrazellulären, perinukleären hellroten Tropfen nachgewiesen (Kinkel et al. 2004). Da phagozytiertes, verdautes Myelin zu einem Hauptanteil aus Lipiden besteht, ist es mittels der ORO-Färbemethode möglich, dieses phagozytierte Myelin innerhalb der phagozytischen Zellen nachzuweisen und zu quantifizieren (Koopman et al. 2001).

2.6.2 Durchführung der Oil-Red-O-Färbung

Die nachfolgend beschriebene ORO-Färbemethode richtet sich nach dem modifizierten Protokoll der ORO/TEP- Methode von Koopman und Kollegen (Koopman et al. 2001).

Für die Durchführung der ORO-Färbung wird zunächst eine Stammlösung bestehend aus ORO in Pulverform (Sigma; O-0625), Triethylphosphat (Sigma; T61107) und Aqua dest. angesetzt. Dazu werden 500 mg ORO-Pulver in Triethylphosphat und Aqua dest. in einem Verhältnis von 3:2 gelöst und für ca. eine Stunde auf dem Magnetrührer gerührt. Bei der angewendeten ORO/TEP-Methode nach Koopman et al. (2001) fungiert das Triethylphosphat als Lösungsträger für das ORO anstelle des konventionell verwendeten 2-Propanols.

Aufgrund von Auskristallisationsproblemen wird die Stammlösung bereits einen Tag vor dem eigentlichen Gebrauch angesetzt.

Die Gebrauchslösung besteht aus einem Gemisch aus der angesetzten Stammlösung mit Aqua dest. (wiederum im Verhältnis von 3:2). Hiervon werden 20 ml anschließend mittels Einmalspritzen-Filter (0,45 µm) filtriert, um ausfallende Kristalle aus der Lösung zu eliminieren.

Die ORO-Färbemethode wird an unfixierten Kryoschnitten der Nervenstücke aus den Gewebe-Co-Kulturen durchgeführt. Daher erfolgt zunächst eine zehnmünütige Fixierung mit Baker's Formol (200 ml Formol 37% + 540 ml Aqua dest. + 6,4 g Calciumchlorid). Hiernach wird dreimal mit Leitungswasser und dann zweimal mit Aqua dest. gespült. Anschließend werden die Kryostatschnitte für zehn Minuten in der ORO-Gebrauchslösung inkubiert und zum Differenzieren für einige Sekunden in 50%igem 2-Propanol eingetaucht. Nach dreimaligem Spülen mit Aqua dest. werden die Objektträger mit Aquamount eingedeckt.

Anhand dieser Färbung werden die Anzahl der ORO-positiven Zelleinschlüsse und die Größe der ORO-positiven Zellen ausgewertet. Hierzu werden zunächst Fotos der ORO-Färbungen angefertigt, die mit Hilfe des Computerprogramms AnalySIS in Falschfarben (grün) umgewandelt werden, sodass sie mit den Fotos der immunhistochemischen Färbungen der Folge-Objekträger (braun) zu Überlagerungen mit den Fotos der ORO-Objekträger besser verwendet werden können. Die Fotos werden über die Mergfunktion im Programm "Photoshop" weiter verarbeitet und anschließend manuell überlagert.

2.7 Doppelimmunhistochemie

2.7.1 Funktionsweise der Doppelimmunhistochemie

Mit Hilfe einer Doppelimmunhistochemiefärbung ist es möglich, dass Strukturen visualisiert werden, die von zwei verschiedenen Primärantikörpern detektiert werden. Bei der für diese Arbeit angewendeten Methode ist der Antikörper jeweils an einen fluoreszierenden Sekundärantikörper gekoppelt, welcher die positiven Strukturen anfärbt. Bei diesen Experimenten werden als Primärantikörper F4/80 und S100 angewendet. Der Antikörper F4/80 (Rat-anti-mouse; MCA P497; Serotec) detektiert Mausmakrophagen und Mikrogliazellen und stammt aus Rattengewebe. An ihn wird an die fluoreszierende Substanz CY-2 (Goat-anti-rat; 112-225-003; Dianova) gekoppelt, die den positiven Zellenachweis in grüner Farbe darstellt. Der zweite Färbeschritt wird mit dem Primärantikörper S100 (polyclonal, rabbit Anti-S100, Dako Z0311) durchgeführt, der Schwann-Zellen markiert und aus dem Kaninchen stammt. Hieran wird der fluoreszierende Farbstoff CY-3 (Goat-anti-rabbit; 111-065-144; Dianova) gekoppelt, der einen positiven Zellenachweis in roter Farbe ermöglicht.

2.7.2 Durchführung der Doppelimmunhistochemie von F4/80 und S100

Die Doppelimmunhistochemiefärbungen der Antikörper F4/80 und S100 werden an azetonfixierten Schnitten des degenerierten Nervengewebes durchgeführt. Die Objekträger werden zunächst während der Vorbereitungszeit in einer Küvette mit PBS inkubiert und anschließend mit 10%igem Ziegen Serum blockiert. Nach 20-minütiger Inkubation wird das Serum abgkippt und der Antikörper F4/80 wird in einer 1:50-Verdünnung mit PBS aufgetragen. Die Inkubation erfolgt über Nacht im Kühlschrank. Am nächsten Tag werden die Objekträger

dreimal mit PBS gespült und es folgt die Inkubation mit CY-2 in einem Verdünnungsverhältnis von 1:100 in PBS für 45 Minuten in einer abgedunkelten Feuchtkammer. Danach wird dreimal mit PBS gespült. Die Ergebnisse der F4/80 Antikörperfärbung werden am Fluoreszenzmikroskop fotodokumentarisch festgehalten.

Im Anschluss werden dieselben Objektträger zunächst in einer PBS-Küvette aufbewahrt und anschließend mit dem Antikörper S100 in einem Verdünnungsverhältnis von 1:200 in PBS erneut über Nacht in einer abgedunkelten Feuchtkammer im Kühlschrank inkubiert. Am Folgetag werden die Objektträger dreimal mit PBS gespült und mit CY-3, in einem Verhältnis von 1:100 in PBS verdünnt, gekoppelt. Diese Inkubation beträgt 30 Minuten und wird ebenfalls in einer abgedunkelten Feuchtkammer durchgeführt. Nach dreimal Spülen in PBS werden die Schnitte im Fluoreszenzmikroskop betrachtet und der Erfolg der Doppelmarkierung beurteilt. Von denselben Gewebe-Ausschnitten werden sowohl grün fluoreszierende Fotos mit dem F4/80-Marker gemacht als auch die rot markierten S100-positiven Zellen fotografiert. Für die weitere Auswertung werden die Fotos über die Mergefunktion im Photoshop bearbeitet und anschließend über die manuelle Funktion überlagert. Anhand der Doppelfärbung wird festgestellt, ob die beiden Antigene S100 und F4/80 miteinander überlagert sind.

2.8 Analyse der Makrophagen und migrationsfähigen Zellen

2.8.1 Zellzählung der Peritoneallavage

Bevor die Zellsuspension der Peritoneallavage weiter verwendet wird, erfolgt zunächst eine Zellzählung mit Hilfe eines CASY TTC-Zählgeräts (Schärfe System GmbH, Reutlingen). Die ca. 2 ml Zellsuspension aus der Peritoneallavage werden in drei Aliquots aufgeteilt und bei 1000 U/min für fünf Minuten zentrifugiert. Im Anschluss werden aus jedem Aliquot jeweils 50 µl der Zellsuspension auf 10 ml Messpuffer gegeben.

Die Zellzählung wird in Zellen pro µl angegeben und ergibt

für die 3D-Migrationskammern 3,2 Millionen Zellen/µl,

für die Zytozentrifugation 3,02 Millionen Zellen/µl und

für die FACS-Analyse 2,6 Millionen Zellen/µl.

Die jeweiligen Zellsuspensionen werden nun zur Kultivierung in 3D-Kammern, zur Zytozentrifugation und zur FACS-Analyse weiterverarbeitet.

2.8.2 Kultivierung in 3D-Migrationskammern

Die Zellen eines der oben bereits erwähnten Aliquots werden zur genaueren Analyse der migrationsfähigen Peritonealzellen in 3D-Migrationskammern kultiviert. Unter dem Einfluss der beiden Zellkulturmedien DMEM und Panserin werden sie im Hinblick auf ihr Migrationsverhalten und auf ihre Anzahl und Größe hin analysiert.

Nach der Zentrifugation für fünf Minuten bei 1000 U wird der Überstand verworfen und ein Gemisch der beiden Medien DMEM und Panserin im Verhältnis 1:1 zu je 100 µl hinzugegeben. Danach werden die am Tag zuvor bereits im CO₂-Schrank vorinkubierten, kollagenbeschichteten 3D-Migrationskammern (µ-Slide Chemotaxis^{3D}; ibidi, Martinsried), wie in Abb. 1 schematisch dargestellt, mit Zellsuspension und Medien befüllt.

Genau nach Vorgabe des Herstellers Ibidi werden als Erstes die Mittelstreifen der Kammer-systeme vorsichtig mit der aufbereiteten Zellsuspension befüllt (Abb. 1). Zunächst werden die Zellen aus der Peritoneallavage (90 µl) in einem Gemisch der beiden verschiedenen Zellkultur-Medien aufgenommen. Danach wird eine Mischung aus einer Kollagen-Suspension (150 µl; Advanced Biomatrix, Nr. 5005-A) und einer Natriumhydrogencarbonat-Lösung (10 µl; Sigma, S8761) hinzugefügt. Dieses Zellen-Kollagen-Gemisch wird für eine halbe Stunde im Brutschrank inkubiert, damit es etwas aushärtet und die Zellen sich innerhalb des Streifens absetzen können. Beim anschließenden Befüllen der seitlichen Mediumkammern wird dadurch das Wegdriften der Zellen verhindert.

Anschließend wird das erste Kammersystem zu beiden Seiten mit dem Kulturmedium Panserin (Kontrolle 1), das zweite Kammersystem beidseits mit dem Kulturmedium DMEM (Kontrolle 2) und das dritte Kammersystem rechtsseitig mit DMEM und linksseitig mit Panserin nach Herstellerangaben befüllt. Auf diese Weise entstehen zunächst zwei Kontroll-Kammern sowie die dritte Kammer als Experiment. Insgesamt gibt es pro experimentellen Durchgang 5 Platten mit also 5 Experiment-Kammern und den zugehörigen Kontrollen. Die Kultivierungszeit in den Kammern beträgt sieben Tage in einem Begasungsbrutschrank bei 10% CO₂.

Während der laufenden Kultivierungszeit werden die Kammern täglich lichtmikroskopisch kontrolliert. Die Anzahl von mobilen und sesshaften Zellen wird in den vom Hersteller definierten Beobachtungsarealen rechts und links vom Kollagenstreifen gezählt (Abb. 2) und die Entwicklung der Zellgrößen wird zunächst auf Fotos festgehalten.

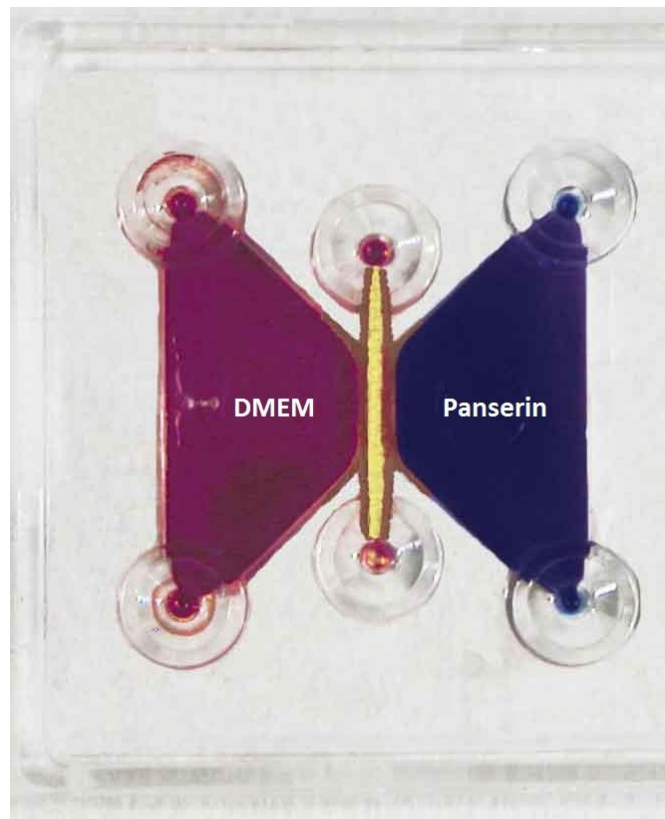


Abb. 1: In der Abbildung wird eine einzelne Kammer der kollagenbeschichteten 3D-Migrationskammern dargestellt. Das Kammerensystem nimmt $\frac{1}{3}$ Größe eines Objektträgers ein und dieser besteht grundsätzlich aus drei solchen nebeneinander liegenden Kammern. Der rotgefärbte Kammerabschnitt stellt die Befüllung mit dem Kulturmedium DMEM und der blaugefärbte Abschnitt stellt die Befüllung mit dem Kulturmedium Panserin dar. Der gelbgefärbte Abschnitt zeigt den Mittelstreifen des Kammerensystems, welcher die Zellsuspension enthält.

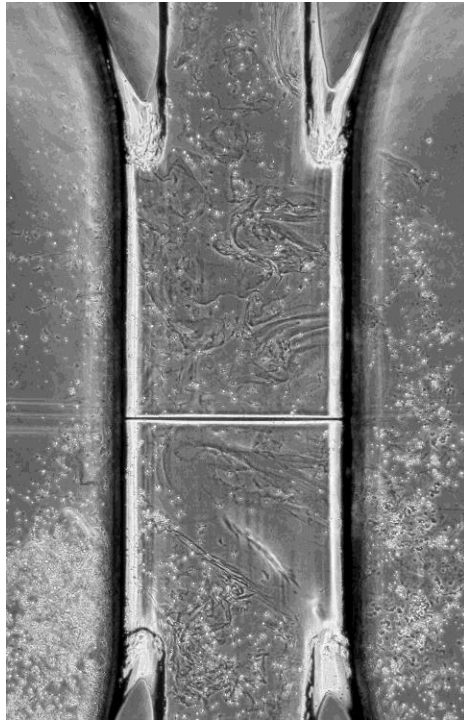


Abb. 2: Diese Abbildung zeigt beispielhaft den Mittelstreifen im mikroskopischen Überblick (10x Vergrößerung) einer Zellkammer des 3D-Kammersystems. Die Schlieren im Mittelstreifen sind auf das Collagen zurückzuführen. Die Zellen rechts und links vom Mittelstreifen sind bereits ausgewandert.

2.8.3 FACS-Analyse

Für die FACS-Analyse der verschiedenen Zellpopulationen wird das dritte Aliquot aus der gewonnenen Peritoneallavage verwendet und folgendermaßen aufbereitet:

Die Zellmenge wird in 100 µl FACS-Puffer (PBS+2% FCS) unter Zugabe von 5 µl Fc-Block (TruStain fcX™ (anti-mouse CD16/32) Antibody; 101320; Biolegend) resuspendiert, für 20 Minuten inkubiert und in drei Aliquots aufgeteilt. Im Anschluss werden die folgenden drei verschiedenen Antikörperkombinationen angefertigt:

Tab. 3: Übersicht der Antikörperkombinationen

CD 19	CD 19	CD 19
CD 8	GR 1	NK I.I.
CD 3	B 220	CXCR3/CD 183
CD 4	CD 11b	CD 11b
CD 69	CD 86	CD 27
TCR/H97-597	MHC-II	CD 3

Die genauen Angaben zu den gekoppelten Farbstoffen an die jeweiligen Antikörper befinden sich in Tabelle 8 im Anhang.

Die drei in der Tabelle aufgelisteten Antikörperkombinationen bestehen aus jeweils 70 µl FACS-Puffer und 0,3 µl des jeweiligen Antikörpers, wobei die Antikörper in einer 1:200-Verdünnung in FACS-Puffer vorliegen. Jeder Antikörper ist mit einem anderen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt (Tab. 8 im Anhang).

Im nachfolgenden Schritt wird auf einer 96 well-Platte die erste Antikörperkombination auf die erste Zellfraktion, die zweite Antikörperkombination auf die zweite Zellfraktion usw. gegeben. Danach wird für 20 Minuten bei +4 °C im Dunklen inkubiert. Es schließen sich zwei Waschvorgänge mit FACS-Puffer an, mit dazwischen liegenden Zentrifugationsvorgängen bei 1200 U für fünf Minuten. Abschließend werden die Gemische in FACS-Puffer resuspen-

diert und im FACS-Gerät analysiert (BD FACS Canto II von Beckton Dickinson mit entsprechender Hersteller-Software).

2.8.4 Zytozentrifugation

Neben der FACS-Analyse der verschiedenen Zellpopulationen wird eine Zytozentrifugation am letzten Drittel der Suspension aus Peritonealzellen durchgeführt. Hierbei wird die Zellsuspension in einem Verhältnis von 1:7 in HBSS (Hank's balanced salt solution; ohne Phenolrot; 14065-049; Gibco) in Eppendorfgläsern gemischt und anschließend in den Trichtereinfüllstutzen der Apparatur einpipettiert (Shandon Cytospin 4). Es schließt sich eine Zentrifugation bei 1000 rpm für fünf Minuten an. Die Objektträger mit der aufzentrifugierten Zellsuspension werden in eiskaltem Azeton fixiert und bei -20 °C aufbewahrt. Im weiteren Verlauf werden an den Zytozentrifugaten verschiedene immunhistochemische Nachweise für unterschiedliche Zellpopulationen durchgeführt, sowie eine Chloracetatesterasefärbung (vgl. Kap. 2.9) zum Nachweis von Mastzellen und Granulozyten und eine Toluidinblau-Färbung (vgl. Kap. 2.9) zum getrennten Nachweis von Mastzellen.

2.9 Chloracetatesterasefärbung und Toluidinblau-Färbung

2.9.1 Chloracetatesterasefärbung

Durch die Anfärbungen von Chloracetatesterase können Mastzellen, Promyelozyten und neutrophile Granulozyten nachgewiesen werden. Das in hoher Aktivität vorkommende Enzym Chloracetatesterase wird detektiert und die chloracetatesterasepositiven Zellen erscheinen rötlich angefärbt. Eine geringere bis gar keine Enzymaktivität und somit keinen positiven Zellenachweis zeigen Lymphozyten, Plasmazellen, Monozyten und basophile Granulozyten.

Der Ansatz der Chloracetatesterasefärbelösung wird mit einem Farbe-Kit (Sigma, 91C-1KT) nach folgendem Hersteller-Protokoll durchgeführt:

Zunächst wird ein Gemisch aus 0,5 ml Natrium-Nitrit-Lösung (Art. 6544; Merck) und 0,5 ml Fast-Red-Violett (LB Base Solution; Lot O81M4337; Sigma-Aldrich) vorbereitet und dieses zu 20 ml Aqua bidest. (37 °C) hinzugegeben. Hierzu werden 2,5 ml Trizma-Puffer (6,3 Konzentrat; Lot O71M4371; Sigma-Aldrich) und 0,5 ml Naphtol-AS-D-Chloracetat-Lösung (Lot

O71M4350; Sigma-Aldrich) beigemischt. An dieser Stelle ist auf eine Rotfärbung der Lösung zu achten.

In der angesetzten Färbelösung werden nun die jeweiligen Objektträger aus der Zytozentrifugationsreihe für 20 Minuten inkubiert und mit Aqua bidest. gespült. Danach folgt eine Kernfärbung mit Mayers Hämalaun (1.09249.0500; Merck) mit einer Inkubationszeit von 30 Sekunden und ein erneuter Spülgang mit Aqua bidest.. Die Objektträger werden nun zum Bläuen für weitere 5-10 Minuten unter fließendes Leitungswasser gestellt. Anschließend werden die Objektträger zur Konservierung mit wässrigem Eindeckmedium (Shandon Immu-Mount; Ref. 9990402; Thermo Scientific) eingedeckt. Für die abschließende Auswertung werden Fotos der Objektträger angefertigt und mittels des Computerprogramms AnalySIS wird die Anzahl chloracetatesterase-positiven Zellen ausgezählt.

2.9.2 Toluidinfärbung

Mit Hilfe einer Toluidinfärbung ist es möglich, speziell Mastzellen nachzuweisen.

Für die Durchführung der Toluidinfärbung an den Objektträgern der Zytozentrifugaten wird zunächst eine Lösung bestehend aus 0,1% Toluidinblau (115930; Merck) in wässriger Lösung angesetzt. Die Objektträger der Zytozentrifugate werden anschließend für eine Stunde in der Toluidinlösung inkubiert, in Aqua dest. gespült und mit Aquamount eingedeckt. Auch hier werden Fotos der Schnitte angefertigt, auf denen die die Anzahl der toluidin-positiven Zellen mit dem Computerprogramm AnalySIS ausgewertet werden.

2.10 Auswertung

2.10.1 Fotografische und computergestützte Auswertung

Für die fotografischen Dokumentationen mit anschließender computergestützter Auswertung werden die folgenden Geräte eingesetzt:

- Zellkulturmikroskop (Typ Olympus IX51) mit Digitalkamera (Typ Olympus C-4040 Zoom);
- Lichtmikroskop (Typ Olympus BX40) mit entsprechender Kamera (Colorview II) und der Computersoftware Cell A (Olympus Soft Imaging Solutions; Münster);
- Lichtmikroskop (Typ Olympus BX51) mit entsprechender Kamera (Typ Olympus DP71) und der Computersoftware Cell F (Olympus Soft Imaging Solutions; Münster).

Teilweise werden die Fotos über die Mergefunktion in Photoshop (Adobe Photoshop CS4) weiterbearbeitet. Die Fotos, die während der Kultivierung der Co-Kulturen und der Zellen in den Ibidi-Kammern aufgenommen werden, werden an einem Zellkulturmikroskop (Typ Olympus IX51) mit der Digitalkamera (Typ Olympus C-4040 Zoom) angefertigt. Die anschließende Kalibrierung der Fotos und deren Auswertung erfolgt mit dem Programm ANALYSIS (Olympus Software Imaging Solutions, Münster). Für die fotografischen Überlagerungen der Immunhistochemiefärbungen mit den ORO-Färbungen und den Doppelhistochemiefärbungen werden die Fotos zunächst über die Mergefunktion im "Photoshop" zusammengefügt, bearbeitet und danach manuell überlagert.

2.10.2 Statistik

Die statistische Datenverarbeitung wird mit den Programmen Excel (MS Office) und InStat 3 (GraphPad) ausgeführt. Die jeweils durchgeführten statistischen Testverfahren sind bei der jeweiligen Grafik angegeben. Die Grafiken werden mit Excel (MS Office) gestaltet.

3. Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der Ausgangspopulation von Peritonealzellen

3.1.1 FACS-Analyse

Um die Zellen der Peritoneallavage, welche die Ausgangspopulation für die weiteren Experimente darstellt, näher zu charakterisieren und spezifische Subpopulationen zu bestimmen, wird eine FACS-Analyse durchgeführt.

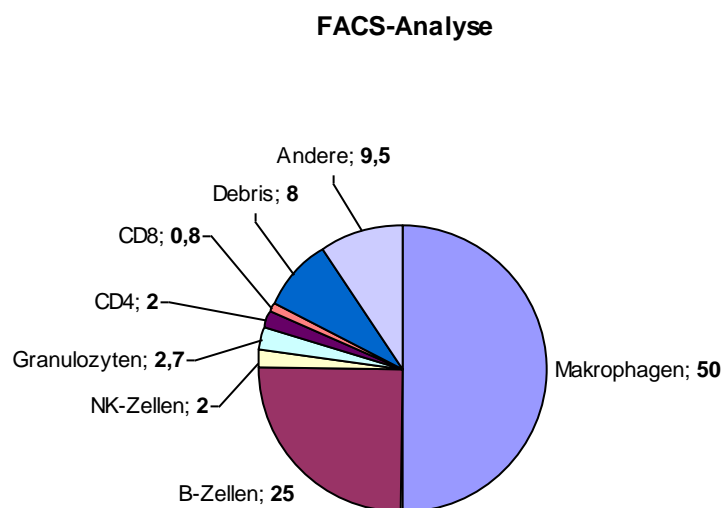


Abb. 3: Zusammensetzung der Zellpopulationen aus den Peritonealzellen, die sich aus der FACS-Analyse ergibt. Die Zahlen sind Prozentangaben. Die Hauptanteile der Zellen stellen mit 50% die Makrophagen und mit 25% die B-Zellen dar. Ein nicht unerheblicher Teil der gewonnenen Zellen besteht aus 8% Zelldebris und aus 9,5% nicht-identifizierten Zellen.

Die Ergebnisse der FACS-Analyse zeigen, dass die Makrophagen mit 50% den größten Anteil der Peritonealzellen ausmachen (Abb. 3). An zweiter Stelle stehen die B-Lymphozyten mit 25%, gefolgt von den Granulozyten mit 2,7%. Weitere Zellpopulationen werden durch die natürlichen Killer-Zellen (NK-Zellen) mit 2% gebildet. Die T-Lymphozyten machen insge-

samt einen geringeren Anteil aus, wobei ihre Subpopulation der CD 4-positiven T-Helferzellen einen Anteil von 2% hat und den Anteil der CD 8-positiven zytotoxischen T-Lymphozyten von 0,8% deutlich übersteigt. Durch die Auswahl der bei der FACS-Analyse eingesetzten Antikörper bleibt ein Anteil von 9,5% der Peritonealzellen nicht identifizierbar (Abb.3).

Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass die Makrophagen nach Auslösung einer Peritonitis mit Thioglykollat tatsächlich den Hauptanteil der Ausgangspopulation der Peritonealzellen ausmachen.

3.1.2 Immunhistochemie an Zytozentrifugaten

Anhand verschiedener Immunhistochemiefärbungen an den Zytozentrifugaten werden die Peritonealzellen weiter in bestimmte immunpositive Subpopulationen eingeteilt und anhand ihrer funktionalen, spezifischen Eigenschaften charakterisiert.

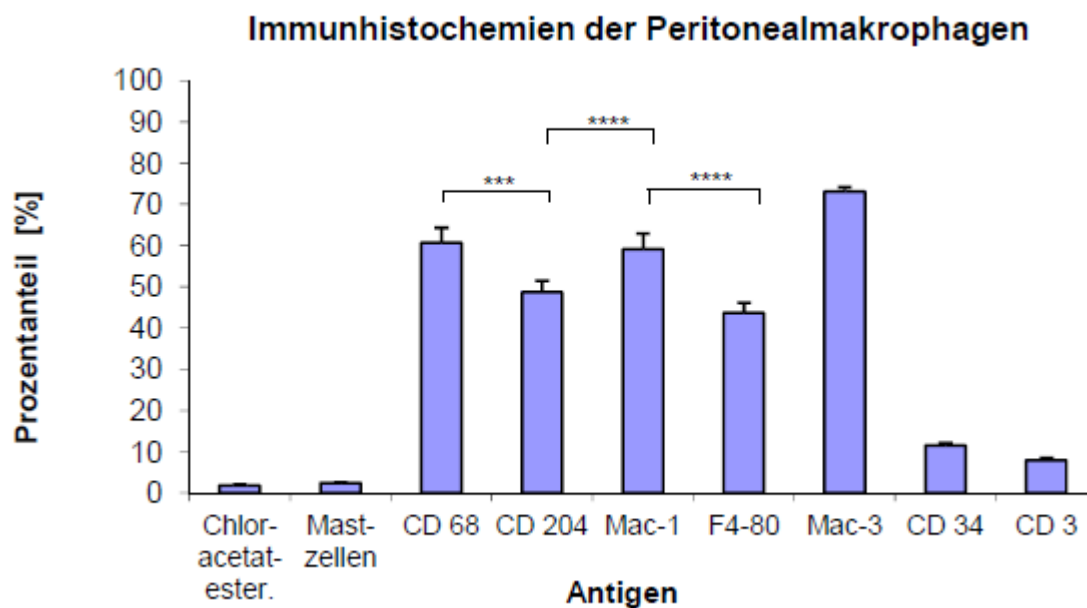


Abb. 4: Anteil der immunhistochemischen Eigenschaften der Peritonealzellen an Zytozentrifugaten. Angaben in Prozentwerten beziehen sich auf die Gesamtheit der Peritonealzellen \pm SEM. Die höchste Population zeigen die Makrophagen mit den Markern CD 68, CD 204, Mac-1, F4/80 und Mac-3. 3 Weitere Zellpopulationen durch CD 34 und CD nachgewiesen. Geringer Anteil von Mastzellen und chlo-racetatesterasepositiven Zellen ist vorhanden. Detaillierten Angaben zu Statistiken siehe Tabelle 15 im Anhang. (***) $p < 0,001$; (****) $p < 0,0001$; MWU-Test)

Die Abb. 4 erfasst die unterschiedlichen immunpositiven Zellen als Anteile an der Gesamtpopulation, welche sich durch die verschiedenen Antigene ergeben (vgl. Tab. 5 im Anhang).

Ungefähr die Hälfte aller Zellen exprimiert CD 204 auf ihrer Oberfläche (Abb. 4). Der Marker CD 204 ist auch unter dem Synonym Scavenger-Rezeptor (ScR) bekannt und dient der Opsonierung von phagozytierten Bestandteilen als Phagozytosemarker. Er ist charakteristisch für die Makrophagen des antiinflammatorischen Typs M2 und somit ein Indikator für die spätere Phase der Wallerschen Degeneration.

Der mausspezifische Oberflächenmarker F4/80 wird ebenfalls von Makrophagen exprimiert und zeigt in der Abb. 4 bei 46% der Zellen einen frühzeitigen Aktivitätsmodus an.

Mit 74% aller Zellen exprimieren deutlich über die Hälfte der Ausgangspopulation der Peritonealzellen den Oberflächenmarker Mac-3, was darauf hinweist, dass dieser neben der Hauptpopulation der Makrophagen noch weitere Zelltypen erfasst (Tab. 2; vgl. Kapitel 4.1 Die Populationszusammensetzung der Peritonealzellen).

Der Phagozytosemarker CD 68 wird an 62% der Peritonealzellen nachgewiesen. 60% der Peritonealzellen sind Mac-1-positiv, was für einen aktivierten Modus der Makrophagen spricht. Dies zeigt ebenfalls an, dass die Hauptpopulation der Zellen durch bereits aktivierte Makrophagen, gebildet wird und dass es Überschneidungen mit anderen Zelltypen geben muss. Denn dieser Marker schließt neben NK-Zellen und Granulozyten auch verschiedene Subtypen der myeloiden Zellreihe ein, was den erheblichen Unterschied zu den 46% F4/80-positiven Zellen erklärt.

Eine deutlich geringe Zellanzahl von 12% exprimiert den Marker CD 34, der vor allem Fibroblasten nachweist. Dies ist in diesem Zusammenhang eher als Kontamination aufgrund der Präparationsmethode anzusehen. Mit einem geringen Anteil von 8% ist die Population der T-Lymphozyten für den Marker CD 3 immunpositiv. Eine ebenso geringe Zellanzahl mit 3% liegt durch den Nachweis von Mastzellen (Vorläuferzellen für Makrophagen) vor. Eine Chloracetatesterasefärbung bestätigt mit 2% positiven Zellen das Vorhandensein von Granulozytenzellen, was den Daten aus der FACS-Analyse entspricht.

Die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen zeigen, dass neben den Makrophagen - als Hauptpopulation der Peritonealzellen - noch weitere Zellpopulationen vorliegen. Diese Ergebnisse stimmen weitgehend mit denen der FACS-Analyse überein (Abb. 3).

3.2 Makrophagen in den Co-Kulturen mit Panserin und DMEM

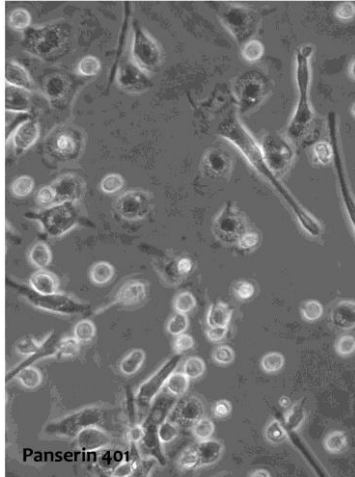
Anhand der fotodokumentarischen Analyse während der Kultivierungsdauer mit den co-kultivierten Nervenstücken und den Peritonealzellen können Aussagen über den Einfluss der beiden Kulturmedien Panserin und DMEM im Bezug auf die Größe, die Anzahl und die Morphologie der Zellen getroffen werden. Während der Kultivierungszeit von acht Tagen fallen bei der mikroskopischen Kontrolle keine Verunreinigungen oder Besonderheiten auf und die Zellen der Peritoneallavage entwickeln sich regelgerecht.

An den einzelnen Kultivierungstagen werden die freien Zellen in den Lumox-Schalen fotografiert (Abb. 5a-f). Unter dem Einfluss der Kulturmedien Panserin und DMEM sind in den ersten 3 Kulturtagen deutliche morphologische Unterschiede bei den Makrophagen feststellbar. Insgesamt haben sich die Zellen in dem serumfreien Kulturmedium Panserin eher abgeflacht auf dem Kulturschalenboden ausgebreitet und zeigen lichtbrechende Einschlüsse. Anhand der Fotos ist auch eine dichtere Zellanzahl im Kulturmedium Panserin zu beobachten (Abb. 5a-c). Im serumhaltigen Kulturmedium DMEM hingegen sind die Zellen am ersten Kulturtag (Abb. 5d) kleiner und erscheinen insgesamt länglich mit kurzen Fortsätzen (Abb. 5d-f). In beiden Medien werden die Zellen bis zum 8. Kulturtag kontinuierlich größer und breiten sich zunehmend am Schalenboden aus. Im Panserin zeigen sie dabei zunehmend lichtbrechende Einschlüsse, im DMEM wirken die Zellen bei gleicher Zellgröße jedoch kompakter.

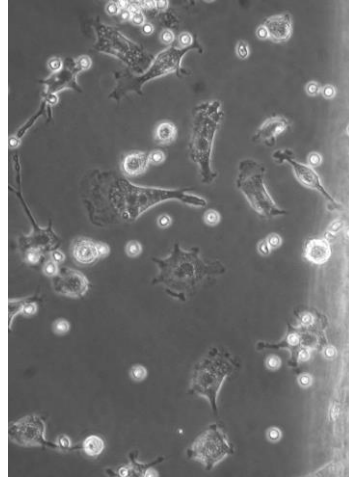
Eine Auswertung der Zellgrößen ist in Abb. 6 und dem nachfolgenden Textabschnitt dargestellt.

Panserin:

a) d1



b) d3



c) d8

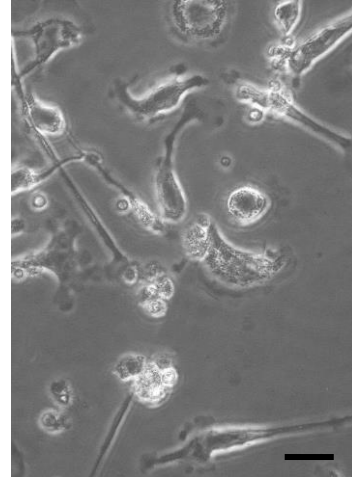


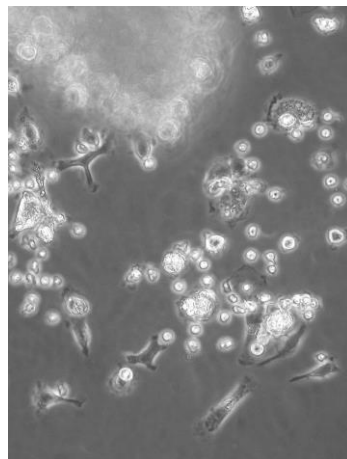
Abb. 5a-c: Fotografische Darstellung der Peritonealzellen in den Co-Kulturschalen mit Kulturmedium Panserin an den Kultivierungstagen d1 (a), d3 (b) und d8 (c). Vergrößerung $\times 40$. Maßstab für alle $20\ \mu\text{m}$

DMEM:

d) d1



e) d3



f) d8

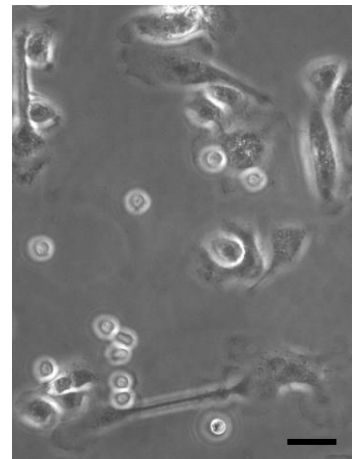


Abb. 5d-f: Fotografische Darstellung der Peritonealzellen der Co-Kulturschalen im Kulturmedium DMEM an den Kultivierungstagen d1 (d), d3 (e) und d8 (f). Vergrößerung $\times 40$. Maßstab für alle $20\ \mu\text{m}$

Makrophagengröße in Co-Kulturen

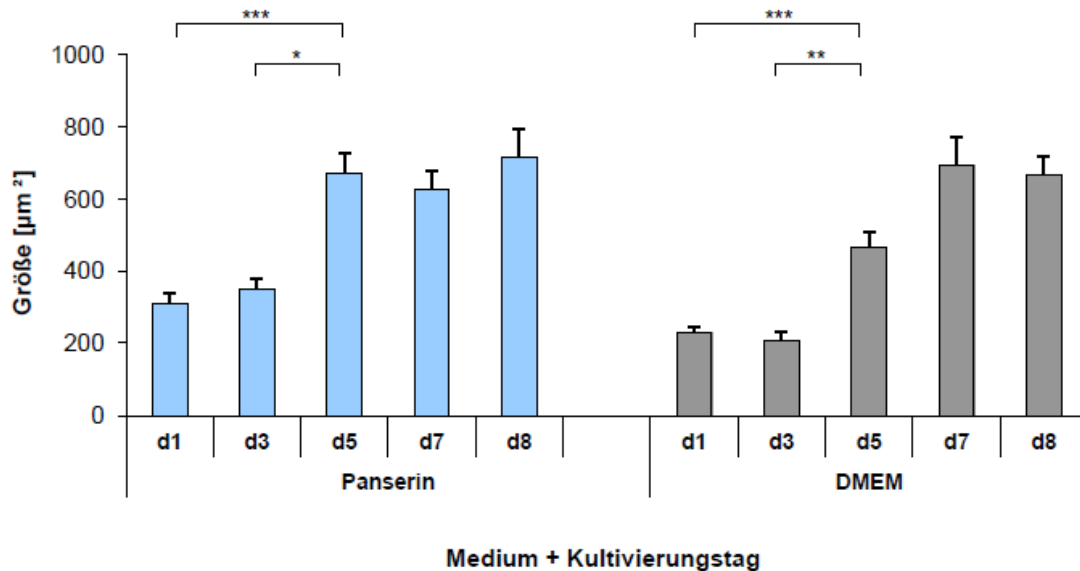


Abb. 6: Entwicklung der Makrophagengröße in den Co-Kulturschalen im Vergleich zwischen DMEM und Panzerin. Größe in $\mu\text{m}^2 \pm \text{SEM}$. An den ersten drei Kultivierungstagen sind die Zellen in Panzerin größer als in DMEM. Ab siebtem Kultivierungstag ist die Größenentwicklung der Zellen in beiden Kulturmedien gleich. Der Verlauf der Größenentwicklung zeigt im Vergleich der Kulturmedien keinen signifikanten Unterschied – auch nicht an Tag 5. Detaillierte Angaben zu den Statistiken siehe Tabelle 16 im Anhang. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; ANOVA + Dunn-Test)

Die Bestimmung der Makrophagenzellgröße ergibt signifikante Unterschiede beim Vergleich der beiden Kulturmedien Panzerin und DMEM (Abb. 6). Aus der Grafik ist ersichtlich, dass bereits in den ersten drei Kultivierungstagen die Zellen im Kulturmedium Panzerin tendenziell größer sind (allerdings nicht signifikant) als die im Kulturmedium DMEM. Die Zellen im Panzerin entwickeln sich an Kultivierungstag 1 von einer durchschnittlichen Größe von $300 \mu\text{m}^2$ weiter zu einer Größe von $320 \mu\text{m}^2$ an Kultivierungstag 3. Im Gegensatz zu dieser Größenzunahme bleibt die geringere Zellgröße von $270 \mu\text{m}^2$ des Kulturmediums DMEM im Verlauf von Kultivierungstag 1 bis 3 nahezu konstant. Eine sprunghafte, signifikante Größenzunahme der Zellen ist von Tag 3 bis Tag 5 in beiden Kulturmedien gleichzeitig zu beobachten. Dabei ist der Sprung bei Panzerin deutlicher als in DMEM, wenn auch nicht signifikant. Am Kultivierungstag 7 erreichen die Zellgrößen in beiden Kulturmedien ein Plateau von durch-

schnittlich 700 μm^2 . Signifikante Größenunterschiede zwischen den beiden Medien liegen ab diesem Tag nicht mehr vor.

3.3 Makrophagen in den 3D-Migrationskammern

Um das Migrationsverhalten der Peritonealmakrophagen und ihre Entwicklungskapazität unter dem Einfluss der beiden Kulturmedien Panserin und DMEM genauer zu untersuchen, werden die Peritonealzellen im Hinblick auf ihre Zellanzahl- und Größenentwicklung innerhalb der 3D-Migrationskammern fotodokumentarisch und durch Auszählen ausgewertet. Da aus technischen Gründen kein Mediumwechsel durchgeführt wird, können auch Aussagen über die Überlebenskapazität dieser Zellen innerhalb der Kultivierungsdauer von sieben Tagen getroffen werden.

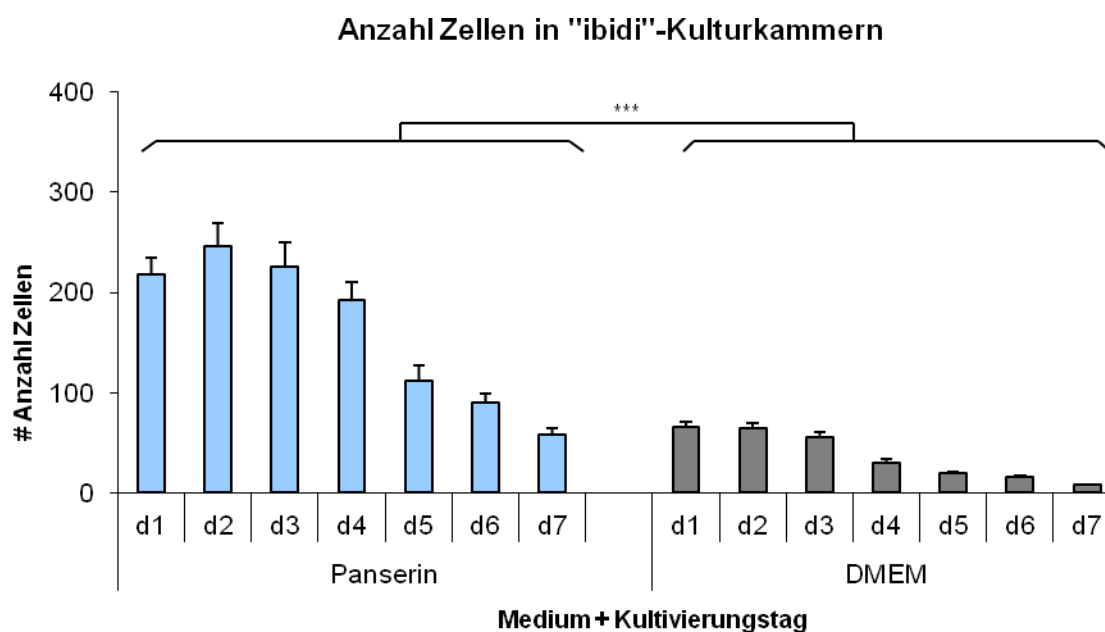


Abb. 7: Entwicklung der Zellanzahl in den "ibidi"-3D-Kammern im Vergleich der Kulturmedien Panserin und DMEM. Gilt für die Kultivierungstage d1 bis d7 \pm SEM. Die Zellanzahl der Panserin-kultivierten 3D-Kammern ist signifikant höher als die Zellanzahl der DMEM-Kultivierung. Detaillierte Angaben zu den Statistiken siehe Tabelle 17 im Anhang. (***) $p < 0,001$; ANOVA+Tukey-Kramer)

Die Zellzahlentwicklung der Peritonealmakrophagen innerhalb der 3D-Migrationskammern ist in Abb. 7 dargestellt und verdeutlicht den Einfluss der beiden Kulturmedien Panserin und DMEM auf die Entwicklung dieser Zellen. Das Verlaufsmuster der Zellzahlentwicklung über die Kultivierungsdauer von sieben Tagen stellt sich allerdings in beiden Kulturmedien ähnlich dar. In beiden Kulturmedien ist ein leichter Anstieg bei der Zellanzahl vom ersten zum zweiten Kultivierungstag zu beobachten, die sich ab dem vierten Tag schließlich deutlich verringert. In den Migrationskammern mit Panserin liegen während der gesamten Kultivierungsdauer signifikant höhere Zellanzahlen vor (vgl. Abb. 7 und Tab. 17). Obwohl aus technischen Gründen während der gesamten Kultivierungsdauer kein Mediumwechsel durchgeführt wird, sind am siebten Kultivierungstag durchaus noch Zellen in den beiden Kulturmedien vorhanden. Hierbei überwiegt die Zellanzahl ebenfalls innerhalb der Panserin-kultivierten 3D-Migrationskammern.

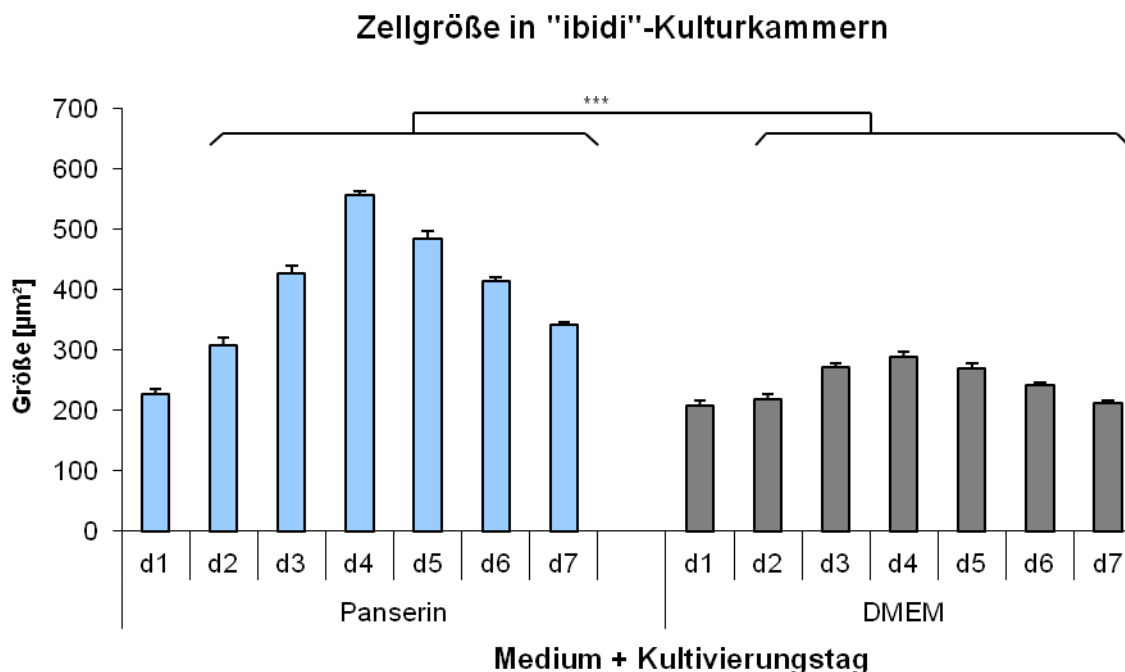


Abb. 8: Entwicklung der Zellgröße in den "ibidi"-3D-Kammern im Vergleich der Kulturmedien Panserin und DMEM. Die Zellgröße wird für die Kultivierungstage d1 bis d7 ermittelt und in μm^2 angegeben \pm SEM. Die Zellgröße der Panserin-kultivierten 3D-Kammern zeigt signifikant größere Werte als die Zellen der DMEM-Kultivierung. Detaillierte Angaben zu den Statistiken siehe Tabelle 18 im Anhang. (***) $p < 0,001$; ANOVA+Tukey-Kramer)

Die beiden Kulturmedien Panserin und DMEM haben auch Einfluss auf die Größenentwicklung der Peritonealmakrophagen in den 3D-Migrationskammern (Abb. 8). Während der gesamten Kultivierungsdauer von sieben Tagen zeigen die Zellen in den Panserin-kultivierten Bereichen der 3D-Migrationskammern insgesamt eine deutlich höhere Zellgröße, wobei die anfängliche Größenzunahme und anschließende –abnahme im Zeitverlauf für beide Medien nach vergleichbarem Muster verläuft. In beiden Kulturmedien werden die Peritonealzellen zunächst bis zum Kultivierungstag 4 größer und danach wieder kleiner. Die Ausgangsgröße an Tag 1 ist in beiden Kulturmedien mit ca. $220 \mu\text{m}^2$ nahezu identisch. Die Zellen in den Panserin-kultivierten Zellkammerabschnitten wachsen auf eine maximale Größe am Kultivierungstag 4 mit $570 \mu\text{m}^2$ und verkleinern sich bis Kultivierungstag 7 auf $380 \mu\text{m}^2$. Die Zellen der DMEM-Kultivierung entwickeln sich von dem anfänglichen Wert von $220 \mu\text{m}^2$ zu der maximalen Größe an Tag vier mit $300 \mu\text{m}^2$ und nehmen in ihrer Größe bis zum letzten Kultivierungstag 7 wieder auf $230 \mu\text{m}^2$ ab. Insgesamt machen die Zellen in den DMEM-kultivierten Kammern eine signifikant geringere Größenentwicklung durch als die Zellen in den Panserin-kultivierten Kammern.

Insgesamt zeigt das Entwicklungsbild der Peritonealmakrophagen im Hinblick auf die Zellanzahl (Abb. 7) und die Zellgröße (Abb. 8) also signifikant höhere Werte innerhalb der Panserin-kultivierten Kammern. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die Entwicklungsbedingungen für Peritonealmakrophagen im Kulturmedium Panserin günstiger sind als in dem Kulturmedium DMEM.

3.4 Immunhistochemie an den co-kultivierten Nervenstücken im Medienvergleich

Mit Hilfe verschiedener immunhistochemischer Nachweise werden die kryopräservierten Ischiasnervenstücke aus den Co-Kulturen im Hinblick auf verschieden exprimierte Oberflächenmarker untersucht.

Die Folgeseiten (S. 49-52) zeigen Beispiele für diese Nachweise.

Abb. 9 (a-g): Überblick zu den Immunhistochemien an co-kultivierten Nervenstücken. Die jeweils immunpositiven Zellen weisen eine braune Anfärbung auf. Bei schwächeren Anfärbungen weisen Pfeile auf die immunpositiven Zellen. Es werden Anfärbungen für Mac-1 (9a), Mac-3 (9b), F4/80 (9c), CD 3 (9d), CD 34 (9e), CD 68 (9f) und CD 204 (9g) gezeigt. Vergrößerung x20. Maßstab für alle: 200 µm.

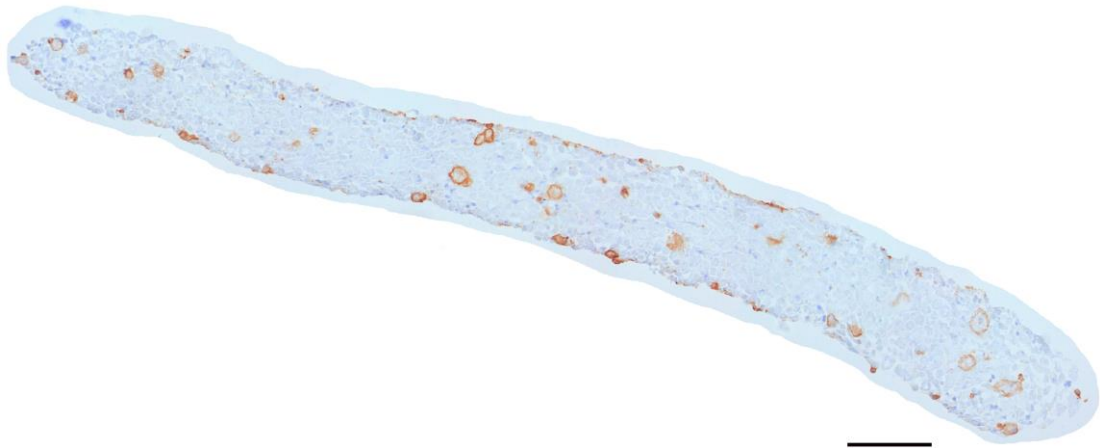


Abb. 9a: Mac-1; DMEM-Kultivierung;

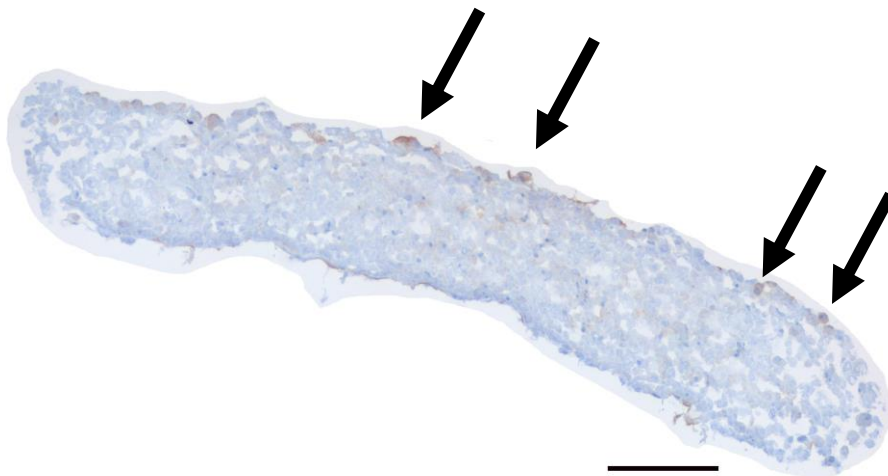


Abb. 9b: Mac-3; Panserin-Kultivierung



Abb. 9c: F4/80; DMEM-Kultivierung

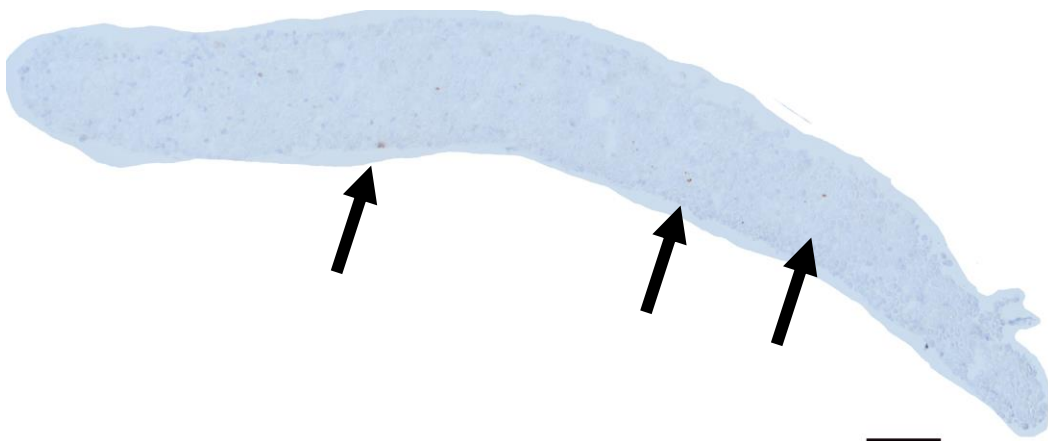


Abb. 9d: CD 3; DMEM-Kultivierung

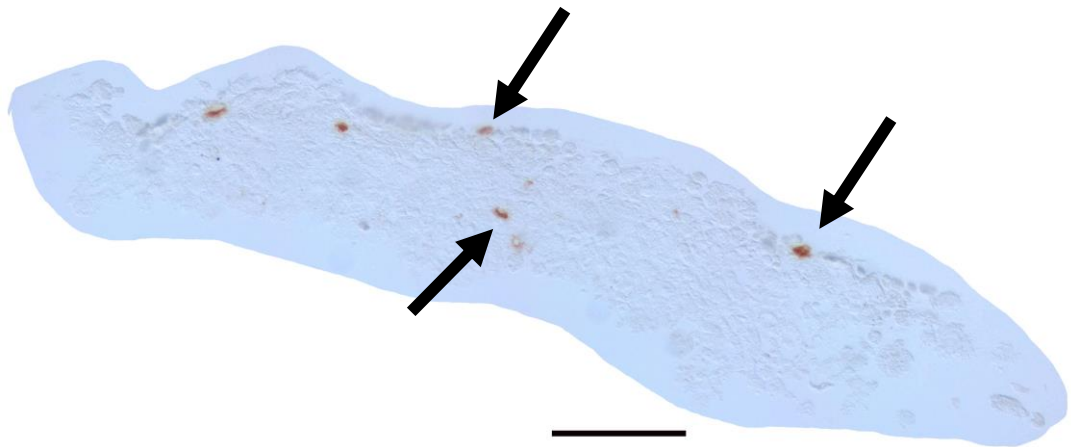


Abb. 9e: CD 34; DMEM-Kultivierung



Abb. 9f: CD 68; Panzerin-Kultivierung

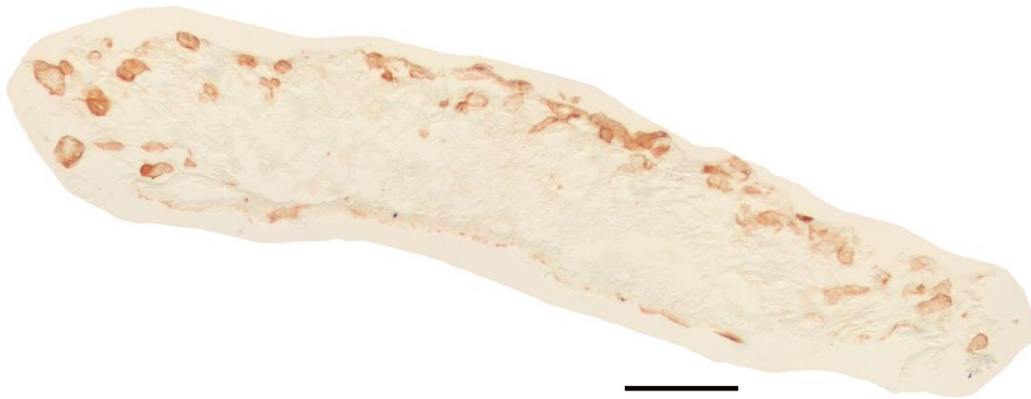


Abb. 9g: CD 204; Panserin-Kultivierung

Anhand der immunhistochemisch detektierten Oberflächenmarker der co-kultivierten Nervenstücke sind Aussagen zur Zusammensetzung der im Nervenstück vorhandenen Zellpopulationen unter dem Einfluss der beiden Kulturmedien Panserin und DMEM möglich (vgl. Abb. 9a-g und Abb. 10). Hier ist zu berücksichtigen, dass diese Auswertungen die Zellzahlen im Nervenstück nach acht Tagen Co-Kultivierung widerspiegeln.

Beim Vergleich jedes einzelnen immunhistochemischen Markers in den beiden verschiedenen Kulturmedien ist für fast jeden Marker der Wert für DMEM (graue Säulen) tendenziell höher als für Panserin. Anhand der fotografischen Auswertung (Abb. 9a-g) und der statistischen Analyse (vgl. Abb. 10 und Tab. 19) kann gezeigt werden, dass die höchsten Zellzahlen im DMEM für CD 204 und Mac-1 vorliegen.

Einen extrem signifikant höheren Wert für die Zellanzahl zeigen die CD 204-positiven Zellen im serumhaltigen DMEM mit ungefähr 500 Zellen/mm² im Vergleich zum Panserin mit nur ungefähr 300 Zellen/mm² (vgl. Abb. 10 und Tab. 19). Mit Hilfe dieses Scavenger-Rezeptors erkennen Makrophagen unbekannte Makromoleküle und beginnen sie zu phagozytieren.

Eine zu CD 204 vergleichbare Anzahl gibt es bei den Mac-1-positiven Zellen. Hierbei zeigt sich im Medienvergleich ein sehr signifikant höherer Zahlenwert mit ungefähr 500 Zellen/mm² der Peritonealzellen unter dem Einfluss des serumhaltigen Kulturmediums DMEM (sehr signifikant; vgl. Abb. 10 und Tab. 19). Im serumfreien Kulturmedium Panserin hingegen exprimieren nur ungefähr 300 Zellen/mm² Mac-1. Die fotografische Darstellung des

DMEM-kultivierten Nervenstücks unterstützt diese Aussage, indem sie eine hohe Zelldichte für Mac-1 positive Zellen anzeigt (Abb. 9a). Der Oberflächenmarker Mac-1 markiert neben aktivierten Makrophagen auch NK-Zellen und Granulozyten.

Eine ebenso deutlich hohe Expression liegt durch die Marker CD 68 und F4/80 vor.

Bei Betrachtung des Phagozytosemarkers CD 68 fällt auf, dass sich im Vergleich der Kulturmedien DMEM und Panserin die Zellanzahlen nicht sehr signifikant unterscheiden, wobei sich im DMEM mit ungefähr 400 Zellen/mm² eine höhere Expression zeigt. Mit 350 positiven Zellen/mm² detektiert CD 68 eine etwas geringere Zellanzahl im Panserin (nicht sehr signifikant; vgl. Abb. 10 und Tab. 19).

Der mausspezifische Marker F4/80 weist früh aktive Makrophagen nach und zeigt beim Vergleich beider Medien keine signifikanten Unterschiede der Zellzahlen (DMEM-Medium: 480 Zellen/mm²; Panserin-Medium: 420 Zellen/mm²), wobei ein Trend zu einer höheren Zellanzahl beim DMEM liegt (nicht signifikant; vgl. Abb. 10 und Tab. 19).

Zusammen mit den Werten für CD 68 und F4/80 legen vor allem die Ergebnisse für CD 204 und Mac-1 (Abb. 10, *graue Balken*) die Vermutung nahe, dass das serumhaltige DMEM zu einer frühzeitigeren Aktivierung der Peritonealmakrophagen führt als das Kulturmedium Panserin.

Betrachtet man nur das serumfreie Kulturmedium Panserin (Abb. 10; *blaue Balken*) dann ist dort mit 420 Zellen/mm² die höchste Zellanzahl für F4/80, also den globalen Maus-Makrophagen-Marker, zu sehen. Alle anderen Marker liegen auf einem ähnlichen Niveau von ca. 300-380 Zellen/mm² (Abb. 10).

Unter Berücksichtigung weiterer Marker fällt auf, dass Mac-3 zwar nicht signifikant aber tendenziell eine höhere Expression innerhalb des Panserin-kultivierten Nervengewebes aufweist (DMEM-Medium: 360 Zellen/mm²; Panserin-Medium: 380 Zellen/mm²; nicht signifikant; vgl. Abb. 10 und Tab. 19). Dieses Ergebnis unterstützt auch die fotografische Darstellung des Panserin-kultivierten Nervenstückes, wo sich eine hohe Dichte an Mac-3 positiven Zellen zeigt (Abb. 9b).

Weiterhin werden noch T-Lymphozyten durch den Marker CD 3 im Nervenstück in signifikant geringerer Zahl nachgewiesen. Hierbei überwiegt die Anzahl der T-Lymphozyten im Panserin-Medium mit 100 Zellen/mm² deutlich die Zellanzahl des DMEM-Mediums, die nur 50 Zellen/mm² beträgt (sehr signifikant; Tab. 19). Dies lässt darauf schließen, dass sich spezifische Faktoren im Panserin förderlich auf das Überleben und die Proliferation der T-Lymphozyten auswirken. Die Population der CD3-positiven Zellen ist in beiden Medien ext-

rem signifikant kleiner als die Populationen für alle anderen Marker (extrem signifikant; Tab. 19). Deutlich wird dies auch bei dem direkten Vergleich der fotografischen Darstellungen. Die Abbildungen für die Makrophagenmarker zeigen eine deutlich höhere Zelldichte als die Abbildung für den Marker CD 3 (Abb. 9d). Dies zeigt, dass die Lymphozyten im Vergleich zu den Makrophagen innerhalb des degenerierten Nervengewebes eine eher untergeordnete Rolle spielen.

Das Vorhandensein von Fibroblasten weist der Oberflächenmarker CD 34 nach. Im DMEM zeigen sich hierfür 400 Zellen/mm² und im Panserin nur 300 Zellen/mm² (signifikant; vgl. Abb. 10 und Tab. 19).

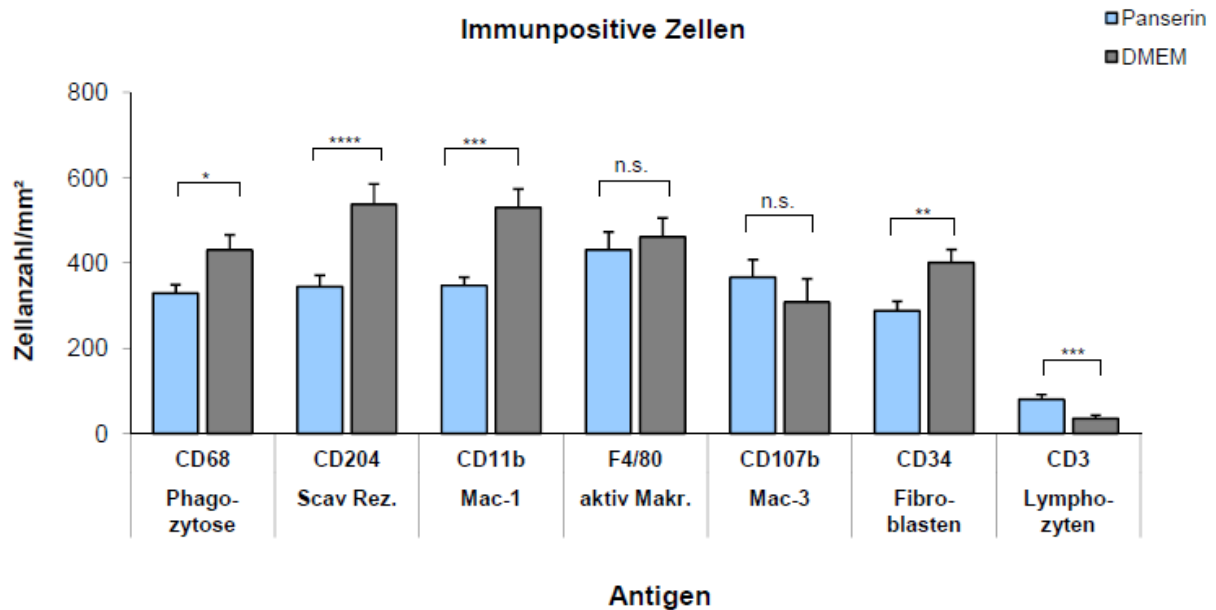


Abb. 10: Nachweis verschiedener Antigene in co-kultivierten Nervenstücken beim Vergleich von Panserin und DMEM. Die Werte sind in Anzahl der Zellen/mm² angegeben \pm SEM. Hohe Expressionen zeigen die Makrophagenmarker CD 68, CD204, Mac-1 und für F4/80. Die Zellanzahlen im DMEM Medium liegen höher. F4/80 zeigt keine signifikante Medienspezifität. Zellzahlen für den Fibroblastenmarker CD 34 sind signifikant niedriger im DMEM Medium. Nur der T-Zellmarker CD 3 zeigt eine sehr signifikant höhere Zellanzahl bei den Panserin-kultivierten Peritonealzellen.

Angaben zu den Statistiken siehe Tabelle 19 im Anhang.

(* $p < 0,5$; ** $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$; n.s. $p > 0,05$; MWU-Test)

Aufgrund dieses Ergebnisses ist davon auszugehen, dass die im Nervengewebe nach 8 Tagen Kultivierung noch vorhandenen Fibroblasten durch das serumhaltige DMEM besser erhalten bleiben als durch das Kulturmedium Panserin. An dieser Stelle ist zu berücksichtigen, dass die Zugabe von AraC zu beiden Kulturmedien das Fibroblastenwachstum aktiv hemmt.

Insgesamt deuten die immunhistochemischen Färbungen darauf hin, dass die Hauptpopulation der Peritonealzellen durch die Makrophagen gebildet wird und die Anzahl an aktivierten Peritonealmakrophagen in den DMEM-kultivierten (serumhaltig) Nervenstücken im Vergleich zu den Panserin-kultivierten (serumfrei) Nervenstücken überwiegt.

3.5 Nachweis von fetthaltigen Zellen anhand der ORO-Färbung

Da Myelin zu einem überwiegenden Anteil aus Fetten besteht, kann anhand der ORO-Färbung, die den Fettanteil innerhalb von Zellen anfärbt, der phagozytierte, intrazellulär liegende Anteil von metabolisiertem Myelin nachgewiesen werden. Dieser Myelinanteil wiederum erlaubt Rückschlüsse auf die Phagozytoseaktivität von Zellen.

Der Fotoausschnitt in Abb. 11 zeigt ORO-positive Zellen im Nervengewebe. Es sind größere, zusammenhängende rote Flächen zu sehen, die sich aus kleinen tropfenförmigen Vakuolen zusammensetzen. Diese kleinen Tropfen repräsentieren das von der Zelle phagozytierte Myelin, das bereits verdaut wurde. Eine größere rote Fläche repräsentiert daher eine phagozytierende Zelle. Diese Bereiche wurden für die Auswertung der ORO-positiven Flächen ausgezählt.

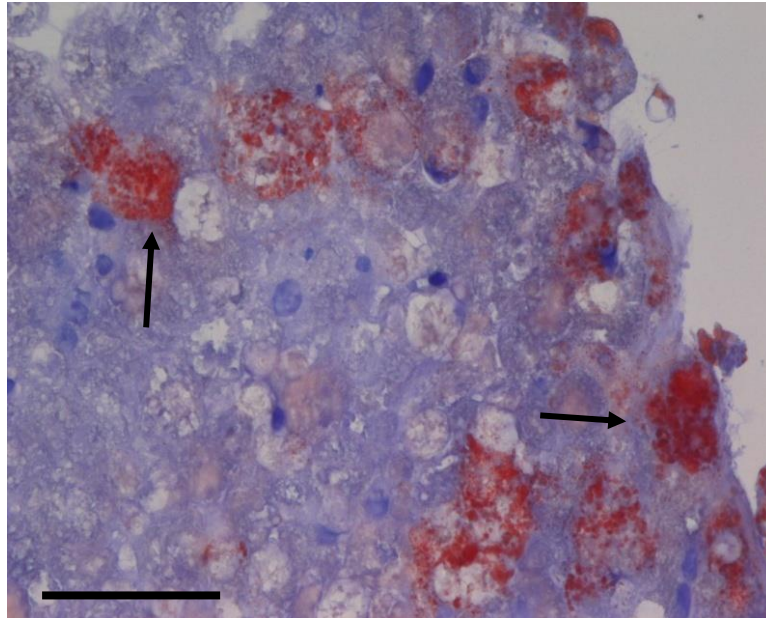


Abb. 11: ORO-positive Zellen mit roter vakuolenähnlicher Anfärbung innerhalb des Nervengewebes. Pfeile markieren beispielhaft ORO-positive Zellen. (Maßstab: 50 μm)

In zwei weiteren Grafiken werden Aussagen zur Anzahl ORO-positiver Zelleinschlüsse (Abb. 12) gemacht und zur durchschnittlichen Fläche des ORO-positiven Anteils pro Zelle (Abb. 13) der co-kultivierten Nervenstücke mit den Peritonealmakrophagen unter dem Einfluss der beiden Kulturmedien DMEM und Panserin.

Hierbei ergibt sich eine signifikant höhere Anzahl ORO-positiver Zelleinschlüsse innerhalb des co-kultivierten Nervengewebes für das serumfreie Kulturmedium Panserin (signifikant; vgl. Abb. 12 und Tab. 20). Der ORO-positive Flächenanteil pro Zelle hingegen überwiegt innerhalb des DMEM-kultivierten Nervengewebes (extrem signifikant; vgl. Abb. 13 und Tab. 21). Im DMEM sind die Zelleinschlüsse also größer.

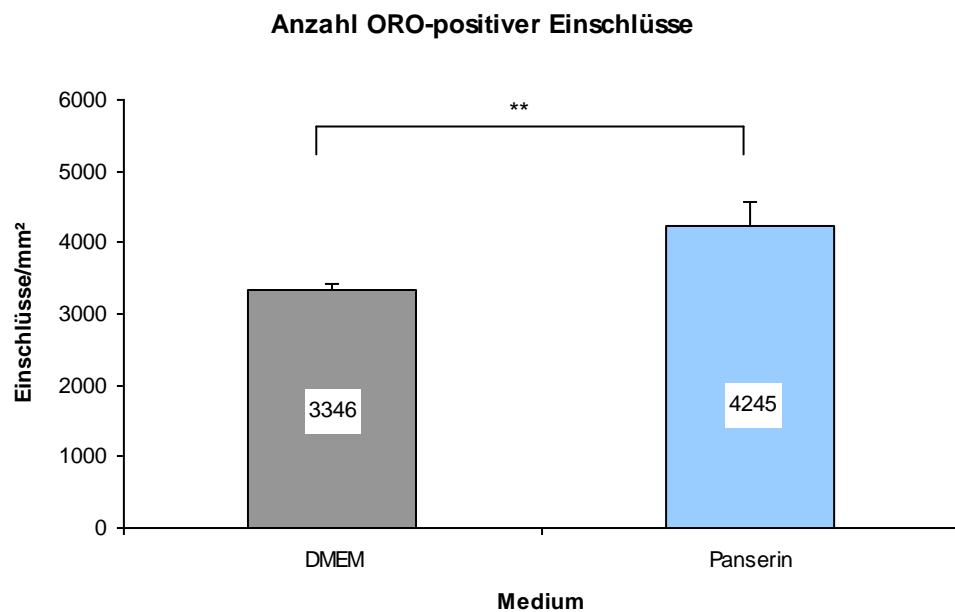


Abb. 12: Darstellung der Anzahl ORO-positiver Zelleinschlüsse im Vergleich der Kulturmedien Panserin und DMEM. Angaben sind in Einschlüsse/mm² ± sd. Es zeigt sich eine signifikant höhere Anzahl ORO-positiver Zelleinschlüsse im Panserin-Medium.

Für die detaillierten Angaben zu den Statistiken siehe Tabelle 20 im Anhang.

(** p < 0,05; MWU-Test)

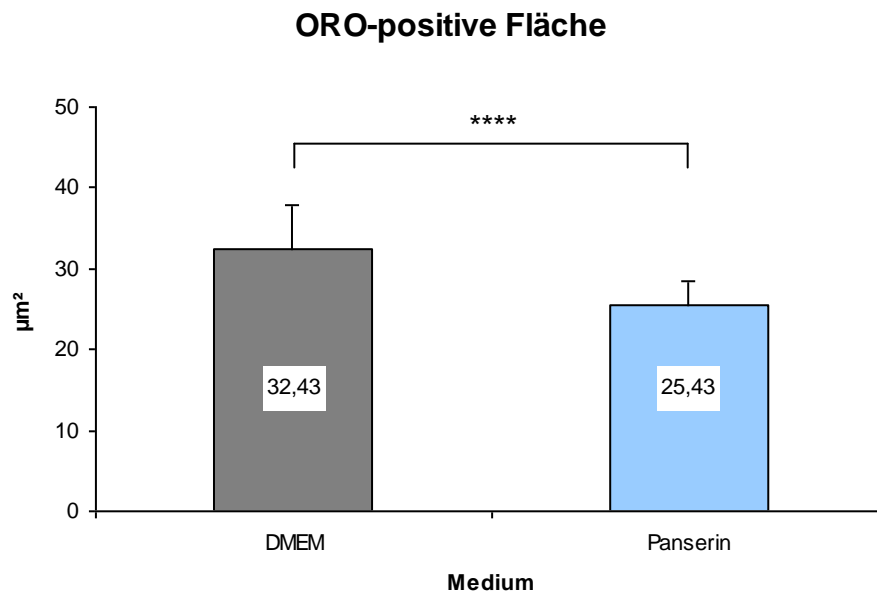


Abb. 13: Darstellung der Fläche des ORO-positiven Anteils pro Zelle im Vergleich der Kulturmedien Panzerin und DMEM. Angaben sind in $\mu\text{m}^2 \pm \text{sd}$. Die ORO-positiven Zellen des Kulturmediums DMEM haben eine signifikant größere ORO-positive Fläche. Für die detaillierten Angaben zu den Statistiken siehe Tabelle 21 im Anhang. (**** $p < 0,0001$; MWU-Test)

3.6 Überlagerungen von Immunhistochemien mit ORO-Färbungen

Eine direkte Überlagerung der ORO-Färbungen mit den immunhistochemischen Färbungen nach der von Koopman beschriebenen Methode gelingt nicht (Koopman et al. 2001). Im Sinne einer Doppelfärbung können daher keine myelinphagozytierenden Zellen aufgrund ihrer Oberflächenrezeptoren identifiziert werden. Um dennoch Aussagen zu einer bestehenden Colokalisation von immunhistochemischen Eigenschaften und ORO-positiven Arealen treffen zu können, werden entsprechende ORO-Färbungen mit den immunhistochemischen Färbungen aufeinanderfolgender Schnittreihen des Nervengewebes mithilfe von Photoshop überlagert. So können sowohl die immunpositiven Areale als auch die ORO-positiven Anteile, die unabhängig voneinander und somit ohne eine Colokalisation auftreten, hervorgehoben werden. Insgesamt sind schließlich Aussagen bezüglich einer Korrelation zwischen Immunogenität und Fettgehalt der Zellen möglich.

Die folgenden Fotos (Abb. 14-16) stellen Beispiele zu den Überlagerungen der immunhistochemischen Färbungen mit den ORO-Färbungen dar:

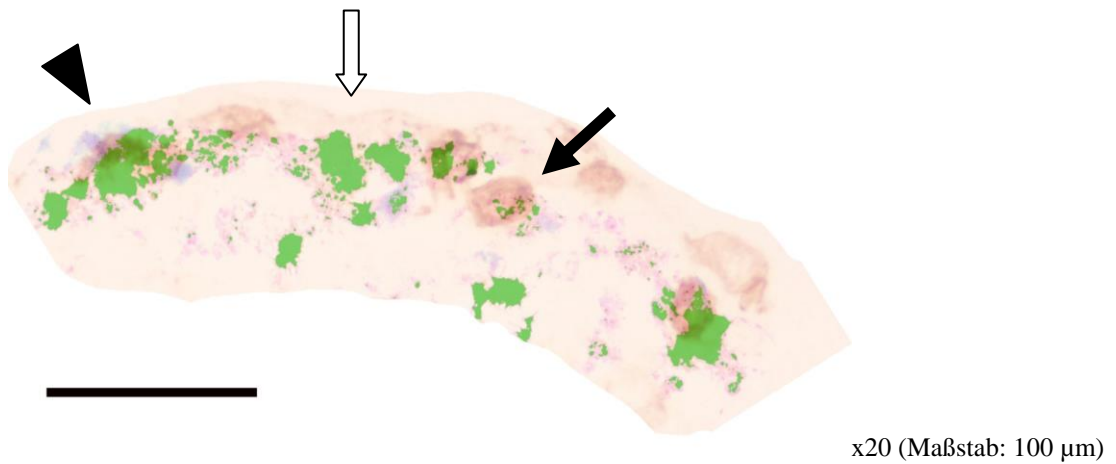
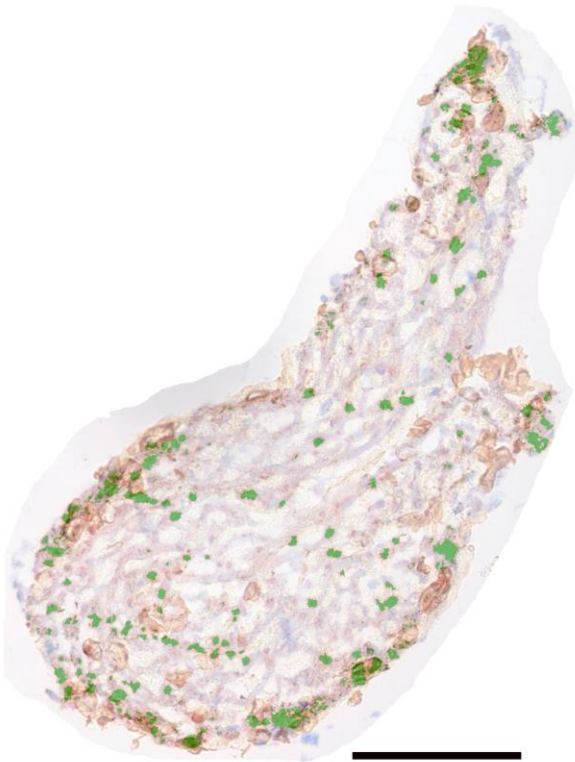


Abb. 14: Überlagerung von Mac-1 mit ORO-Färbung unter DMEM-Kultivierung. Die Mac-1-positiven Areale zeigen eine bräunliche Anfärbung und die ORO-positiven Bereiche stellen sich grün dar. Die schwarze Pfeilspitze zeigt auf eine Zelle, die sowohl positiv für Mac-1 als auch ORO-positiv ist. Der weiße Pfeil deutet auf eine ORO-positive Zelle und der schwarze Pfeil zeigt eine Mac-1 positive Zelle an.



x10 (Maßstab: 200 µm)

Abb. 15a: Überlagerung von F4/80 unter DMEM-Kultivierung mit ORO-Färbung. Die F4/80-positiven Areale zeigen eine bräunliche Anfärbung und die ORO-positiven Bereiche stellen sich grün dar.

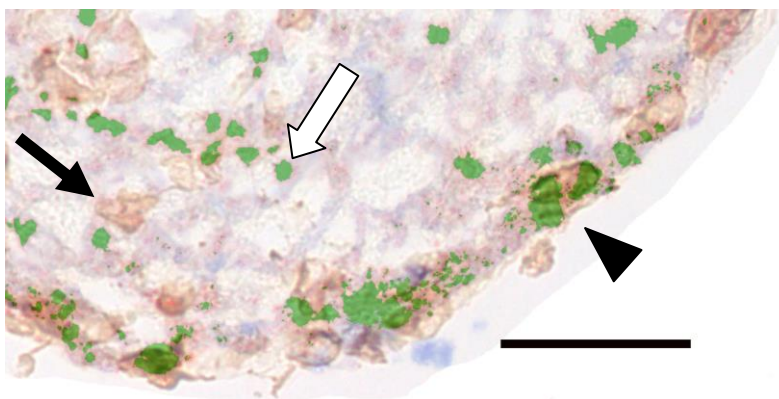


Abb. 15b: Diese Abbildung zeigt einen Ausschnitt aus Abb. 15a. (Maßstab: 100 µm)
Die schwarze Pfeilspitze zeigt auf eine Zelle, die sowohl positiv für F4/80 als auch ORO-positiv ist. Der weiße Pfeil deutet auf eine ORO-positive Zelle und der schwarze Pfeil zeigt eine Mac-1 positive Zelle an.

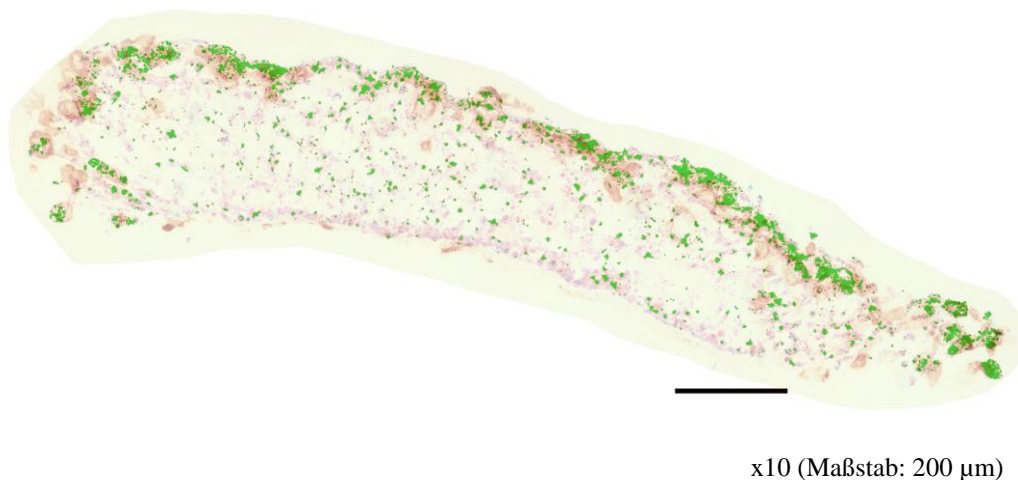


Abb. 16: Überlagerung von CD 204 unter DMEM-Kultivierung mit ORO-Färbung. Die CD 204-positiven Areale zeigen eine bräunliche Anfärbung und die ORO-positiven Bereiche stellen sich grün dar.

Da technisch bedingt nur eine geringe Menge an auswertbarem Material zur Verfügung steht, kann nicht für jede Antikörperfärbung eine Überlagerung mit ORO durchgeführt werden. Erschwerend kommt hinzu, dass sich die jeweiligen Folgeschnitte trotz exakten Arbeitens oft nicht überlagern lassen. Aus diesen Gründen liegen für eine quantitative Auswertung nicht genügend Schnitte vor, sodass die erfolgten Überlagerungen nur qualitativ gezeigt werden.

Die Überlagerungen konnten für die drei Marker Mac-1, F4/80 und CD 204 am besten dargestellt werden. Es zeigen sich sowohl Co-Lokalisationen von immunhistochemischen Eigenschaften mit den ORO-positiven Arealen einerseits, als auch andererseits positiv angefärbte Bereiche, die getrennt voneinander bestehen.

Da Mac-1, F4/80 und CD 204 vornehmlich Makrophagen markieren, ist davon auszugehen, dass die immunpositiven Zellen (Abb. 14-16; schwarzer Pfeil und schwarze Pfeilspitze) Makrophagen darstellen. Die ORO-Färbung dient der Markierung von Lipid und somit auch dem Nachweis von lipidhaltigem Myelin. Die Abb. 14-16 verdeutlichen, dass in dem degenerierten Nervengewebe sowohl Makrophagen mit intrazellulärer Lipideinlagerung (schwarze Pfeilspitzen) als auch ohne Einlagerungen (schwarze Pfeile) vorliegen. Da auch ORO-positive Zellen ohne jeweiligen Makrophagen-Marker vorliegen (Abb. 14-16; weiße Pfeile), ist davon auszugehen, dass neben den Makrophagen weitere lipidhaltige Zellen nachweisbar sind. In

den Abb. 14-16 ist ebenfalls ersichtlich, dass die lipidhaltigen wie auch die immunpositiven Zellen hauptsächlich im Randbereich des degenerierten Nervengewebes vorhanden sind. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass es sich bei den Zellen um eingewanderte Phagozytosezellen handeln muss.

3.7 Immunhistochemische Doppelfärbungen

Die Doppelfärbungen an den co-kultivierten Nervenstücken werden mit verschiedenen immunhistochemischen Markern erstellt, um eine spezifische Korrelation immunogener Eigenschaften festzustellen oder auszuschließen.

Hierzu wird zunächst eine Doppelfärbung mit den immunhistochemischen Markern F4/80 und CD 34 erstellt. Durch die Kombination des mausspezifischen Markers F4/80 für früh aktivierte Makrophagen mit dem Fibroblastenmarker CD 34 sollen Korrelationen zwischen diesen beiden Markern entweder bestätigt oder ausgeschlossen werden. Leider zeigt die Durchführung dieser Doppelfärbung keine positiven Zellen, sodass diesbezüglich nur die Aussage getroffen werden kann, dass es in diesem Co-Kultur-Modell keine doppelt-positiven Zellen für Makrophagen und Fibroblasten gibt.

Eine weitere immunhistochemische Doppelfärbung wird mit den Markern F4/80 und S100 durchgeführt. Das Ergebnis von verschiedenen Doppelfärbungen wird exemplarisch in Abb. 17a-c dargestellt, wobei F4/80-positive Zellen grün und S100-positive Zellen rot erscheinen.

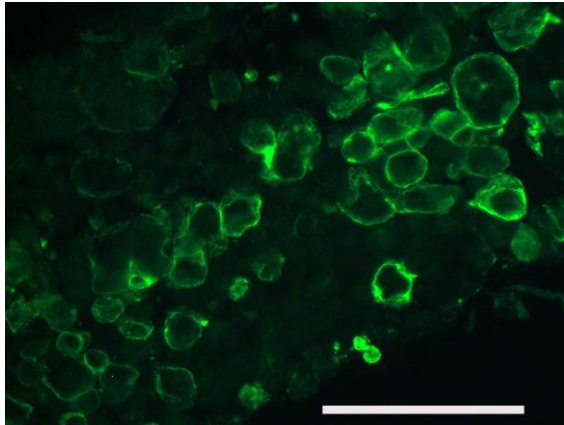


Abb. 17a: Die F4/80-positiven Zellen stellen sich grün dar.

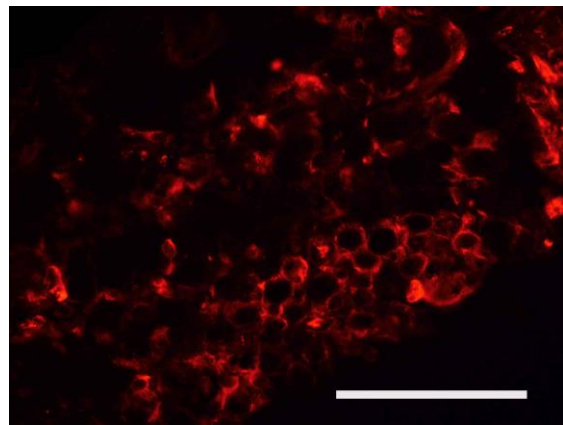


Abb. 17b: Die S100-positiven Zellen erscheinen rot.

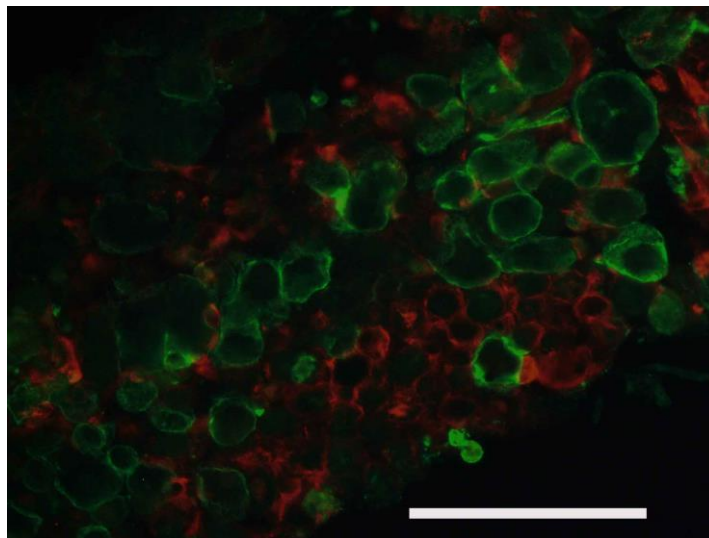


Abb. 17c: Die Überlagerung der beiden immunhistochemischen Marker S100 und F4/80 zeigt keine Colokalisation der immunpositiven Eigenschaften. x40 (Maßstab für alle a bis c: 100µm)

Die Doppelimmunhistochemie für die Marker F4/80 und S100 an verschiedenen co-kultivierten Nervenstücken zeigt an keiner Stelle doppelt gefärbte Zellen und schliesst somit doppelt positive Zellen für diese Immunmarker aus. Dies lässt darauf schliessen, dass die Schwann-Zellen im vorliegenden Experiment keine Makrophagen-Eigenschaften vom F4/80-Typ entwickeln.

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wird anhand eines Co-Kulturmodells nach Hann-Bonnekoh (1989) aus Nervengewebe und Peritonealzellen ein Axotomiemodell für die Wallersche Degeneration im PNS nachgestellt. Mit Hilfe einer FACS-Analyse und Zytozentrifugaten wird zunächst die Ausgangspopulation der Peritonealzellen näher bestimmt. Die FACS-Analyse ergibt, dass mit 50 % die Hauptpopulation der Peritonealzellen aus Makrophagen besteht. Die zweitgrößte Zellpopulation liegt mit 25 % durch B-Lymphozyten vor. Es können weitere Immunzellen zu einem geringeren Prozentsatz nachgewiesen werden. Der immunhistochemische Nachweis verschiedener Oberflächenmarker an Zytozentrifugaten ergibt, dass die Peritonealzellen hauptsächlich die Makrophagenmarker Mac-1 (60 %), F4/80 (46 %), CD 68 (62 %) und CD 204 (50 %) exprimieren. Die höchste Expression zeigt Mac-3 mit 74 %.

Anhand des Co-Kulturmodells wird nun der Einfluss der beiden Kulturmedien Panzerin und DMEM auf die Phagozytoseleistung und die Migrationsfähigkeit der Peritonealzellen insbesondere von Peritonealmakrophagen verglichen. Hierbei zeigt sich unter der Kultivierung mit Panzerin eine höhere Anzahl und Größe der Peritonealzellen. Ebenso zeigen sich morphologische Unterschiede, die darin bestehen, dass sich unter einer Kultivierung mit Panzerin ausgeprägtere Zellfortsätze ausbilden und eine deutliche Absetzung der Zellen am Boden der Kulturschalen erkennbar ist. Das co-kultivierte Nervengewebe wird mittels immunhistochemischer und ORO-Färbungen genauer analysiert. Die Analyse der verschiedenen immunhistochemischen Färbungen ergibt eine höhere Expression der Makrophagenmarker Mac-1, F4/80, CD 68 und CD 204 für die DMEM-kultivierten Nervenstücke im Vergleich zu Panzerin. Die Panzerin-kultivierten Nervenstücke weisen nur eine höhere Expression für Mac-3 und den T-Zellmarker CD 3 auf. Die Ergebnisse der ORO-Färbungen zeigen eine höhere Anzahl ORO-positiver Zelleinschlüsse für die Kultivierung mit Panzerin aber eine größere ORO-positive Fläche pro Zelle innerhalb der DMEM-Kulturen. Um zu untersuchen, welche Marker typisch für lipidhaltige Zellen sind, werden Überlagerungen von verschiedenen Immunhistochemien mit ORO-Färbungen angefertigt. Die Überlagerungen der ORO-Färbungen mit den Immunmarkern Mac-1, F4/80 und CD 204 zeigen sowohl Überlappungen als auch Co-Lokalisationen an. Die Doppelimmunhistochemie der Marker S100 und F4/80 zeigt allerdings keine Überlappung bei Schwann-Zellen und Makrophagen. Darüber hinaus wird das Migrationsverhalten der Peritonealzellen anhand von 3D-Migrationskammern unter dem Einfluss der beiden Kul-

turmedien untersucht. Hierbei zeigt sich eine deutliche Migrationstendenz der Peritonealzellen zum Kulturmedium Panserin, da hier im Vergleich zu DMEM die Größe und die Anzahl der Peritonealzellen überwiegen.

4.1 Populationszusammensetzung der Peritonealzellen

Im Rahmen der Wallerschen Degeneration im PNS tragen verschiedene Immunzellen bestimmte Effektorfunktionen und ermöglichen durch ein enges Zusammenspiel untereinander zum einen den effizienten Ablauf der Wallerschen Degeneration und zum anderen die Aussicht auf eine sich anschließende axonale Regeneration (Bosse 2012).

Um die genauere Verteilung und die konkreten Funktionen der verschiedenen Immunzellen während dieses Prozesses näher zu bestimmen, entwickeln Wissenschaftler u. a. verschiedene experimentelle Degenerationsmodelle.

Im Hinblick auf das von uns eingesetzte Co-Kulturenmodell nach Hann-Bonnekoh (1989), wird zunächst die Ausgangspopulation der Peritonealzellen anhand einer FACS-Analyse und Zytozentrifugaten näher charakterisiert.

Die FACS-Analyse der Peritoneallavage ergibt, dass die Makrophagen mit 50% den Hauptanteil dieser Zellen bilden. Somit spiegelt die Ausgangssituation für das Modell die Zellverteilung gut wider, da auch während der Wallerschen Degeneration die Makrophagen die Haupteffektorzellen der anfänglichen Entzündungsreaktion sind (Brück et al. 1996). Das Verhalten der Makrophagen kann in diesem Modell nun näher untersucht werden.

Neben den Makrophagen ist auch ein hoher Anteil an B-Lymphozyten, den Effektorzellen des adaptierten Immunsystems vertreten, die hier aus dem Mausperitoneum abstammen. Der relativ hohe Zellanteil an B-Lymphozyten zeigt die von uns artifiziell durch Thioglykollat (TG) erzeugte Peritonitis an. T-Lymphozyten, die ein Bindeglied zwischen dem angeborenen und adaptiven Immunsystem herstellen, sind ebenfalls mit einem geringeren Prozentsatz vorhanden.

Somit spiegeln die Ergebnisse der FACS-Analyse eine spätere Phase der Wallerschen Degeneration wider, in welcher bereits mobilisierte Makrophagen und Effektorzellen des adaptiven Immunsystems den weiteren Verlauf bestimmen. Folglich ist die Zellsuspension der Peritoneallavage für die *in-vitro*-Co-Kultivierung mit Nervengewebe geeignet, um ein Modell der Wallerschen Degeneration zu simulieren.

Der nicht geringe prozentuale Anteil an Zelldebris und die allein durch die FACS-Analyse nicht näher identifizierbaren Zellen deuten auf weitere grundlegende Einflussfaktoren innerhalb dieses Modells hin.

Die Aussagen der FACS-Analyse werden durch die Ergebnisse der Zytozentrifugate unterstützt, da hier eine hohe Expressionsrate für die Marker CD 204, F4/80, CD 68 und Mac-1 ebenfalls auf einen hohen Anteil an Makrophagen hinweist. An dieser Stelle ist zu erwähnen, dass die ermittelten immunhistologischen Eigenschaften Aussagen zum funktionellen Zustand der Makrophagen zulassen. Da die Hälfte der Zellen den Marker CD 204 (ScR) exprimieren, ist davon auszugehen, dass sich die Makrophagen, die von uns zu Beginn zu den Co-Kulturen zugefügt werden, funktional bereits in einem antiinflammatorischen Zustand des Phänotypes M2 befinden (Kigerl et al. 2009). Bei den Ergebnissen der Zytozentrifugate fällt auf, dass der höchste Anteil mit 74% für den Marker Mac-3 vorliegt. Da die Daten aus der FACS-Analyse nur ca. 50% Makrophagen identifiziert haben, verdeutlicht dies, dass Mac-3 nicht nur ausschließlich Makrophagen, sondern auch noch weitere Zellpopulationen, nämlich neutrophile Granulozyten und T-Zellen, positiv markiert.

Weitere Marker wie CD 34 für Fibroblasten, CD 3 für T-Lymphozyten, Chloracetatesterase für Mastzellen und Granulozyten und Toluidinblau speziell für Mastzellen zeigen ebenfalls, dass neben den Makrophagen auch weitere Populationen mit einer geringeren Anzahl an der Zellzusammensetzung nach der Thioglykollat-Stimulation beteiligt sind.

Wenn man die weiteren Ergebnisse beider Methoden miteinander korreliert, so lässt sich der definierte Prozentanteil von 8% Zelldebris der FACS-Analyse zumindest teilweise durch die 12% Fibroblasten der Zytozentrifugate erklären.

Insgesamt deuten unsere Ergebnisse der FACS-Analyse und der Zytozentrifugate zwar daraufhin, dass die Zellen der Peritoneallavage eine reproduzierbare Ausgangspopulation für das ausgewählte Modell darstellen. Allerdings zeigen die Daten auch, dass bei dem von uns eingesetzten Verfahren keine reine Makrophagenpopulation durch die Peritonitis entsteht.

4.1.1 Expression von Oberflächenrezeptoren bei Peritonealzellen

Im Hinblick auf die Ergebnisse der Immunhistochemien ist es daher wichtig zu beachten, dass bestimmte Oberflächenmarker zwar eine gewisse Zellspezifität vermuten lassen, aber trotzdem auch geringe Zellzahlen weiterer Zellpopulationen als positiv mit angezeigt werden kön-

nen. Um die Zellpopulationen genau bestimmen zu können, nutzen Wissenschaftler häufig eine Kombination aus Oberflächenexpressionsmustern, die auf eine spezifische Zellpopulation hinweisen. Für die genaue Bestimmung der jeweiligen Zellpopulation ist nicht nur der einzelne Oberflächenmarker ausschlaggebend, sondern die Kombination einzelner Marker entscheidend.

Anhand von Doppelmarkierungen identifiziert die Arbeitsgruppe von Pilling (2009) unterschiedliche Kombinationen von Oberflächenmarkern, welche die Differenzierung zwischen humanen Blutmakrophagen, Gewebemakrophagen, Fibroblasten und Fibrozyten ermöglicht. Mit ihrer Arbeit weisen sie eine genaue Kombination an Oberflächenmarkern für die jeweiligen Zellpopulationen nach (Pilling et al. 2009).

Auf den Marker CD 68 bezogen, der von uns speziell als Makrophagenmarker eingesetzt wird, vermuten Pilling und Kollegen, dass er neben den Makrophagen zusätzlich auch noch von Fibroblasten exprimiert wird (Pilling et al. 2009).

Weitere Aussagen hierzu werden im Vergleich zwischen serumhaltigen und serumfreien Kulturmedium getroffen. (vgl. Kapitel 4.3.4 Unterschiedliche Oberflächenrezeptoren bei Makrophagen in Nervenstücken)

Ebenso ist zu berücksichtigen, dass aufgrund der technischen Gegebenheiten bei der Peritoneallavage vermehrt Fibroblasten in die Kulturen gelangen. Dies trifft jedoch auf beide Kulturmedien gleichermaßen zu und erklärt nicht den signifikanten Unterschied.

Die Ergebnisse von Mäurer und Kollegen verdeutlichen Parallelen zwischen Makrophagen und Fibroblasten. Anhand transgener Mäuse, denen heterozygot das Gen für das Myelinprotein P0 (P0^{+/-}) fehlt, können sie GFP-positive (GFP; *green fluorescent protein*) und GFP-negative endoneuronale Makrophagenpopulationen identifizieren. Innerhalb der GFP-positiven Makrophagenpopulation können sie eindeutig morphologische Charakteristika von Fibroblasten und eine positive Expression des fibroblastentypischen Stammzellmarker CD 34 nachweisen (Mäurer et al. 2003).

Weitere Ergebnisse im Hinblick auf Parallelen zwischen Makrophagen und Fibroblasten präsentiert die Arbeitsgruppe von Groh und Kollegen, indem sie Connexin 32-defiziente und CSF-1-defiziente Mäusen (CSF-1; *colony stimulating factor*) kreuzen und Doppelimmunhistochemien des Markers F4/80 für Makrophagen und CD 34 für Fibroblasten durchführen, um zwischen diesen beiden Zellpopulationen zu differenzieren. Mithilfe einer weiteren Doppelimmunhistochemie der Marker CSF-1 als Makrophagenaktivator und CD 68 für die Identifizierung von Makrophagen weisen sie eine höhere Anzahl an CSF-1-positiven Zellen mit

einer Co-Lokalisation für CD 34 als für CD 68 nach. In dieser nachgewiesenen Zellpopulation vermuten sie Fibroblasten und in Bezug auf die CD 68-positiven Makrophagen können sie einen räumlich engen Zellkontakt zwischen diesen beiden Zellpopulationen nachweisen (Groh et al. 2012).

In der vorliegenden Arbeit haben Doppelimmunhistochemien für F4/80 und CD34 in den 8 Tage lang co-kultivierten Nervenstücken keine Co-Lokalisation zeigen können. Dies könnte allerdings an der langen Kultivierungsdauer liegen, an deren Ende möglicherweise keine immunpositiven Zellen mehr nachweisbar sind.

4.1.2 Einfluss von Thioglykollat auf die Immunzellen

Bei der Deutung der Peritonealzellenpopulationen muss die Auswirkung der intraperitonealen Injektion von Thioglykollat (TG) berücksichtigt werden. Es ist zunächst bekannt, dass TG eine chemotaktische Wirkung besitzt und dafür sorgt, dass viele Immunzellen zum Ort der Entzündung rekrutiert werden (Eichner und Smeaton 1983).

Für die von uns eingesetzte intraperitoneale TG-Injektion verwenden wir TG vom Typ NIH (*“incomplete“ thioglykollate*; 225710; Difco) und erhalten 50% Makrophagen und 25% B-Zellen. Im Vergleich zu den Experimenten von Ray und Dittel (2010), die den Einfluss von TG vom Typ "Brewer" auf die Makrophagenanzahl untersuchen, bestätigt sich die Annahme, dass TG die Anzahl rekrutierter Makrophagen anhebt. Ray und Dittel führen hierzu sowohl eine Peritoneallavage ohne vorherige TG-Injektion als auch eine Peritoneallavage mit TG-Injektion durch. Der Vergleich zeigt, dass bei einer Peritoneallavage ohne vorherige TG-Manipulation die Hauptpopulation der Zellen zu 50-60% aus B-Lymphozyten besteht. Die Population der Makrophagen liegt dann lediglich bei 30%. Bei einer Peritoneallavage mit vorheriger TG-Injektion in das Mausperitoneum berichten sie hingegen über eine Verzehnfachung der residenten Peritonealmakrophagen (Ray und Dittel 2010). Diese Aussage stützt somit die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit und zeigt, dass TG unabhängig vom Subtyp, die Anzahl der Makrophagen anhebt.

Eine Abhängigkeit von der Art des TG's im Hinblick auf den funktionellen Zustand der Makrophagen vermuten allerdings Leijh und Kollegen (1984). Sie testeten drei verschiedene TG-Zusammensetzungen und untersuchen sowohl die Verteilung der Peritonealzellen als auch das phagozytische Potenzial und die mikrobizide Eigenschaft der Peritonealmakrophagen. Für

ihre Durchführung verwenden sie TG vom Typ Brewer, TG vom Typ NIH als *“complete“ thioglykollate* (enthält 0,05% Agar und 0,002% Methylenblau) und TG vom Typ NIH als *“incomplete“ thioglykollate* bezeichnet (ohne Agar und Methylenblau). Letzteres entspricht dem von uns eingesetzten TG. Sie finden heraus, dass bei allen drei Applikationen eine maximale Zellanzahl von Granulozyten an Tag 1 erreicht wird, diese jedoch an Tag 4 auf minimale Werte zurückgeht. Somit scheint auch die Inkubationszeit von TG eine entscheidende Rolle zu spielen. Außerdem ist aus den Ergebnissen abzuleiten, dass TG eingesetzt werden kann, um bestimmte Zellpopulationen selektiv in ihrer Zellanzahl anzuheben.

Leijh und Kollegen untersuchen auch den Effekt von TG auf die Makrophagenanzahl, wobei diese laut ihrer Studie in Abhängigkeit von der Modifikation des TG's variiert. Aus der Arbeit ergibt sich, dass eine maximale Zellanzahl der Peritonealmakrophagen an Tag 4 beim Einsatz von TG "Brewer" erreicht wird (Leijh et al. 1984). Dieses Ergebnis wird durch Studien weiterer Wissenschaftler bestätigt (Shaw und Griffin 1982) und deckt sich mit Ergebnissen unseres eigenen Labors (Hann-Bonnekoh et al. 1989). Beim Einsatz von TG "NIH" als *“complete“ thioglykollate* wird die maximale Zellanzahl der Peritonealmakrophagen bereits an Tag 3 erreicht. Bemerkenswerterweise zeigt die Applikation von TG "NIH" als *“incomplete“ thioglykollate* laut Leijh und seiner Arbeitsgruppe bei ihren Tests keinen direkten Effekt auf die Anzahl der Peritoneal-Makrophagen (Leijh et al. 1984). Letztere Aussage bildet daher ein Gegenstück zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit. Anhand der FACS-Analyse und der Zytozentrifugate zeigt sich bei unseren Ergebnissen eine deutlich erhöhte Zellanzahl an Peritonealmakrophagen unter der Manipulation mit TG "NIH". Somit sind die Ergebnisse von Leijh und Kollegen im Bezug auf die Verwendung von TG "NIH" als *“incomplete“ thioglykollate* eher kritisch zu hinterfragen.

Des Weiteren untersuchen Leijh und Kollegen den Effekt von TG auf die Phagozytoseleistung und den intrazellulären Abtötungsmechanismus von Mikroorganismen durch Makrophagen. Sie können zeigen, dass die Phagozytoseleistung der Peritonealmakrophagen, die mit dem TG "Brewer" stimuliert werden, mit der Kapazität von residenten unbehandelten Makrophagen übereinstimmt. Die mikrobizide Eigenschaft der mit TG "Brewer" stimulierten Makrophagen ist jedoch im Vergleich herabgesetzt. Da sie ebenfalls zeigen können, dass die mikrobizide Eigenschaft der Peritonealmakrophagen, die mit TG "NIH" behandelt werden, nicht herabgesetzt ist, vermuten die Autoren, dass diese Eigenschaft in Abhängigkeit von der Art des TG's beeinflussbar ist (Leijh et al. 1984).

Eine weitere zu klärende Fragestellung ist, ob TG einen Einfluss auf die Oberflächenexpression von Zellen und ihren Aktivitätsmodus hat. Dafür spricht, dass bei der Begutachtung der von uns erstellten Zytozentrifugate die Hälfte der Makrophagen den Marker CD 204 (ScR-Marker) exprimieren. Die TG-Injektion mit dem vom Typ NIH kann also dazu geführt haben, dass die Peritonealzellen im Anschluss an die chemisch erzeugte Entzündungsreaktion funktional bereits in einen antiinflammatorischen Phänotyp M2 übergegangen sind.

Das Resultat, dass unter dem Einfluss von TG kein Anstieg der mikrobiziden Eigenschaften der Makrophagen stattfindet (Cohn 1978), spricht allerdings gegen eine TG-induzierte Aktivierung der Makrophagen. Somit stimmen die Ergebnisse von Cohn im Vergleich zu denen von Leijh et al. (1984) nicht überein.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse zu den TG-Vorbehandlungen, dass diese in Abhängigkeit von der Art des TG's und der Inkubationszeit verschiedene Effekte auf die Population der Peritonealzellen besitzen.

4.2 Makrophagen im Co-Kulturmodell

Die Makrophagen spielen als Effektorzellen des angeborenen Immunsystems eine tragende Rolle während der Wallerschen Degeneration. Als mononukleäre Zellen des MAPS stellen sie die Hauptzellen der Phagozytose dar (Beuche und Friede 1984; Brück et al. 1996; Griffin et al. 1992; Stoll und Hartung 1992).

Anhand des Co-Kulturmodells aus degeneriertem Nervengewebe und von außen hinzugefügten Peritonealmakrophagen ist es möglich, dass die Peritonealmakrophagen näher charakterisiert werden. Einerseits ermöglicht dieses Modell die Anzahl der eingewanderten Peritonealzellen in das degenerierende Gewebe festzustellen und somit Aussagen zu deren Migrationsfähigkeit zu treffen. Zum anderen ist die Bestimmung des in den Makrophagen enthaltenen Myelins von Bedeutung für Aussagen zu ihrer Phagozytosekapazität.

4.2.1 Migration: Ortsständige und eingewanderte Makrophagen

Im Hinblick auf den zeitlichen Ablauf der Wallerschen Degeneration, die Funktion und die verschiedenen phänotypischen Expressionsmuster lassen sich die Zellen des MAPS weiter in zwei Subpopulationen einteilen. Somit gibt es auf der einen Seite die ortständigen Gewebe-

makrophagen und auf der anderen Seite die mobilen, aus der Blutbahn rekrutierten Makrophagen (Hirata und Kawabuchi 2002).

Nach den Versuchsdurchführungen für diese Arbeit werden die mobilen Makrophagen untersucht, die mittels Peritoneallavage gewonnen werden. Die von uns durchgeführte FACS-Analyse ergibt, dass 50% der Peritonealzellen Makrophagen sind. Mithilfe von Zytozentrifugaten ermitteln wir für den Maus-Makrophagenmarker F4/80 47% und damit eine ähnliche Zahl. Eine weitaus höhere Expression ist für die Makrophagenmarker Mac-1, CD 68 und CD 204 festzustellen, die somit das Expressionsmuster der Makrophagen aus der Peritoneallavage bestimmen.

Im Hinblick auf die Analyse dieser Peritonealmakrophagen ist es erforderlich ihre Migrationsfähigkeit und Phagozytosekapazität herauszuarbeiten. Für Aussagen zur Migrationsleistung der Makrophagen muss die Anzahl der Makrophagen in den degenerierenden Nervenstücken analysiert werden. Nach der Experimentdurchführung wird die Entwicklung der Makrophagenanzahl und somit ihre Migrationsleistung unter dem Einfluss unterschiedlicher Kultivierungsbedingungen untersucht.

(vgl. Kapitel 4.3.2 Unterschiedliche Größe und Anzahl der Peritonealzellen in DMEM und Panserin).

4.2.2 Phagozytose: Myelinphagozytose

Um das Phagozytosevermögen der Peritonealzellen näher zu analysieren, führen wir an den Nervenstücken der Co-Kulturen ORO-Färbungen durch. Da sich mithilfe von ORO u.a. der Lipidanteil innerhalb der Zellen und somit auch der phagozytierte Myelingegehalt darstellen lässt, sind in der Folge Aussagen zur Phagozytoseaktivität möglich.

An dieser Stelle ist allerdings zu berücksichtigen, dass ORO Fett in Form von Triglyceriden anfärbt und degradiertes Myelin von Makrophagen-phagozytiertem Myelin nicht unterscheidet.

Zum einen können wir anhand unserer Experimentdurchführung ORO-positive Zelleinschlüsse nachweisen und bestätigen somit das Vorhandensein von phagozytierenden Zellen. Andererseits ermitteln wir anhand der ORO-positiven Fläche den Myelinanteil innerhalb einer phagozytierenden Zelle und können Rückschlüsse auf die Phagozytosekapazität vornehmen. Eine tendenziell größere ORO-positive Fläche lässt vermuten, dass größere Partikel phagozytiert werden und eine ausgeprägtere Phagozytosekapazität vorliegt. Eine weitere Möglichkeit

ist, dass Aussagen zu dem Phagozytosemechanismus gemacht werden können. Hierbei sprechen größere ORO-positive Flächen innerhalb einer Zelle möglicherweise für einen phagozytotischen Vorgang von weniger fraktionierten Myelin-Partikeln oder aber für einen verlangsamten Metabolismus beim Abbau des Myelins.

Bei der Analyse der ORO-positiven Zelleinschlüsse berücksichtigen wir auch den Einfluss der unterschiedlichen Kulturmedien.

(vgl. Kapitel 4.3.5 Unterschiedliche Migrations- und Phagozytosefähigkeit)

Ein zu berücksichtigender Aspekt ist, dass die ORO-Färbungen keine Unterscheidung zwischen dem degradierten Myelin in den Makrophagen und den Schwann-Zellen zulässt. Für eine genaue Unterscheidung zwischen diesen beiden Zelltypen ist eine direkte Überlagerung zwischen ORO mit entsprechenden immunhistochemischen Färbungen erforderlich. Eine Doppelmarkierung von ORO mit den immunhistochemischen Nachweisen gelingt in der vorliegenden Arbeit nicht, sodass eine fotografische Überlagerung der jeweiligen Folgeschnitte des Nervengewebes mit den beiden Färbemethoden erfolgt. Die so erstellten Überlagerungen von ORO-Färbungen mit den Markern Mac-1, F4/80 und CD 204 zeigen für alle Antigene sowohl Einzelnachweise als auch Co-Lokalisationen durch Überlagerungen der ORO-positiven Eigenschaften mit den jeweiligen immunhistochemischen Eigenschaften. Somit verdeutlichen die Ergebnisse zunächst, dass es innerhalb des co-kultivierten Nervengewebes Peritonealzellen gibt, die gleichzeitig ORO-positiv und immunpositiv für einen Immunmarker sind und andere Peritonealzellen, die entweder positiv nur für ORO oder nur immunpositiv für einen Marker sind.

Ebenfalls ist anhand unserer fotografischen Überlagerungen eine deutliche Anhäufung der ORO-positiven Strukturen am Rand des Nervengewebes festzustellen. Einerseits lässt dies darauf schließen, dass ORO vor allem neu eingewanderte Phagozytosezellen anzeigt, die sich zunächst am Rand des degenerierten Nervengewebes aufhalten und noch nicht weiter in das Gewebe penetriert sind. Auf der anderen Seite zeigt dieses Ergebnis, dass sich die aktiven Phagozytosezellen vornehmlich am Rand des degenerierten Nervengewebes aufhalten. Die Frage nach weiteren Faktoren, die vor allem im Randgebiet des degenerierten Nervengewebes einen entscheidenden Einfluss auf die Phagozytosezellen ausüben könnten, bleibt an dieser Stelle offen.

4.2.3 Phagozytose: Verschiedene Phagozytoserezeptoren bei Makrophagen

Weitere Studien beschäftigen sich mit den Oberflächenrezeptoren der Makrophagen, welche relevant für die Myelinerkennung und anschließende Phagozytoseleistung sind. Im Mittelpunkt der Untersuchungen stehen hier die Oberflächenmarker CR-3/Mac-1, ScR/CD 204 und FcR.

In der hier vorliegenden Arbeit bestätigen die Überlagerungen der ORO-Färbungen mit den Immunhistochemien die Relevanz der Rezeptoren CR-3/Mac-1, ScR/CD 204 und FcR während des Phagozytoseprozesses, da die ORO-positive Areale für eine vorhandene Phagozytoseaktivität sprechen und Co-Lokalisationen festgestellt werden können.

Bereits in der Vergangenheit untersuchen Brück und Kollegen anhand desselben Co-Kulturmodells, den Einfluss der verschiedenen Oberflächenmarker auf die Myelinphagozytose. Sie können bestätigen, dass der Oberflächenmarker CR-3/Mac-1 der Makrophagen eine wichtige Funktion für die Myelinphagozytose spielt (Brück und Friede 1990). Mit Antikörpern gegen CR-3 kann anschließend gezeigt werden, dass sowohl die Makrophageninvasion als auch der Myelinabbau blockiert werden können (Brück et al. 1995; Brück und Friede 1990; Lunn et al. 1989). Reichert und Rotshenker (2003) schließen sich diesen Aussagen an und verdeutlichen, dass die Myelinphagozytose durch Makrophagen und Mikroglia über den CR-3 einerseits durch Komplement moduliert werden kann. Andererseits ist aber auch eine Phagozytose unabhängig vom Komplement über den CR-3 möglich, welche die Autoren anhand verschiedener Antikörperzugaben zeigen (Reichert und Rotshenker 2003).

Das obengenannte Co-Kulturmodell setzen auch da Costa und Kollegen (1997) ein und untersuchen mittels Durchflusszytometrie den Einfluss von ScR während des Prozesses der Myelinphagozytose. Dabei finden die Autoren, dass sich nach einer Zugabe des Antikörpers 2F8, welcher sich gegen Epitope des ScR (CD 204) auf der Makrophagenoberfläche richtet, dosisabhängige Effekte auf die Migration und den Myelinabbau durch Makrophagen ergeben. Bei einer geringeren Konzentration des Antikörpers 2F8 ist die Phagozytose der rekrutierten Makrophagen vermindert. Eine höhere Dosierung hingegen verhindert zusätzlich die Einwanderung der Makrophagen in das Nervengewebe (da Costa et al. 1997). Dies bestätigt, dass der ScR sowohl eine Rolle für die Gewebeinvasion der Makrophagen (also ihre Migrationsfähigkeit) als auch für die Myelinphagozytose spielt.

Fraser und seine Arbeitsgruppe (1993), die ScR als Adhäsionsmolekül auf der Makrophagenoberfläche identifizieren, weisen nach, dass dieser Rezeptor ebenfalls die Fähigkeit besitzt, sich an weitere Zellen und Komponenten der EZM zu binden (Fraser et al. 1993). Somit kann

davon ausgegangen werden, dass der ScR eine wichtige Rolle für die Mobilisierung von Zellen und ihrer Gewebepenetration spielt.

Weitere Untersuchungen zeigen, dass der Myelinabbau neben den Mac-1-positiven und ScR-positiven Phagozytosezellen auch stark von den FcR-positiven Zellen beeinflusst wird (Beuche und Friede 1986; Scheidt und Friede 1987). Diese Hypothese können Brück und Kollegen (1996) mittels einer selektiven Elimination der Blut-Makrophagen durch Liposomen bestätigen, da hier ein verzögerter Myelinabbau resultiert (Brück et al. 1996).

In verschiedenen *in-vitro*-Studien wird das Phagozytoseverhalten der Mikrogliazellen im ZNS und das der Makrophagen im PNS im Hinblick auf den FcR verglichen. Hierbei stellt sich heraus, dass die Phagozytose der Mikroglia hauptsächlich komplementvermittelt stattfindet und bei den Makrophagen der FcR-abhängige Mechanismus überwiegt. Der Grund wird darin vermutet, dass Mikrogliazellen eher größere Partikel phagozytieren, wohingegen die peripheren Makrophagen zunächst die zu phagozytierenden Bestandteile fragmentieren und erst anschließend inkorporieren (Smith et al. 2001).

Genauere Untersuchungen zeigen auch Unterschiede in der Verteilung der Oberflächenrezeptoren zwischen Makrophagen im PNS und Mikroglia im ZNS. Bell und Kollegen (1994) können beispielsweise zeigen, dass bei den Mikrogliazellen nur auf den perivaskulären Phagozytosezellen der ScR nachweisbar ist (Bell et al. 1994).

Kuhlmann und Kollegen (2002) beschäftigen sich ebenfalls mit dem Unterschied bezüglich der Phagozytoseleistung zwischen Mikrogliazellen und Makrophagen. Mittels der Gabe von intravenösen Immunglobulinen (IVIg's) können sie zeigen, dass die Phagozytoserate und die Expression des FcR auf den Makrophagen im PNS durch diese erhöht wird, was jedoch im ZNS nicht der Fall ist. Anhand der Zugabe von Antikörpern, welche sich gegen den FcR richten, zeigen sie in diesem Zusammenhang, dass sich die IVIg-induzierte Phagozytose auf Basiswerte reduziert. Dies belegt, dass die IVIg-induzierte Phagozytose FcR-abhängig stattfindet (Kuhlmann et al. 2002).

Allen und Aderem (1996) versuchen Unterschiede zwischen dem CR-3- und FcR-vermittelten Phagozytosemechanismus herauszufinden und untersuchen die Phagozytose von komplement-opsonierten und IgG-beschichteten Partikeln. Sie stellen fest, dass die komplement-opsonierten Partikel in die phagozytierenden Zellen einsinken, wohingegen die IgG-beschichteten Partikel durch die Lamellipodien der Phagozytosezellen umfasst werden. Sie können ebenfalls nachweisen, dass je nach Phagozytosemechanismus unterschiedliche Signalwege und verschiedene Zytoskelettproteine dominieren (Allen und Aderem 1996).

4.2.4 Mitwirkung von Myelinproteinen

Im Hinblick auf die genaue Untersuchung der Phagozytose beschäftigen sich zahlreiche Studien mit der Wirkung von Myelinproteinen auf den Phagozytoseablauf und die Phagozytosekapazität der Makrophagen.

Hierzu untersuchen Shine und Kollegen (1992) anhand der Mausmutanten "shiverer", die kein Myelin-Basisches Protein (MBP) enthalten und folglich keine Myelinscheiden besitzen, die Myelinscheidendicke in Abhängigkeit des MBP-Gehaltes. Sie können zeigen, dass, wenn man den "shiverer"-Mutanten mittels Genmanipulation verschieden hohe Anteile von MBP (heterozygot) in das Genom einschleusst, die Tiere doch in der Lage sind Myelinscheiden auszubilden. Abhängig vom Prozentanteil des eingeschleusten MBP's können die Tiere unterschiedlich dicke Myelinscheiden ausbilden (Shine et al. 1992).

Loughlin und Kollegen (1997) untersuchen bei fetalen Gehirnzell-Kulturen der Ratte die Auswirkung auf den MBP-Gehalt bei Zugabe von Peritonealmakrophagen und den Einfluss von Zytokinen und Antikörpern. Sie finden heraus, dass die Zugabe von Peritonealmakrophagen zu den Kulturen die Akkumulation von MBP verstärkt, wobei das MBP besonders um axonale Strukturen akkumuliert. Unter dem Einfluss von Zytokinen wie beispielsweise IFN- γ oder IL-4 sowie dem anti-MOG Antikörper zeigt sich wiederum eine Reduktion des MBP-Gehalts innerhalb der Kulturen (Loughlin et al. 1997).

Dies berücksichtigen auch Copelman und Kollegen (2000). Sie schlussfolgern aus ihren Ergebnissen, bei denen das MBP weiterhin akkumuliert, dass diese Kulturen die Kapazität zur Remyelinisierung besitzen, obwohl die demyelinisierenden Bedingungen bereits beendet sind (Copelman et al. 2000).

Mithilfe desselben Co-Kulturmodells wie in dieser Arbeit, jedoch mit einer Kultivierung über 10 Tage, testen Kuhlmann und Brück (1999) den Einfluss von humanen Immunglobulinen (Ig's). Sie zeigen anhand von Semidünnschnitten deren Einfluss auf die Makrophagenanzahl, die Myelindichte und die Myelinbeladung der Makrophagen. Ihre Resultate verdeutlichen, dass die Gabe von humanen Ig's den Myelinabbau fördert, da in den Semidünnschnitten das Zytoplasma der Makrophagen mit einem höheren Myelinanteil beladen ist. Somit scheinen die Ig's einen immunmodulatorischen Effekt zu besitzen. Darüber hinaus scheint die Gabe von humanen Ig's bei immunvermittelten Erkrankungen, wie z. B. der experimentellen autoimmunen Neuritis (EAN), welche ein Modell für das Guillian-Barré-Syndrom (GBS) bei Tie-

ren darstellt, ein remyelinisierendes Potenzial zu entwickeln. Der genaue Mechanismus ist hier nicht eindeutig geklärt, aber es wird vermutet, dass die Ig's die Opsonierung von Myelin und Axonen verbessern, indem die sekundäre Zellinfiltration aufgehalten wird. Dies soll einer fortschreitenden Demyelinisierung vorbeugen (Kuhlmann und Brück 1999).

4.3 Vergleich zwischen Makrophagen im serumhaltigen und serumfreien Kulturmedium

Um mögliche Einflussfaktoren auf die Entwicklung und die verschiedenen Parameter der Makrophagen herausfinden zu können, ist es von Bedeutung, dass optimale Kultivierungsbedingungen geschaffen werden. Daher steht zunächst die Entwicklung eines geeigneten Kulturmediums im Mittelpunkt.

Im historischen Kontext haben sich für die *in-vitro*-Kultivierung von Zellen im Wesentlichen zwei Richtungen bei der Entwicklung von Kulturmedien etabliert. Auf der einen Seite wird insbesondere für die Kultivierung von neuronalen Zellen das Medium DMEM verwendet und dies meist in einer Menge zwischen 5 und 15% mit FCS angereichert. Auf der anderen Seite wurde bereits in den 70er Jahren des vorigen Jahrhunderts zunehmend auf die Entwicklung von serumfreien Medien geachtet, um die undefinierbarkeit der im Serum enthaltenen Komponenten zu umgehen und trotzdem ein gutes Zellwachstum mit Proliferationsvermögen kombinieren zu können (Bottenstein und Sato 1979; Needham et al. 1987; Romijn 1988).

Einen zentralen Aspekt beim Gebrauch unterschiedlicher Kulturmedien stellt der Einsatz von Serum als Komponente dar. Deshalb beschäftigen sich zahlreiche Forschungsgruppen mit den Vor- und Nachteilen sowie den grundlegenden Unterschieden zwischen serumhaltigen und serumfreien Kulturmedien.

In diesem Zusammenhang prüft Romijn (1988) den Einsatz von Serum und stellt fest, dass sich der Effekt der enthaltenen Wachstumsfaktoren und Hormone zunächst vorteilhaft auf das Zellwachstum innerhalb der Kultivierungsarbeiten auswirkt. In diesen vorteilhaften Eigenschaften sieht er jedoch zugleich auch eindeutige Nachteile für die Kultivierung. Da nämlich die Zusammensetzung der einzelnen Bestandteile nicht genau definiert ist, besteht somit die Möglichkeit, dass serumbasierte Kultivierungsarbeiten nicht präzise reproduziert werden können. Einen weiteren Nachteil sieht er in der Tatsache, dass Serum inhibitorische und toxische Komponenten aufweist. Dies kann Romijn (1988) nachweisen, indem er bei einer Kulti-

vierung mit 50% Serum zytotoxische Effekte feststellt. Auch wenn die Serumkonzentration bei regulären Kultivierungen bei weit geringeren Prozentwerten liegt (neuronale Kultivierungen bei ca. 5-15% Serum), muss ein möglicher zytotoxischer Einfluss berücksichtigt werden. Romijn vermutet, dass unabhängig von der Serumkonzentration diese toxische Komponente vorliegt, diese allerdings durch die zusätzlich wachstumsfördernden Komponenten kompensiert werden kann (Romijn 1988).

Einen weiteren Beitrag leistet die Arbeitsgruppe von Campbell (2007), indem sie nach Kryopreservation zwei verschiedene vaskuläre Zelllinien kultiviert. Diese Kulturen testen sie sowohl unter Zugabe von FCS als auch ohne FCS im Hinblick auf die Zellviabilität. Ihre Ergebnisse zeigen, dass FCS keinen vorteilhaften Effekt auf das Zellwachstum ausübt und bei einer vorangegangenen Kryopreservation die Zellen nach dem Auftauen dann sogar in ihrer Zellviabilität gemindert sind. Insgesamt sehen sie keine Nachteile für die Kryopreservation von Zellen vor einer Kultivierung und sehen den Einsatz von serumfreien Kulturmedien als überwiegend vorteilhaft an (Campbell et al. 2007).

Für Zellkultivierungen ist weiterhin zu berücksichtigen, dass über längere Zeit ein adäquates Milieu gewährleistet sein muss.

Hierzu beschreiben Callizot und Kollegen (2011) ein Co-Kulturmodell aus Schwann-Zellen und sensorischen Neuronen, die sie aus Dorsalwurzelganglien isolieren. Beide Komponenten stammen aus demselben Individuum (Rattenembryo) und dienen der genaueren *in-vitro*-Untersuchung des Myelinisierungsprozesses im PNS. Durch eine Isolierung der reinen Co-Kulturenbestandteile können sie die mitogenen Einflüsse weitgehend ausschalten und erreichen unter der serumfreien Kultivierung mit DMEM und einer Zugabe von *L-ascorbid acid* (AA; L-Ascorbinsäure) nach sieben Kulturtagen eine kontinuierliche Viabilität für bis zu drei Monate. Wird zu den Co-Kulturen Serum zugegeben, zeigen diese eine massive Proliferation an Fibroblasten und es kommt zum Verlust der Zellstabilität. Im Gegensatz dazu gibt es in serumfreien Kulturen ein stabiles Level der Fibroblasten. Zehn Tage nach AA-Zugabe zeigen die Schwann-Zellen hingegen unter dieser serumfreien Kultivierung einen Proliferationsstopp. Es kommt zur Aufregulierung von Myelinproteinen und die Schwann Zellen beginnen mit der Myelinisierung der Axone (Callizot et al. 2011).

Insgesamt sprechen diese Ergebnisse für die erfolgreiche Kultivierung mit serumfreien Kulturmedien. Die Resultate hinsichtlich der erhöhten Fibroblastenproliferation können in der vorliegenden Arbeit anhand der leicht erhöhten Zahlen bei CD34-positiven Zellen im DMEM mit 10% FCS bestätigt werden.

Aufgrund der genannten Nachteile, die serumhaltige Kulturmedien mit sich bringen, ist es also Ziel von zahlreichen Forschungsgruppen, den Einsatz serumfreier Kulturmedien zu fördern. Um serumhaltige Kulturmedien zukünftig weitgehend durch serumfreie Kulturmedien zu ersetzen, bedarf es genauerer Analysen der serumfreien Kultivierungsarbeiten. Für diese Analysen ist es wichtig, dass zunächst die Zusammensetzung für den jeweiligen Einsatz genau festgelegt ist und die erzielten Resultate festgehalten werden. Es werden meist Hormone, Vitamine und Wachstumsfaktoren zugegeben. Diese Arbeitsschritte erfordern aber eine steti-ge Reoptimierung, da jede neu hinzugefügte Komponente wieder zu neuerlichen Veränderungen führen kann.

Um den erfolgreichen Einsatz eines serumfreien Kulturmediums sicher zu stellen und ihre Anwendung auch reproduzieren zu können, ist es notwendig, die erzielten Ergebnisse im Hinblick auf Gemeinsamkeiten und Unterschiede zu einem serumhaltigen Kulturmedium näher zu bestimmen.

Die bisher unpublizierten Ergebnisse aus der Dissertations-Arbeit von Kai Franzen liefern erste Anhaltspunkte dafür, dass verschiedene Makrophagenparameter unter dem Einfluss von DMEM (DMEM+10% FCS) und Panserin (serumfrei) unterschiedliche Werte für diese beiden Kulturmedien zeigen. Hintergrund in dieser früheren Arbeit ist die Suche nach definierten Mengen von Insulin im serumfreien Medium Panserin gegenüber dem serumhaltigen DMEM aus dem Originalexperiment von Hann-Bonnekoh (mit undefinierter Insulinmenge im Serum). In der hier vorliegenden Arbeit mit den Co-Kulturen, bestehend aus degeneriertem Nervengewebe und von außen hinzugefügten Peritonealzellen, nehmen wir einen direkten Vergleich zwischen dem serumhaltigen Kulturmedium DMEM (DMEM+10% FCS) und dem serumfreien Kulturmedium Panserin vor und untersuchen den jeweiligen Einfluss auf die Peritonealzellen. Hierzu erarbeiten wir die Unterschiede und Gemeinsamkeiten der beiden Kulturmedien im Hinblick auf die Zellviabilität, Anzahl- und Größenentwicklung und Morphologie der Peritonealzellen.

Insgesamt verdeutlichen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass sowohl DMEM als auch Panserin als geeignete Kulturmedien eingesetzt werden können. Darüber hinaus deuten die Analyse von Viabilität, Anzahl- und Größenentwicklung sowie morphologische Aspekte daraufhin, dass Panserin als geeignetes Kulturmedium in Betracht gezogen werden kann.

4.3.1 Zellviabilität der Peritonealzellen in DMEM und Panserin

Anhand der Kultivierungsarbeiten mit Panserin als serumfreiem Kulturmedium wird deutlich, dass dieses eine kontinuierliche Viabilität in vergleichbarem Maße wie beim serumfreien Kulturmedium DMEM ermöglicht. Die Ergebnisse unserer Kultivierungsarbeiten der Co-Kulturen bestätigen, dass eine Zellviabilität bei einer Kultivierung von sieben Tagen mit regelmäßigem Mediumwechsel aufrecht erhalten werden kann. Andererseits wird dies auch durch die Ergebnisse der IBIDI-Kammern-Versuche bestätigt, bei denen selbst ohne einen Mediumwechsel die Zellen unter der Kultivierung mit Panserin ein Überleben über acht Tage aufweisen. Wenn man hier die genaue Auswertung der Zellanzahlen betrachtet, stellt sich Panserin für das Überleben der Zellen sogar als geeigneter als DMEM heraus.

Auch die vorliegenden Ergebnisse der ORO-Färbungen im degenerierten Nervengewebe unterstützen diese Aussagen. Da sowohl in den Panserin-Kulturen als auch in den DMEM-Kulturen ORO-positive Zelleinschlüsse nachweisbar sind, ist zunächst davon auszugehen, dass beide Kulturmedien das erforderliche Milieu für eine Phagozytose schaffen. Hierbei spricht die höhere Anzahl ORO-positiver Zelleinschlüsse innerhalb der Panserin-Kulturen möglicherweise für eine umfangreichere Phagozytosefähigkeit. Dies könnte bedeuten, dass Panserin einen stärker aktivierenden Effekt auf die Phagozytose der Makrophagen ausübt als DMEM. Im Gegensatz dazu zeigen die DMEM-Kulturen flächenmäßig größere ORO-positive Zellen, sodass die Phagozytosezellen durch DMEM entweder zu einer intensiveren Phagozytose als in den Panserin-Kulturen angeregt werden oder aber die Phagozytosepartikel hier größer sind oder weniger schnell degradiert werden. Festgehalten werden kann, dass Panserin und DMEM jeweils einen unterschiedlichen Einfluss auf die Peritonealmakrophagen ausüben. Eine weitere Untersuchung der beiden Kulturmedien DMEM und Panserin und dem Einfluss von Serum stellt die Arbeitsgruppe von Montzka (2010) an. Anhand von isolierten humanen mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark testen sie den Einsatz des Kulturmediums Panserin 401 und DMEM, indem sie entweder 2% oder 10% FCS plus verschiedene Wachstumsfaktoren (*basic fibroblast growth factor* (bFGF); *epidermal growth factor* (EGF), *platelet-derived growth factor BB* (PDGF-BB) und Dexamethason hinzufügen oder weglassen. Sie finden mittels der Proliferationsdaten und der Differenzierungseigenschaften der Stammzellen heraus, dass Panserin 401 mit 2% FCS und Zugabe der Wachstumsfaktoren das am ehesten geeignete Kulturmedium ist (Montzka et al. 2010). An dieser Stelle ist anzumer-

ken, dass das Kulturmedium Panserin zunächst serumfrei ist und für die höchste Effizienz Montzka und Kollegen diesem Kulturmedium wieder FCS zugeben müssen. Somit ist hier sicherlich die Sinnhaftigkeit der Vorgehensweise aus der Sicht der hier vorliegenden Arbeit in Frage gestellt. Auch ist zu beachten, dass das Kulturmedium Panserin eigentlich für Makrophagen entwickelt wurde. Montzka und Kollegen wenden Panserin jedoch bei Stammzellen aus dem Knochenmark an, bei denen im Allgemeinen ein höheres Wachstums- und Differenzierungspotenzial erwünscht ist als bei Makrophagen.

Die Arbeitsgruppe von Bollengier (1995) beschäftigt sich gezielt mit DMEM-Kultivierungen, indem sie die Prolaktinsekretion der Hypophysenzellen von Ratten unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen untersuchen. Ihre Arbeit ergibt, dass bei einer Kultivierungsdauer von zwei Tagen die Zellentwicklung und die Prolaktinsekretion zunächst in allen angewendeten Medien vergleichbar sind. Bei einer längeren Kultivierungszeit von acht Tagen jedoch zeigen nur noch die Zellen der reinen DMEM-Kulturen und der DMEM-Kulturen plus FCS eine kontinuierliche Zellentwicklung und höhere Prolaktinproduktion. In einem proteinfreien Hybridoma-Medium und einem Keratinozyten-Medium hingegen sinken sowohl die Zellanzahl als auch die Prolaktinsekretion im Verlauf der Kultivierung (Bollengier et al. 1995).

Insgesamt wird deutlich, dass sowohl das serumhaltige Kulturmedium DMEM als auch das serumfreie Kulturmedium Panserin den Voraussetzungen für eine geeignete Kultivierungsarbeit entsprechen. Da aufgrund der vorliegenden Arbeit die Vermutung naheliegt, dass Panserin möglicherweise ein geeigneteres Kulturmedium als DMEM ist, werden weitere Untersuchungen im Hinblick auf Unterschiede in der Morphologie, Größe und Anzahl der Zellen angestellt, um diese Aussagen zur Migrations- und Phagozytoseleistung der Peritonealmakrophagen zuzulassen.

4.3.2 Unterschiedliche Größe und Anzahl der Peritonealzellen in DMEM und Panserin

Die bisher nicht publizierte Arbeit von Kai Franzen beschäftigt sich u.a. mit dem Einfluss der beiden Kulturmedien DMEM und Panserin im Hinblick auf die Anzahl und Größe der phagozytierenden Zellen. Anhand von Semidünnschnitten kann eine signifikant geringere Makrophagenanzahl unter der serumhaltigen Kultivierung mit DMEM gezeigt werden. In dieser früheren Arbeit kann Franzen im Hinblick auf die Zellgröße finden, dass die phagozytierenden Zellen im Panserin tendenziell größer sind als die Zellen im DMEM.

In der vorliegenden Arbeit vergleichen wir ebenfalls die Entwicklung der Zellgröße und Zellanzahl der Peritonealzellen unter dem Kultivierungseinfluss von DMEM und Panserin. Hierbei stellt sich ein vergleichbares Verlaufsmuster in beiden Kulturmedien heraus. Die Analyse der initialen Zellgrößen unserer Co-Kulturen bestätigen die Ergebnisse von Franzen, da auch in der vorliegenden Arbeit zumindest anfangs die Zellgröße innerhalb der Panserin-Kulturen überwiegt.

Unter Berücksichtigung der Ergebnisse zur Zellviabilität innerhalb beider Kulturmedien, ist die Schlussfolgerung zulässig, dass das serumhaltige Kulturmedium DMEM durch das serumfreie Kulturmedium Panserin ersetzbar ist, da beide Kulturmedien das wachstumsfördernde Milieu in einem vergleichbaren Umfang aufrecht halten. Darüber hinaus lassen die Resultate im Hinblick auf die Entwicklungen von Größe und Anzahl der Peritonealzellen vermuten, dass das Kulturmedium Panserin die Zellviabilität nicht nur in einem vergleichbaren Ausmaß wie das Kulturmedium DMEM fördert, sondern möglicherweise sogar noch günstigere Bedingungen für eine Kultivierung schafft. Es sei an dieser Stelle besonders darauf hingewiesen, dass das serumfreie Panserin vom Hersteller ohnehin für die Kultivierung von Makrophagen empfohlen wird.

4.3.3 Unterschiedliche Zellmorphologie in den Co-Kulturen

Im Hinblick auf die Morphologie der Peritonealzellen zeigen die Ergebnisse der Co-Kulturen in der vorliegenden Arbeit aufgrund der fotografischen Analyse morphologische Unterschiede bei der Kultivierung mit serumhaltigem und serumfreiem Kulturmedium.

Die Tatsache, dass die Zellen der Panserin-Kulturschalen längere Zellfortsätze ausbilden, kann möglicherweise dadurch erklärt werden, dass die beiden Kulturmedien eine unterschiedliche Auswirkung auf den Metabolismus der Zellen besitzen. Neben den längeren Fortsätzen erscheinen die Zellen der Panserin-Kulturschalen abgeflachter und setzen sich in größerer Zahl am Schalenboden ab. Dies spricht möglicherweise für eine ausgeprägtere Sesshaftigkeit aufgrund eines günstigeren Wachstumsmilieus durch das Kulturmedium Panserin.

Um mögliche Einflussfaktoren auf die Zelldichte herauszuarbeiten, vergleicht die Arbeitsgruppe von Bottenstein (1979) die Entwicklung der Ratten-Neuroblastozelllinie B104 in einem serumfreien Kulturmedium unter der Zugabe von Insulin, Transferrin, Progesteron, Selen und Putrescin (diese Zusätze entsprechen den Bestandteilen unseres N2-Zusatzes) mit einem Kulturmedium mit 10% FCS-Zugabe. Sie finden heraus, dass die einzelnen Supple-

mentfaktoren des serumfreien Kulturmediums keinen Effekt auf das Zellwachstum besitzen. Dagegen zeigt sich bei der Kombination der Supplementfaktoren, dass die Zelldichte dieselbe Sättigung wie die Kulturen mit dem FCS-haltigen Kulturmedium erreicht. Außerdem sind die Zellen in den serumfreien Kulturen in der Lage, zahlreiche Zellfortsätze auszubilden. Insgesamt zeigt Bottenstein, dass eine Kultivierung mit serumfreiem Kulturmedium möglich ist und auch die Zellinteraktionen nicht eingeschränkt erscheinen (Bottenstein und Sato 1979).

4.3.4 Unterschiedliche Oberflächenrezeptoren bei Makrophagen in Nervenstücken

Die Komponente Serum scheint sich auch auf die Expression von Oberflächenrezeptoren der Peritonealmakrophagen auszuwirken. Hierauf bezogen untersuchen wir die in das Nervengewebe eingewanderten Peritonealmakrophagen aus den Co-Kulturen. Die Auswertungen der immunhistochemischen Färbungen der co-kultivierten Nervensegmente zeigen eine deutlich hohe Expression der Marker Mac-1/CR-3, CD 68 und CD 204/ScR unter dem Einfluss des serumhaltigen Kulturmediums DMEM. An dieser Stelle lässt sich vermuten, dass der Einfluss des FCS mit einem erhöhten Vorkommen von Ig's und damit von Zytokinen und Chemokinen einhergeht und diese verantwortlich für die höhere Expression der jeweiligen immunhistochemischen Eigenschaften sind.

Die Arbeit von van Rossum und Kollegen (2008) verwendet dasselbe Co-Kultursystem wie diese Arbeit, wobei sie außer Ischiasnervenstücken auch Sehnervensegmente von Mäusen für die Co-Kulturen einsetzen. Das Nervengewebe kultivieren sie mit dem gleichen wie von uns eingesetzten serumhaltigen Kulturmedium DMEM (DMEM + 10% FCS) und charakterisieren ebenfalls den Phänotyp der eingewanderten Makrophagen in den Nervenstücken. Auch van Rossum et al. (2008) vergleichen das Migrationsverhalten und die Phagozytosekapazität der Makrophagen. Mit Hilfe von verschiedenen Immunhistochemien ermitteln sie die Expression von Oberflächenrezeptoren und mittels ELISA erstellen sie ein Profil von Zytokinen und Chemokinen. Ihre immunzytologische Analyse ergibt, dass die Marker F4/80, Mac-1 und CD 204 von einer hohen Anzahl der Makrophagen exprimiert wird und was demnach unsere Ergebnisse bestätigt. Darüber hinaus können sie für das Profil der Zytokine und Chemokine zeigen, dass zwar der zeitliche Verlauf der Freisetzung bei peripherem wie zentralem Nervengewebe ähnlich ist, aber stark abweichende Unterschiede für die jeweiligen Zytokine und Chemokine gelten. Die Autoren schließen aus ihren Ergebnissen, dass unter der DMEM-Kultivierung im Laufe der Zeit Faktoren freigesetzt werden, die die weiteren Kultivierungs-

bedingungen beeinflussen (van Rossum et al. 2008). Es ist ebenso davon auszugehen, dass die Chemokine und Zytokine nicht nur die Zelleigenschaften der Makrophagen sondern auch Zellinteraktionen zu weiteren Zellpopulationen entstehen lassen. Da ebenso wie bei unseren Ergebnissen auch bei van Rossum und Kollegen eine hohe Expression der Immunmarker Mac-1, F4/80 und CD 204 vorliegt, unterstützt dies unsere Annahme, dass der Einfluss der Chemokine und Zytokine hierfür verantwortlich sein kann.

Den Zusammenhang zwischen serumfreien und serumhaltigen Kulturmedien und den Einfluss von Zytokinen und Chemokinen auf die Expression von Oberflächenmarkern untersucht auch die Arbeitsgruppe von Flesch und Kollegen (1999), indem sie sich mit der Freisetzung von Chemokinen durch Knochenmarks-Makrophagen als Abwehrreaktion auf die Infektion mit *Listeria monocytogenes* oder mit *Mycobacterium bovis* beschäftigt. Ihre Resultate zeigen, dass FCS vermutlich niedrigmolekulare Faktoren enthält, die die Knochenmarks-Makrophagen im Vorhinein aktivieren. Insbesondere nach Stimulation mit *M. bovis* zeigen die Makrophagen höhere Spiegel von MCP-1, MIP-1 α , IL-6 und TNF- α , wenn FCS im Medium enthalten ist im Gegensatz zu serumfreiem Medium (Flesch und Kaufmann 1999). Diese Ergebnisse bestätigen die vorherigen Aussagen, indem sie zeigen, dass Zytokine und Chemokine unter dem Einfluss von Serum eine stärkere Expression zeigen und eine Aktivierung der Makrophagen induzieren.

Pilling und Kollegen (2009) legen die Vermutung nahe, dass CD 68 neben Makrophagen zusätzlich auch noch von Fibroblasten exprimiert wird (Pilling et al. 2009).

Für die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit kann dies somit eine Erklärung für die höhere Expression von CD 68 innerhalb der serumhaltigen DMEM-Kulturen sein und weist auf eine höhere Kontaminationsrate an Fibroblasten unter serumhaltigen Kultivierungsbedingungen hin. Die Tatsache, dass hier der Fibroblastenmarker CD 34 innerhalb der co-kultivierten Nervenstücke im Panserin signifikant weniger Zellen markiert als im DMEM, kann daraufhin deuten, dass Panserin als serumfreies Medium die Fibroblastenexpansion eher unterdrückt.

Dies unterstützt die oben erwähnte Arbeit von Callizot und Kollegen (2011), die ebenfalls zeigen können, dass unter serumfreien Kultivierungsbedingungen eine geringere Fibroblastenkontamination vorliegt (Callizot et al. 2011).

Auch die bereits erwähnte Arbeit von da Costa et al. (1997) zeigt, dass der Antikörper 2F8, der sich gegen CD 204/ScR richtet, in Abwesenheit von Serum die Myelinphagozytose nicht hemmt. Dies unterstützt die oben aufgeführte Vermutung, dass der ScR-vermittelte Myelinabbau eine Serumkomponente im Medium voraussetzt (da Costa et al. 1997).

Die Arbeitsgruppe von Eske (2009) kommt zu dem Schluss, dass aufgrund der teils undefinierbaren Serumkomponenten und somit mangelhafter Reproduzierbarkeit der Einsatz von serumfreien Kulturmedien zu befürworten ist. An Knochenmarkstammzellen untersuchen sie den Einfluss des serumfreien Kulturmediums RPMI 1640, das sie mit 5 % Panexin, 50 µm Mercaptoethanol und 2 ng/ml rekombiniertem, murinem GM-CSF supplementieren (Panexin ist ein chemisch definierter Serumersatz und dient der Kultivierung von adhärennten Zellen unter serumfreien Kultivierungsbedingungen). In ihrer Arbeit vergleichen sie dieses Medium mit einem FCS-haltigen Kulturmedium im Hinblick auf die Expression von Oberflächenmarkern, die Produktion von Zytokinen und die bakterizide Kapazität von Makrophagen. Die Ergebnisse zeigen, dass die Zellen nach einer 10-tägigen serumfreien Kultivierung die myeloiden Oberflächenmarker F4/80, CD 11b, CD 11c und MOMA-2 exprimieren. Nur wenige Zellen exprimiert den lymphoiden Marker CD 3, was für eine geringe Kontaminationsrate durch Lymphozyten spricht (Eske et al. 2009).

4.3.5 Unterschiedliche Migrations- und Phagozytosefähigkeit

Die Migration und die Phagozytose sind zwei unterschiedliche Vorgänge, die deshalb auch getrennt voneinander betrachtet werden sollten.

Um zunächst das Migrationsverhalten der Peritonealzellen unter dem Einfluss der Kulturmedien DMEM und Panserin genauer zu untersuchen, werden sogenannte 3D-Migrationskammern in ihrer Handhabung modifiziert, um die Migrationstendenz der Peritonealzellen bestimmen zu können.

Für gewöhnlich werden diese 3D-Migrationskammern für die Analyse von Chemokingradienten eingesetzt. Für die hier vorliegende Studie wird das Modell an die Fragestellung der Arbeit adaptiert, indem mit den 3D-Kammern das Migrationsverhalten von Peritonealzellen in direktem Kontakt zu beiden Medien untersucht wird. Das Modell ermöglicht somit Aussagen über die Präferenz der Zellen zwischen den beiden Kulturmedien DMEM und Panserin. Im Gegensatz zu den Co-Kulturen liegt hier kein Einfluss durch degeneriertes Nervengewebe vor.

Die Ergebnisse der 3D-Kammer-Experimente zeigen, dass die Peritonealzellen sich trotz fehlenden Medienwechsels in beiden Medien zunächst gut entwickeln. Im Zeitverlauf nimmt die Zellanzahl zwar in beiden Medien ab, aber die Gesamtentwicklung weist in beiden Medien

ein vergleichbares Muster auf. Allerdings sind während der gesamten Kultivierungszeit sowohl eine signifikant höhere Zellanzahl als auch größere Zellen in dem serumfreien Kulturmedium Panserin nachweisbar. Dies bestätigt eine deutliche Migrationstendenz und Überlebensfähigkeit der Peritonealzellen im Kulturmedium Panserin. Somit sprechen die Ergebnisse der Co-Kulturen und der 3D-Kammern für Panserin als ein geeignetes Kulturmedium und passen zu den Daten von Kai Franzen, der in Panserin-kultivierten Nervenstücken ebenfalls eine höhere Anzahl und Größe phagozytierender Zellen detektiert als im DMEM.

Die folgenden Ergebnisse zu den ORO-Färbungen an den degenerierten Nervenstücken der Co-Kulturen der vorliegenden Arbeit schliessen sich den Aussagen an.

Da sich bei den ORO-Färbungen innerhalb der Panserin-Kulturen eine höhere Anzahl an ORO-positiven Zelleinschlüssen ergibt, lässt sich vermuten, dass in diesen Kulturen eine größere Anzahl von Zellen eine aktivere Phagozytose betreibt als in den DMEM-Kulturen.

Dagegen ist allerdings festzustellen, dass eine größere ORO-positive Fläche innerhalb der DMEM-kultivierten Peritonealzellen vorliegt. Diese Ergebnisse stimmen mit der unpublizierten Daten von Kai Franzen überein, der anhand von gefärbten Semidünnschnitten ebenfalls eine tendenziell größere Menge an phagozytiertem Myelin innerhalb der Zellen in den DMEM-Kulturen feststellt. Dies kann bedeuten, dass die Zellen unter einer DMEM-Kultivierung größere Partikel phagozytieren und die Phagozytosekapazität der einzelnen Zellen hier stärker ausgeprägt ist. Eine weitere Möglichkeit ist, dass unsere Ergebnisse auf einen unterschiedlichen Phagozytoseablauf innerhalb der beiden Kulturmedien hindeuten. Eine Ursache für größere ORO-positive Flächen innerhalb der DMEM-Kulturen ist, dass die phagozytierten Partikel innerhalb der ORO-positiven Zellen weniger fragmentiert vorliegen als bei den Phagozytosezellen der Panserin-Kulturen. Dies legt die Vermutung nahe, dass Serum nicht nur einen Einfluss auf die Zellentwicklung sondern auch auf die Phagozytosefähigkeit besitzt. Ebenso könnte es allerdings auch den Metabolismus des inkorporierten Myelins beeinflussen, d.h. das Myelin wird intrazellulär evtl. langsamer abgebaut.

Weitere Untersuchungen zur Phagozytose und zum Migrationsverhalten der Peritonealzellen werden von anderen mithilfe von Inhibitorstudien durchgeführt. Hierzu untersuchen Liefner et al. (1998) zum Beispiel anhand von *in-vitro*-Modellen den Effekt von Pentoxifyllin (POX) auf die Makrophagenmigration und den Myelinabbau. POX als Phosphodiesterasehemmer inhibiert die Produktion von TNF- α und reduziert die Expression des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 (interzelluläres Zelladhäsionsmolekül 1) auf der Makrophagenoberfläche. Analog zu unseren Experimenten zeigen Liefner und Kollegen an den Co-Kulturen aus Nervengewebe

und Makrophagen, dass eine niedrige Dosis von POX den Myelinabbau verstärkt, ohne dabei die Migration der Phagozytosezellen zu beeinflussen. Dagegen kann eine höhere POX-Konzentration die Invasion der Makrophagen verhindern (Liefner et al. 1998). POX reguliert also konzentrationsabhängig die zwei Funktionen der Makrophagen, nämlich ihre Migration und ihre Phagozytose.

Eine weitere Untersuchung mit einem anderen Inhibitor führen Siebert und Kollegen (2001) ebenfalls anhand des Co-Kulturmodells aus Peritonealzellen und Nervengewebe durch und testen den Effekt von bis-4-Nitrophenylphosphat (BNPP), der die alpha-Naphthylesterase (alpha-NA-Esterase) spezifisch blockiert. Getestet werden das Migrationsverhalten und die Myelinaufnahmekapazität der Makrophagen. Die Arbeit zeigt, dass BNPP über die Blockade von alpha-NA-Esterase einen Doppeleffekt besitzt, der sich zum einen in einer herabgesetzten Migration der Makrophagen in das Nervengewebe und zum anderen in einer verminderten Myelinaufnahme durch Makrophagen darstellt (Siebert et al. 2001a).

4.4 Effekte von serumfreiem Medium auf Schwann-Zellen

Um den Einfluss der Schwann-Zellen während der Wallerschen Degeneration im PNS näher analysieren und verschiedene Interaktionsmuster herausarbeiten zu können, ist es von Bedeutung, dass spezifische Oberflächenmarker für die Schwann-Zellen festgelegt werden. Anhand der hier durchgeführten Doppelfluoreszenzimmunhistochemien mit den Markern F4/80, der vornehmlich Makrophagen detektiert und S100, der Schwann-Zellen positiv markiert, können wir keine Überlappungen der hierfür positiv markierten Zellen feststellen. Aus diesen Ergebnissen lässt sich zunächst ableiten, dass Makrophagen und Schwann-Zellen zumindest im Bezug auf die Marker F4/80 und S100 phänotypisch unterschiedlich ausgestattet sind.

Die Arbeitsgruppe von Stoll und Kollegen (1989) erarbeitet anhand einer Acrylamid-induzierten Wallerschen Degeneration an Ischiasnerven der Ratte die genaue Lokalisation von Makrophagen und Schwann Zellen. Sie werten hierzu Elektronenmikroskopie und Immunhistochemien an den kryopreservierten Nervenstücken aus und zeigen mittels ED1 als Makrophagenmarker und S100 als Schwann-Zellmarker eine räumliche Abhängigkeit zwischen diesen beiden Zelltypen. Sie können zeigen, dass ein S100-positiver Zytoplasmasaum der Schwann-Zellen und eine Ansammlung weiterer Schwann-Zellen eine zentralgelegene ED1-

positive und zugleich S100-negative Region umgibt, die das Vorhandensein von Makrophagen innerhalb der Basallamina von Schwann-Zellen darstellt (Stoll et al. 1989).

Andere Autoren beschäftigen sich mit den Gemeinsamkeiten von Makrophagen und Schwann-Zellen im Hinblick auf die Zytokinproduktion und stellen fest, dass Schwann-Zellen die makrophagentypische Zytokinexpression übernehmen können. Hierzu entwickeln Martini und Kollegen (2008) *in-vivo*-Experimente mit Mäusen, die gendefizient sind für TLR-2, TLR-4 und MyD88, sodass die Makrophagenrekrutierung zunächst stark herabgesetzt ist. Die Arbeitsgruppe verwendet ein Schwann-Zellen angereichertes Medium, das sie auf Makrophagen geben. Unter dieser "konditionierten Kultivierung" zeigen die Makrophagen nun wieder eine adäquate Reaktion auf die Läsion von Ischiasnerven mit einer Expression von TNF-alpha, IL-1alpha und IL-1beta (Martini et al. 2008). Dies bedeutet, dass eine zunächst herabgesetzte Makrophagenanzahl durch den Zytokineinfluss der Schwann-Zellen stimuliert wird und Schwann Zellen zu Beginn die entscheidende Zytokinexpression übernehmen können. Hierdurch werden zum einen die aktive Rolle der Schwann-Zellen und zum anderen deren Einfluss auf den Ablauf der Wallerschen Degeneration deutlich.

Anhand weiterer Studien mit unterdrückter Makrophagenanzahl kann ebenfalls gezeigt werden, dass Schwann-Zellen, wie auch Makrophagen, den Marker Mac-2 exprimieren und Phagozytose durchführen können (Brück et al. 1996; Saada et al. 1996). Somit ist es von Bedeutung, dass bei der Analyse der Phagozytose neben den hauptsächlichen Phagozytosezellen, nämlich den Makrophagen, der Einfluss durch Schwann-Zellen berücksichtigt wird.

4.4.1 Rolle der Schwann-Zellen als Phagozytosezellen

Da Schwann-Zellen in der ganz frühen Phase der Wallerschen Degeneration auch den Myelinabbau übernehmen, ist die Untersuchung des Phagozytoseverhaltens von Schwann-Zellen im Vergleich zu den Makrophagen ein weiterer Bestandteil zahlreicher Studien. Während der ersten fünf Tage nach der Axonläsion sind Schwann-Zellen zunächst autonom aktiv und phagozytieren die degradierten Myelinbestandteile (Perry et al. 1995).

Nach den ersten Tagen (3 Tage bei der Maus, 5 Tage bei der Ratte) wird die Phagozytosefunktion allerdings hauptsächlich von den Makrophagen aus der Blutbahn übernommen, sodass die Schwann-Zellen insgesamt unabhängig von den Makrophagen agieren (Fernandez-

Valle et al. 1995) und nur eine untergeordnete Rolle für die Myelinphagozytose spielen (Stoll et al. 1989).

Im Rahmen unserer vorliegenden Arbeit können wir die Phagozytosepartikel in Form von eingelagerten Lipidtröpfchen anhand von ORO-Färbungen als vakuolen-ähnliche Strukturen darstellen. Anhand der dargestellten Daten lässt sich vermuten, dass neben ORO-positiven, phagozytierenden Makrophagen auch Schwann-Zellen ORO-positiv sein können, wenn sie ihr eigenes Myelin verdauen und zu kleinen Fettvakuolen metabolisieren. Eine direkte Doppelmarkierung von unseren ORO-Färbungen mit den Immunhistochemien ist technisch nicht möglich, sodass wir nicht unterscheiden können zwischen dem phagozytiertem Myelin innerhalb von Makrophagen und Schwann-Zellen. Um dennoch die ORO-positiven mit immunhistochemischen Eigenschaften korrelieren zu können, bedienen wir uns einer computergestützten fotografischen Überlagerung der co-kultivierten Nervenstücke der einzelnen Färbemethoden. Da neben ORO ansonsten ausschließlich Makrophagenmarker eingesetzt werden, können an dieser Stelle keine genaueren Angaben zu den Schwann-Zellen gemacht werden.

Im Hinblick auf den Myelinabbau durch Schwann-Zellen können aber in der Literatur einige Besonderheiten festgestellt werden. Bevor das Myelin innerhalb der Schwann-Zellen entweder durch diese oder durch Makrophagen phagozytiert wird, bedarf es nämlich weiterer einzelner Schritte. Diese Teilprozesse untersucht Stoll mit seiner Arbeitsgruppe (1989) anhand von elektronenmikroskopischen Bildern und immunhistochemischen Färbungen an durchtrenntem Nervengewebe. Sie finden heraus, dass zunächst das Myelin fragmentiert wird und sich Myelinovoide ausbilden. Diese Myelinovoide lagern sich in das Zytoplasma der Schwann-Zellen ein und erscheinen dann als Lipidtröpfchen (Stoll et al. 1989).

4.5 Ausblick

Mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit kann ein wichtiger Beitrag zur Optimierung von Kultivierungsarbeiten bei Co-Kulturen aus Makrophagen und Nervengewebe geleistet werden, da die Daten bestätigen, dass zukünftig auch neben FCS-haltigen Kulturmedien der Einsatz von serumfreien Kulturmedien möglich ist. Der Einsatz solcher Medien besitzt insofern eine wichtige Bedeutung für die Humanforschung, als mit einer genauen Definition der Kulturmedienbestandteile die Reproduzierbarkeit der Kultivierungsarbeiten gegeben ist. Dies bedeutet eine wichtige Weiterentwicklung, da experimentelle Ansätze nun beliebig wiederholt werden können, die genauen Zusätze zu den Kulturen detailliert festgehalten werden können und durch die möglichen Wiederholungsprozesse eine Optimierung der Ergebnisse erzielt werden kann. Außerdem können die Ergebnisse von serumfreien Kultivierungsarbeiten direkter auf humane Krankheitsbilder bezogen werden, da eine Verunreinigung durch tierische Produkte, wie sie beispielsweise durch FCS-haltige Medien gegeben sein kann, ausgeschlossen ist.

Insgesamt bedeutet dieser Fortschritt bei serumfreien Kultivierungsarbeiten, dass im Hinblick auf die demyelinisierenden Prozesse, die von zahlreichen Arbeitsgruppen und in der vorliegenden Arbeit anhand von Versuchstieren untersucht werden, die erzielten Ergebnisse erste Ansätze für therapeutische Maßnahmen bei menschlichen Erkrankungen liefern.

Anhand der Kultivierungsarbeiten können inflammatorische Kaskaden genauer untersucht und mögliche Einflussfaktoren analysiert werden. Die immunogene Wirkung von Serum kann experimentell ausgeschlossen werden, um schließlich unter gezielter Zugabe von verschiedenen Faktoren die Abläufe bei Entzündungsprozessen im Hinblick auf spätere Heilungsmaßnahmen in der Humanforschung modulieren zu können.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit steht der Vergleich zwischen dem serumhaltigen Kulturmedium DMEM (DMEM mit 10% FCS) mit dem serumfreien Kulturmedium Panserin im Hinblick auf die Zellviabilität, Phagozytoseleistung und Migrationsfähigkeit der Peritonealzellen im Vordergrund. Der Vergleich findet mit Hilfe eines etablierten Co-Kulturmodells aus Ischiasnervenstücken und Peritonealzellen statt.

Die Ausgangspopulation der Peritonealzellen wird zunächst mittels einer FACS-Analyse und immunhistochemischen Färbungen sowie einer Chloracetatesterase- und Toluidinblaufärbung an Zytozentrifugaten genauer charakterisiert. Die Auswertungen der FACS-Analyse und der Zytozentrifugate ergeben zu 50% Makrophagen und zu 25% B-Zellen sowie zu 2,8% T-Zellen und zu 2,7% Granulozyten. An Zytozentrifugaten zeigen immunhistochemisch zwischen 46% und 74% dieser Peritonealzellen makrophagenspezifische Oberflächenrezeptoren wie F4/80, Mac-1, CD 204, CD68 und Mac-3. Außer den Makrophagen als Hauptpopulation bilden ein großer Anteil an B-Zellen und weiteren Immunzellen eine repräsentative Ausgangspopulation für das folgende Co-Kulturenmodell.

Anhand des Co-Kulturenmodells aus Ischiasnervensegmenten und den Peritonealzellen aus C57BL/6-Mäusen zeigt sich, dass beide Kulturmedien adäquate Kultivierungsbedingungen im Hinblick auf die Zellviabilität und das Zellwachstum ermöglichen. Im Vergleich erscheint das serumfreie Kulturmedium Panserin als geeigneter, da hier im Verlauf die Anzahl und Größe der Peritonealzellen auf höherem Niveau bleiben als bei den DMEM-Kulturen. Ebenso weist Panserin einen unterschiedlichen Einfluss auf die Zellmorphologie auf, der sich in ausgeprägteren Zellfortsätzen und Absetzung der Zellen am Boden der Kulturschalen zeigt.

Für co-kultivierte Nervenstücke liefern verschiedene immunhistochemische Färbungen eine höhere Expressionsrate unterschiedlicher Makrophagenmarker (Mac-1; F4/80; CD 68 und CD 204) bei den DMEM-kultivierten Nervenstücken im Vergleich zu Panserin-kultivierten Nervenstücken. FCS fördert daher möglicherweise die Aktivierung immunkompetenter Zellen, die im serumfreien Kulturmedium Panserin offensichtlich fehlt. Ursache für diese Aktivierung kann eine höhere Produktion an Zytokinen und Chemokinen unter dem Einfluss von FCS sein. Des Weiteren bestätigen die Resultate der 3D-Migrationskammern die Ergebnisse der Co-Kulturen, indem auch hier die Größe und die Anzahl der Peritonealzellen in den Panserin-

Kulturen höher sind und sich im Zeitverlauf eine Migrationstendenz der Zellen in die Panserin-haltigen Kammerabschnitte abzeichnet.

Mithilfe von ORO-Färbungen an den co-kultivierten Nervenstücken zeigen sich im Hinblick auf die Anzahl ORO-positiver Zelleinschlüsse höhere Zahlen für die Panserin-kultivierten Nervenstücke und dagegen eine durchschnittlich größere ORO-positive Fläche pro Zelle innerhalb der DMEM-kultivierten Nervenstücke. Hieraus lässt sich schlussfolgern, dass innerhalb der Panserin-Kulturen zwar eine größere Zellanzahl eine aktive Phagozytose betreibt, aber unter DMEM-Bedingungen womöglich eine Phagozytose von mehr und größeren Myelinmengen stattfindet.

Die fotografischen Überlagerungen der ORO-Färbungen mit den immunhistochemischen Markern F4/80, Mac-1 und CD 204 zeigen sowohl Co-Lokalisationen als auch deutliche Einzel-Expression von entweder ORO- oder Oberflächenmarkern. Aufgrund von Doppelimmunhistochemien der Marker F4/80 und S100 kann ausgeschlossen werden, dass Makrophagen und Schwann-Zellen phänotypische Gemeinsamkeiten exprimieren.

Insgesamt weisen die Ergebnisse dieser Arbeit übereinstimmend mit denen anderer Arbeitsgruppen darauf hin, dass eine erfolgreiche Kultivierung sowohl durch das serumfreie Kulturmedium Panserin als auch das serumhaltige Kulturmedium DMEM gewährleistet werden kann. Hinsichtlich der Überlebensrate von kultivierten Zellen zeigt Panserin sogar einen günstigeren Effekt auf die Co-Kultivierung. Somit besteht die Möglichkeit, dass zukünftig serumhaltige Kulturmedien durch serumfreie Kulturmedien ersetzt werden können und eine genauer definierte Zusammensetzung und somit reproduzierbare Kultivierungsarbeit möglich ist. Für die konkrete Umsetzung dieses Ziels bedarf es allerdings weiterer Analysen und Vergleiche bei verschiedenen Kultivierungsmodellen. Im Hinblick auf die Expression verschiedener Oberflächenmarker der kultivierten Zellen sind ebenso weitere Untersuchungen erforderlich, um Zellinteraktionen und Einflussfaktoren stärker berücksichtigen zu können.

Anhang

Tabelle 4 Übersicht zu den Medien und Zusätzen des Co-Kulturmodells:

Komponente:	Herstellerangaben:
Panserin 401	P04-710401; Pan
DMEM (<i>Dulbecco's modified Eagle Medium</i>)	11965-118; Gibco
N ₂ Supplement	Lot 805623; Gibco
Essentielle Aminosäuren	11130-036; Invitrogen; Gibco
Nicht-essentielle Aminosäuren	11140-035; Invitrogen; Gibco
FCS (<i>fetal calf serum</i>)	S 0115; Biochrom
L-Glutamin	K 0282; Biochrom
Penicillin/Streptomycin	A 2212; Biochrom
AraC-hydrochlorid (<i>cytosine arabinoside hydrochloride</i>)	C-6645; Sigma

Tabelle 5 Übersicht zu den Primärantikörpern für immunhistochemische Färbungen:

Primärantikörper:	Verdünnung in PBS:	Herstellerangaben:
Mac-1/ CD 11b	1:50	Rat-anti-mouse; MCA 74; Serotec
Mac-3/ CD 107b/ LAMP-2	1:200	Cat 553322; Clone: M3-84; Pharmingen
CD 3 *	1:150	MCA 1477; Serotec
CD 34	1:1000	Rat-anti-mouse; RAM34 monoclonal; E019241; eBioscience
CD 68/ Mikrosialin/ Ki-M6/ Ki-M7	1:100	Rat-anti-mouse; MCA 1957T; Serotec

Primärantikörper:	Verdünnung in PBS:	Herstellerangaben:
CD 204	1:100	Rat-anti-mouse; MCA 1322T; SEROTEC
F4/80	1:50	Rat-anti-mouse; MCA P497; SEROTEC

Anmerkung: Bei sämtlichen Primärantikörpern wurde der Sekundärantikörper Goat-anti-rat eingesetzt.
*Hier wurde ein anderer Sekundärantikörper benutzt; Goat-anti-rabbit.

Tabelle 6 Übersicht zu den Sekundärantikörpern für immunhistochemischen Färbungen:

Sekundärantikörper:	Verdünnung in PBS:	Herstellerangaben:
Goat-anti-rat (biotinyliert)	1:500	RPN 1005; Amersham
*Goat-anti-rabbit (biotinyliert)	1:500	111-065-144; Dianova

Tabelle 7 Übersicht zu weiteren Komponenten der immunhistochemischen Färbungen:

Komponente:	Herstellerangaben:
DAB (3,3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride hydrate)	D 5637; Sigma
H ₂ O ₂ (Wasserstoffperoxid 30%)	1.08597; Merck
“POX“-Komplex (StreptAvidin)	E 2886; Sigma
Aquamount (Microscopy Aquatex ®)	HC 109850; Merck

Tabelle 8

Übersicht zu den Farbstoffkonjugaten der FACS-Analyse:

Farbstoff:	Antigen:	Herstellerangaben:
APC-Cy7 =Allophycocyanin+Cyanin 7	CD 19	Klon: 6D5; Biolegend
Pe-Cy7 =Phycoerythrin+Cyanin 7	CD 8	Klon: 53-6.7; eBioscience
Pe-Cy7	GR-1	Klon: RB6-8C5; eBioscience
Pe-Cy7	Nk1.1	Klon: PK136; Biolegend
PerCP =Peridinin-chlorophyll-protein complex	B220	Klon: RA3-6B2; BD Pharmingen
PerCP	CD 183	Klon: CXCR3-173; Biolegend
PerCP	CD 3	Klon: 145-2C11; BD Pharmingen
APC =Allophycocyanin	CD 4	Klon: RM4-5; eBioscience
APC	CD 11b	Klon: M1/ 70; eBioscience
PE =Phycoerythrin	CD 27	Klon: LG.3A10; BD Pharmingen
PE	CD 69	Klon: H1.2F3; eBioscience
PE	CD 86	Klon: GL1; eBioscience
FITC =Fluoresceinisothiocyanat	CD 3	Klon: 145-2C11; eBioscience
FITC	MHC-II	Klon: M5/ 114-15.2; eBioscience
FITC	TCRb	Klon: H57-597; eBioscience

Tabelle 9

Übersicht zu weiteren Komponenten der FACS-Analyse:

Komponente:	Herstellerangaben:
FACS-Puffer	PBS+2% FCS
Fc-Block	TruStain fcX™ (anti-mouse CD16/32) Anti-body; 101320; Biolegend
FACS-Gerät	BD FACS Canto II; Beckton Dickinson; (mit entsprechender Herstellersoftware)

Tabelle 10 Übersicht zu den Komponenten der Zytozentrifugate:

Komponente:	Herstellerangaben:
HBSS (<i>Hank's balanced salt solution</i> ; ohne Phenolrot)	14065-049; Gibco
Zytozentrifugationsgerät	Shandon Cytospin 4

Tabelle 11 Übersicht zu den Komponenten der Chloracetatesterasefärbung:

Komponente:	Herstellerangaben:
Natrium-Nitrit	Art. 6544; Merck
Fast-Red-Violett	Lot O81M4337; Sigma-Aldrich
Trizma-Puffer	Lot O71M4371; Sigma-Aldrich
Naphtol-AS-D-Chloracetat	Lot O71M4350; Sigma-Aldrich
Mayers Hämalaun	1.09249.0500; Merck
Immu-Mount (Shandon Immu-Mount Eindeckmittel)	Ref. 9990402; Thermo Scientific

Tabelle 12 Übersicht zu den Komponenten der Toluidinblaufärbung:

Komponente:	Herstellerangaben:
0,1 % Toluidinblau in wässriger Lösung	115930; Merck

Tabelle 13 Übersicht der verwendeten Mikroskope und Kameratypen mit entsprechender Computersoftware:

Mikroskop:	Entsprechende Kamera:	Computersoftware:
Typ Olympus BX40	Colorview II; Olympus BX40	Cell A; Olympus Soft Imaging Solutions; Münster
Typ Olympus BX51	Olympus DP71	Cell F; Olympus Soft Imaging Solutions; Münster
Typ Olympus IX51	Olympus C-4040 Zoom	AnalySIS; Olympus Software Imaging Solutions; Münster

Tabelle 14 Übersicht der weiteren EDV-Programme zur Daten- und Bildverarbeitung:

Programme:
Photoshop (Programm CS4)
Excel (MS Office)
InStat 3 (GraphPad)

Tabelle Nr. 15 zu Abbildung 4

Datenübersicht zur prozentualen Verteilung der immunpositiven Zellen in den Zytozentrifugaten:

Einheit: [%];

Behandlung	Mittelwertwert ±SEM
Chloracetatesterase	1,84 ± 0,13
Toluidinblau	2,39 ± 0,17
CD 68	60,67 ± 3,68
CD 204	48,67 ± 2,80
Mac-1	59,09 ± 3,88
F4/80	43,68 ± 2,51
Mac-3	73,10 ± 1,03
CD 34	11,54 ± 0,65
CD 3	7,88 ± 0,67

Statistik	MWU-Test p-Wert	Signifikanz	Zeichen
Chloracetatesterase vs Toluidinblau	p = 0,0497	signifikant	**
Chloracetatesterase vs Mac-1	p < 0,0001	extrem signifikant	****
Chloracetatesterase vs Mac-3	p < 0,0001	extrem signifikant	****
Chloracetatesterase vs F4/80	p < 0,0001	extrem signifikant	****
Chloracetatesterase vs CD 3	p < 0,0001	extrem signifikant	****
Chloracetatesterase vs CD 34	p < 0,0001	extrem signifikant	****
Chloracetatesterase vs CD 68	p < 0,0001	extrem signifikant	****
Chloracetatesterase vs CD 204	p < 0,0001	extrem signifikant	****
Toluidinblau vs Mac-1	p < 0,0001	extrem signifikant	****
Toluidinblau vs Mac-3	p < 0,0001	extrem signifikant	****
Toluidinblau vs F4/80	p < 0,0001	extrem signifikant	****
Toluidinblau vs CD 3	p < 0,0001	extrem signifikant	****
Toluidinblau vs CD 34	p < 0,0001	extrem signifikant	****
Toluidinblau vs CD 68	p < 0,0001	extrem signifikant	****
Toluidinblau vs CD 204	p < 0,0001	extrem signifikant	****
Mac-1 vs Mac-3	p = 0,8140	nicht signifikant	n.s.
Mac-1 vs F4/80	p < 0,0001	extrem signifikant	****
Mac-1 vs CD 3	p < 0,0001	extrem signifikant	****
Mac-1 vs CD 34	p < 0,0001	extrem signifikant	****
Mac-1 vs CD 68	p = 0,4217	nicht signifikant	n.s.
Mac-1 vs CD 204	p = 0,0007	extrem signifikant	****
Mac-3 vs CD 3	p < 0,0001	extrem signifikant	****
Mac-3 vs CD 34	p < 0,0001	extrem signifikant	****
Mac-3 vs CD 68	p = 0,6893	nicht signifikant	n.s.
Mac-3 vs CD 204	p < 0,0001	extrem signifikant	****
F4/80 vs Mac-3	p < 0,0001	extrem signifikant	****
F4/80 vs CD 3	p < 0,0001	extrem signifikant	****
F4/80 vs CD 34	p < 0,0001	extrem signifikant	****
F4/80 vs CD 68	p < 0,0001	extrem signifikant	****
F4/80 vs CD 204	p = 0,2817	nicht signifikant	n.s.
CD 3 vs CD 34	p = 0,0002	extrem signifikant	****
CD 68 vs CD 3	p < 0,0001	extrem signifikant	****
CD 68 vs CD 34	p < 0,0001	extrem signifikant	****
CD 68 vs CD 204	p = 0,0010	sehr signifikant	***
CD 204 vs CD 3	p < 0,0001	extrem signifikant	****
CD 204 vs CD 34	p < 0,0001	extrem signifikant	****

Tabelle 16 zu Abbildung 6

Datenübersicht über die Zellgrößen der Peritonealzellen in Co-Kulturen im Medienvergleich:

Zellgröße; Einheit: [μm^2]; Kultivierungstage: d1-d8

Behandlung	Mittelwertwert \pm SEM
Panserin d1	310,10 \pm 28,66
Panserin d3	350,85 \pm 29,86
Panserin d5	671,18 \pm 56,47
Panserin d7	626,427 \pm 51,22
Panserin d8	717,48 \pm 75,17
DMEM d1	228,20 \pm 15,92
DMEM d3	206,15 \pm 23,41
DMEM d5	465,35 \pm 44,35
DMEM d7	693,64 \pm 77,17
DMEM d8	667,99 \pm 51,69

Statistik	ANOVA + Dunn-Test p-Wert	Signifikanz	Zeichen
Panserin d1 vs Panserin d3	p > 0,05	nicht signifikant	n.s.
Panserin d1 vs Panserin d5	p < 0,001	sehr signifikant	***
Panserin d1 vs DMEM d1	p > 0,05	nicht signifikant	n.s.
Panserin d3 vs Panserin d5	p < 0,05	wenig signifikant	*
Panserin d3 vs Panserin d8	p < 0,01	signifikant	**
Panserin d3 vs DMEM d3	p > 0,05	nicht signifikant	n.s.
Panserin d5 vs DMEM d5	p > 0,05	nicht signifikant	n.s.
Panserin d8 vs DMEM d8	p > 0,05	nicht signifikant	n.s.
DMEM d1 vs DMEM d3	p > 0,05	nicht signifikant	n.s.
DMEM d1 vs DMEM d5	p < 0,05	wenig signifikant	*
DMEM d1 vs DMEM d7	p < 0,001	sehr signifikant	***
DMEM d3 vs DMEM d5	p < 0,01	signifikant	**
DMEM d3 vs DMEM d7	p < 0,001	sehr signifikant	***

Tabelle 17 zu Abbildung 7

Datenübersicht über die Zellanzahl der Makrophagen in den 3D-Migrationskammern:

Zellanzahl Einheit: [Zellen/mm²]; Kultivierungstage: d1-d7

Behandlung	Mittelwertwert ±SEM
Panserin d1	217,59 ± 16,87
Panserin d2	245,78 ± 23,64
Panserin d3	225,89 ± 24,19
Panserin d4	192,67 ± 16,98
Panserin d5	111,21 ± 15,33
Panserin d6	90,26 ± 9,19
Panserin d7	58,46 ± 6,34
DMEM d1	65,40 ± 5,07
DMEM d2	64,25 ± 5,35
DMEM d3	56,02 ± 4,65
DMEM d4	30,36 ± 2,69
DMEM d5	19,12 ± 1,92
DMEM d6	16,00 ± 1,64
DMEM d7	7,80 ± 0,91

Statistik	ANOVA +Tukey- Kramer p-Wert	Signifikanz	Zeichen
Panserin d1 vs Panserin d2	p > 0,05	nicht signifikant	n.s.
Panserin d1 vs Panserin d3	p > 0,05	nicht signifikant	n.s.
Panserin d1 vs Panserin d5	p < 0,001	sehr signifikant	***
Panserin d1 vs Panserin d6	p < 0,001	sehr signifikant	***
Panserin d1 vs Panserin d7	p < 0,001	sehr signifikant	***
Panserin d2 vs Panserin d3	p > 0,05	nicht signifikant	n.s.
Panserin d2 vs Panserin d4	p > 0,05	nicht signifikant	n.s.
Panserin d2 vs Panserin d5	p < 0,001	sehr signifikant	***
Panserin d2 vs Panserin d6	p < 0,001	sehr signifikant	***
Panserin d2 vs Panserin d7	p < 0,001	sehr signifikant	***
Panserin d3 vs Panserin d5	p < 0,001	sehr signifikant	***
Panserin d3 vs Panserin d7	p < 0,001	sehr signifikant	***
Panserin d4 vs Panserin d5	p < 0,001	sehr signifikant	***

Panserin d4 vs Panserin d6	$p < 0,001$	sehr signifikant	***
Panserin d4 vs Panserin d7	$p < 0,001$	sehr signifikant	***
Panserin d5 vs Panserin d7	$p > 0,05$	nicht signifikant	n.s.
DMEM d1 vs DMEM d2	$p > 0,05$	nicht signifikant	n.s.
DMEM d1 vs DMEM d3	$p > 0,05$	nicht signifikant	n.s.
DMEM d1 vs DMEM d5	$p > 0,05$	nicht signifikant	n.s.
DMEM d1 vs DMEM d6	$p > 0,05$	nicht signifikant	n.s.
DMEM d1 vs Panserin d1	$p < 0,001$	sehr signifikant	***
DMEM d1 vs Panserin d2	$p < 0,001$	sehr signifikant	***
DMEM d2 vs DMEM d5	$p > 0,05$	nicht signifikant	n.s.
DMEM d2 vs DMEM d6	$p > 0,05$	nicht signifikant	n.s.
DMEM d2 vs DMEM d7	$p < 0,01$	signifikant	**
DMEM d2 vs Panserin d2	$p < 0,001$	sehr signifikant	***
DMEM d3 vs DMEM d4	$p > 0,05$	nicht signifikant	n.s.
DMEM d3 vs DMEM d6	$p > 0,05$	nicht signifikant	n.s.
DMEM d3 vs Panserin d3	$p < 0,001$	sehr signifikant	***
DMEM d4 vs DMEM d5	$p > 0,05$	nicht signifikant	n.s.
DMEM d4 vs Panserin d4	$p < 0,001$	sehr signifikant	***
DMEM d5 vs Panserin d5	$p < 0,001$	sehr signifikant	***
DMEM d6 vs Panserin d6	$p < 0,001$	sehr signifikant	***
DMEM d7 vs Panserin d7	$p < 0,01$	signifikant	**

Tabelle 18 zu Abbildung 8

Datenübersicht über die Zellgröße der Makrophagen in den 3D-Migrationskammern:

Zellgröße; Einheit: [μm^2]; Kultivierungstage: d1-d7

Behandlung	Mittelwertwert \pm SEM
Panserin d1	226,39 \pm 9,82
Panserin d2	307,47 \pm 13,24
Panserin d3	427,19 \pm 11,94
Panserin d4	556,49 \pm 6,84
Panserin d5	485,09 \pm 12,28
Panserin d6	413,51 \pm 7,22
Panserin d7	340,57 \pm 6,30
DMEM d1	207,95 \pm 8,07
DMEM d2	217,69 \pm 9,56
DMEM d3	271,16 \pm 7,22
DMEM d4	288,53 \pm 8,76
DMEM d5	268,98 \pm 7,90
DMEM d6	240,60 \pm 5,65
DMEM d7	211,62 \pm 5,06

Tabelle 18 (Fortsetzung)

Statistik	ANOVA +Tukey- Kramer p-Wert	Signifikanz	Zeichen
Panserin d1 vs Panserin d2	$p < 0,001$	sehr signifikant	***
Panserin d1 vs Panserin d3	$p < 0,001$	sehr signifikant	***
Panserin d1 vs Panserin d5	$p < 0,001$	sehr signifikant	***
Panserin d1 vs Panserin d7	$p < 0,001$	sehr signifikant	***
Panserin d1 vs DMEM d1	$p > 0,05$	nicht signifikant	n.s.
Panserin d2 vs Panserin d3	$p < 0,001$	sehr signifikant	***
Panserin d2 vs Panserin d4	$p < 0,001$	sehr signifikant	***
Panserin d2 vs Panserin d6	$p < 0,001$	sehr signifikant	***
Panserin d2 vs DMEM d2	$p < 0,001$	sehr signifikant	***
Panserin d3 vs Panserin d5	$p < 0,001$	sehr signifikant	***
Panserin d3 vs DMEM d3	$p < 0,001$	sehr signifikant	***
Panserin d4 vs Panserin d5	$p < 0,001$	sehr signifikant	***

Panserin d4 vs Panserin d6	$p < 0,001$	sehr signifikant	***
Panserin d4 vs DMEM d4	$p < 0,001$	sehr signifikant	***
Panserin d5 vs Panserin d6	$p < 0,001$	sehr signifikant	***
Panserin d5 vs Panserin d7	$p < 0,001$	sehr signifikant	***
Panserin d5 vs DMEM d5	$p < 0,001$	sehr signifikant	***
Panserin d6 vs Panserin d7	$p < 0,001$	sehr signifikant	***
Panserin d6 vs DMEM d6	$p < 0,001$	sehr signifikant	***
Panserin d7 vs DMEM d7	$p < 0,001$	sehr signifikant	***
DMEM d1 vs DMEM d2	$p > 0,05$	nicht signifikant	n.s.
DMEM d1 vs DMEM d3	$p < 0,001$	sehr signifikant	***
DMEM d1 vs DMEM d4	$p < 0,001$	sehr signifikant	***
DMEM d2 vs DMEM d3	$p < 0,01$	signifikant	**
DMEM d2 vs DMEM d4	$p < 0,001$	sehr signifikant	***
DMEM d2 vs DMEM d5	$p < 0,01$	signifikant	**
DMEM d3 vs DMEM d7	$p < 0,001$	sehr signifikant	***
DMEM d4 vs DMEM d6	$p < 0,05$	nicht sehr signifikant	*
DMEM d4 vs DMEM d7	$p < 0,001$	sehr signifikant	***
DMEM d5 vs DMEM d6	$p > 0,05$	nicht signifikant	n.s.
DMEM d5 vs DMEM d7	$p < 0,001$	sehr signifikant	***
DMEM d6 vs DMEM d7	$p > 0,05$	nicht signifikant	n.s.

Tabelle 19 zu Abbildung 10

Datenübersicht zur Verteilung der immunpositiven Zellen bei co-kultivierten Nervenstücken:

Zellanzahl; Einheit: [Zellen/mm²]

Behandlung	Mittelwertwert ±SEM
CD 68 Panserin	329,24 ± 20,54
CD 68 DMEM	430,03 ± 35,81
CD 204 Panserin	344,51 ± 26,77
CD 204 DMEM	537,03 ± 48,43
Mac-1 Panserin	346,77 ± 20,26
Mac-1 DMEM	529,41 ± 44,02
F4/80 Panserin	430,48 ± 41,93
F4/80 DMEM	460,68 ± 45,33
Mac-3 Panserin	366,48 ± 41,40
Mac-3 DMEM	308,06 ± 54,77
CD 34 Panserin	288,11 ± 22,45
CD 34 DMEM	400,63 ± 30,95
CD 3 Panserin	79,99 ± 11,50
CD 3 DMEM	35,59 ± 8,00

Statistik	MWU-Test p-Wert	Signifikanz	Zeichen
CD 68 Panserin vs CD 68 DMEM	p = 0,0555	nicht sehr signifikant	*
CD 204 Panserin vs CD 204 DMEM	p = 0,0008	extrem signifikant	****
Mac-1 Panserin vs Mac-1 DMEM	p = 0,0017	sehr signifikant	***
F4/80 Panserin vs F4/80 DMEM	p = 0,5058	nicht signifikant	n.s.
Mac-3 Panserin vs Mac-3 DMEM	p = 0,3885	nicht signifikant	n.s.
CD 34 Panserin vs CD 34 DMEM	p = 0,0143	signifikant	**
CD 3 Panserin vs CD 3 DMEM	p = 0,0014	sehr signifikant	***
CD 3 Panserin vs CD 68 Panserin	p < 0,0001	extrem signifikant	****
CD 3 Panserin vs CD 204 Panserin	p < 0,0001	extrem signifikant	****
CD 3 Panserin vs Mac-1 Panserin	p < 0,0001	extrem signifikant	****
CD 3 Panserin vs F4/80 Panserin	p < 0,0001	extrem signifikant	****
CD 3 Panserin vs Mac-3 Panserin	p < 0,0001	extrem signifikant	****
CD 3 Panserin vs CD 34 Panserin	p < 0,0001	extrem signifikant	****
CD 3 DMEM vs CD 68 DMEM	p < 0,0001	extrem signifikant	****

CD 3 D MEM vs CD 204 D MEM	p < 0,0001	extrem signifikant	****
CD 3 D MEM vs Mac-1 D MEM	p < 0,0001	extrem signifikant	****
CD 3 D MEM vs F4/80 D MEM	p < 0,0001	extrem signifikant	****
CD 3 D MEM vs Mac-3 D MEM	p < 0,0001	extrem signifikant	****
CD 3 D MEM vs CD 34 D MEM	p < 0,0001	extrem signifikant	****

Tabelle 20 zu Abbildung 12

Datenübersicht zur Anzahl ORO-positiver Zelleinschlüsse:

Anzahl Zelleinschlüsse; Einheit: [Einschlüsse/mm²]

Behandlung	Mittelwertwert ±sd
Panserin	4245,82 ± 331,42
D MEM	3346,05 ± 76,94

Statistik	MWU-Test p-Wert	Signifikanz	Zeichen
Panserin vs D MEM	p = 0,0286	signifikant	**

Tabelle 21 zu Abbildung 13

Datenübersicht zu ORO-positiven Flächen pro Zelle:

Zellfläche; Einheit: [µm²/Zelle]

Behandlung	Mittelwertwert ±sd
Panserin	25,43 ± 2,95
D MEM	32,43 ± 5,49

Statistik	MWU-Test p-Wert	Signifikanz	Zeichen
Panserin vs D MEM	p < 0,0001	extrem signifikant	****

Literaturverzeichnis

- Allen L-AH, Aderem A (1996): Molecular definition of distinct cytoskeletal structures involved in complement- and Fc receptor-mediated phagocytosis in macrophages. *J.Exp.Med.* 184, 627-637
- Almad A, Sahinkaya FR, McTigue DM (2011): Oligodendrocyte fate after spinal cord injury. *Neurotherapeutics* 8, 262-273
- Bell MD, Lopez-Gonzalez R, Lawson L, Hughes D, Fraser I, Gordon S, Perry VH (1994): Upregulation of the macrophage scavenger receptor in response to different forms of injury in the CNS. *J.Neurocytol.* 23, 605-613
- 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
- Bollengier F, Espeel M, Matton A, Mahler A, Vanhaelst L (1995): Secretion of 23 kDa and glycosylated prolactin by rat pituitary cell culture in serum-free media: a comparative morphological, cyto- and immunochemical study. *Endocrine* 3, 61-68
- Bosse F (2012): Extrinsic cellular and molecular mediators of peripheral axonal regeneration. *Cell Tiss.Res.* 349, 5-14
- Bottenstein JE, Sato GH (1979): Growth of a rat neuroblastoma cell line in serum-free supplemented medium. *Neurobiology* 76, 514-517
- Bouwer AL, Netter P, Kemp RA, McLellan AD (2010): A defined serum-free medium useful for monitoring anti-melanoma responses induced by dendritic cell immunotherapy. *J.Immunol.Methods* 352, 178-181
- Brinkmann BG, Agarwal A, Sereda MW, Garratt AN, Müller T, Wende H, Stassart RM, Nawaz S, Humml C, Velanac V, Radyushkin K, Goebbels S, Fischer TM, Franklin RJ, Lai C, Ehrenreich H, Birchmeier C, Schwab MH, Nave KA (2008): Neuregulin-I/ErbB signaling serves distinct functions in myelination of the peripheral and central nervous system. *Neuron* 59, 581-595
- Brück W, Friede RL (1990): L-Fucosidase treatment blocks myelin phagocytosis by macrophages in vitro. *J.Neuroimmunol.* 27, 217-227
- Brück W, Brück Y, Maruschak B, Friede RL (1995): Mechanisms of macrophage recruitment in Wallerian degeneration. *A.Neuropathol.* 89, 363-367
- 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

-
- Brück W (1997): The role of macrophages in Wallerian Degeneration. *Brain Pathol.* 7, 741-752
- Brunner D, Frank J, Appl H, Schöffl H, Pfaller W, Gstraunthaler G (2010): Serum-free cell culture: the serum-free media interactive online database. *ALTEX* 27, 53-62
- Callizot N, Combes M, Steinschneider R, Poindron P (2011): A new long term in vitro model of myelination. *Exp.Cell Res.* 317, 2374-2383
- Campana WM (2007): Schwann cells: activated peripheral glia and their role in neuropathic pain. *Brain Behav.Immun.* 21, 522-527
- Casha S, Yu WR, Fehlings MG (2001): Oligodendroglial apoptosis occurs along degenerating axons and is associated with FAS and p75 expression following spinal cord injury in rat. *Neuroscience* 103, 203-218
- Cawston T (1998): Matrix metalloproteinases and TIMPS: properties and implications for the rheumatic diseases. *Mol.Med.Today* 4, 130-137
- Chaudhry V, Cornblath DR (1992): Wallerian Degeneration in human nerves: serial electrophysiological studies. *Muscle Nerve* 15, 687-693
- Chen MS, Huber AB, van der Haar ME, Frank M, Schnell L, Spillmann AA, Christ F, Schwab ME (2000): Nogo-A is a myelin-associated neurite outgrowth inhibitor and an antigen for monoclonal antibody IN-1. *Nature* 403, 434-439
- Cohn ZA (1978): The activation of mononuclear phagocytes: fact, fancy and future. *J.Immunol.* 121, 813-816
- Coleman DL (1986): Regulation of macrophage phagocytosis. *Eur.J.Clin.Microbiol.* 5, 1-5
- Coleman MP, Perry VH (2002): Axon pathology in neurological disease: a neglected therapeutic target. *Trends Neurosci.* 25, 532-537
- Copelman CA, Cuzner ML, Groome N, Diemel LT (2000): Temporal analysis of growth factor mRNA expression in myelinating rat brain aggregate cultures: increments in CNTF, FGF-2, IGF-I, and PDGF-AA mRNA are induced by antibody-mediated demyelination. *Glia* 30, 342-351
- Crowe MJ, Bresnahan JC, Shuman SL, Masters JN, Beattie MS (1997): Apoptosis and delayed degeneration after spinal cord injury in rats and monkeys. *Nat.Med.* 3, 73-76
- da Costa CC, van der Laan LJW, Dijkstra CD, Brück W (1997): The role of the mouse macrophage scavenger receptor in myelin phagocytosis. *Eur.J.Neurosci.* 9, 2650-2657
- Eichner RD, Smeaton TC (1983): Agar accumulates in peritoneal macrophages elicited with thioglycolate broth. *Scand.J.Immunol.* 18, 259-263
- Eske K, Breitbach K, Köhler J, Wongprompitak P, Steinmetz I (2009): Generation of murine bone marrow derived macrophages in a standardised serum-free cell culture system. *J.Immunol.Methods* 342, 13-19

-
- Fernandez-Valle C, Bunge RP, Bunge BM (1995): Schwann cells degrade myelin and proliferate in the absence of macrophages: evidence from in vitro studies of Wallerian degeneration. *J.Neurocytol.* 24, 667-679
- Flesch IE, Kaufmann SH (1999): Effect of fetal calf serum on cytokine release by bone marrow-derived macrophages during infection with intracellular bacteria. *Immunobiology* 200, 120-127
- Fraser I, Hughes D, Gordon S (1993): Divalent cation-independent macrophage adhesion inhibited by monoclonal antibody to murine scavenger receptor. *Nature* 364, 343-346
- Fry EJ, Ho C, David S (2007): A role for Nogo receptor in macrophage clearance from injured peripheral nerve. *Neuron* 53, 649-662
- Gaudet AD, Popovich PG, Ramer MS (2011): Wallerian Degeneration: Gaining perspective on inflammatory events after peripheral nerve injury. *J.Neuroinflamm.* 8, 110
- Ghabriel MN, Allt G (1979): The role of Schmidt-Lanterman incisures in Wallerian degeneration. II. An electron microscopic study. *Acta Neuropathol.* 48(2), 95-103
- Gitik M, Liraz-Zaltsman S, Oldenborg PA, Reichert F, Rotshenker S (2011): Myelin down-regulates myelin phagozytosis by microglia and macrophages through interactions between CD47 on myelin and SIRPalpha (signal regulatory protein-alpha) on phagocytes. *J.Neuroinflamm.* 8, 24
- Gladson CL (1999): The extracellular matrix of gliomas: modulation of cell function. *J.Neuropathol.Exp.Neurol.* 58, 1029-1040
- 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, 153-166
- Griffin JW, Hoffman PN: Degeneration and regeneration in the peripheral nervous system; Kap. 22; in: *Peripheral Neuropathy*; Hrsg. Dyck PJ and Thomas PK; 3. Aufl.; Saunders, Philadelphia 1993, 361-377.
- Griffin JW, Thompson WJ (2008): Biology and pathology of nonmyelinating Schwann cells. *Glia* 2008 56, 1518-1531
- Groh J, Weis J, Zieger H, Stanley ER, Heuer H, Martini R (2012): Colony-stimulating factor-1 mediates macrophage-related neural damage in a model for Charcot-Marie-Tooth disease type 1X. *Brain* 135, 88-104
- Gstraunthaler G (2003): Alternatives to the use of fetal bovine serum: serum-free cell culture. *ALTEX* 20, 275-281
- Hall S (2005): The response to injury in the peripheral nervous system. *J.Bone Joint Surg (Br)* 87, 1309-1319

-
- Hann-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.Neuropath.Exp.Neurol.* 48, 140-153
- Hirata K, Kawabuchi M (2002): Myelin phagocytosis by macrophages and nonmacrophages during Wallerian degeneration. *Microsc.Res.Techniq.* 57, 541-547
- Jänisch W, Schreiber D, Warzok R: Allgemeine Pathologie des peripheren Nervensystems. In: *Neuropathologie, Pathomorphologie und Pathogenese neurologischer Krankheiten*; 1. Aufl.; Gustav Fischer Verlag, Jena 1990
- Jessen KR, Mirsky R (2010): Control of Schwann cell myelination. *F1000 Biol.Rep.* 2:19, 1-4
- Kigerl AH, Gensel JC, Ankeny DP, Alexander JK, Donnelly DJ, Popovich PG (2009): Identification of two distinct macrophage subsets with divergent effects causing either neurotoxicity or regeneration in the injured mouse spinal cord. *J.Neurosci.* 29, 13435-13444
- Koopman R, Schaart G, Hesselink MKC (2001): Optimisation of oil red O staining permits combination with immunofluorescence and automated quantification of lipids. *Histochem.Cell Biol.* 116, 63-68
- Kuhlmann T, Brück W (1999): Immunoglobulins induce increased myelin debris clearance by mouse macrophages. *Neurosci.Lett.* 275, 191-194
- Kuhlmann T, Bitsch A, Stadelmann C, Siebert H, Brück W (2001): Macrophages are eliminated from the injured peripheral nerve via local apoptosis and circulation to regional lymph nodes and the spleen. *J.Neurosci.* 21, 3401-3408
- 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
- Laskin DL (2009): Macrophages and inflammatory mediators in chemical toxicity: a battle of forces. *Chem.Res.Toxicol.* 22, 1376-1385
- Leijh PCJ, van Zwet TL, ter Kuile MN, van Furth R (1984): Effect of thioglycolate on phagocytic and microbicidal activities of peritoneal macrophages. *Infect.Immun.* 46, 448-452
- Liefner M, Maruschak B, Brück W (1998): Concentration-dependent effects of pentoxifylline on migration and myelin phagocytosis by macrophages. *J.Neuroimmunol.* 89, 97-103
- Lindl T: *Zell-und Gewebekultur; Einführung in die Grundlagen sowie ausgewählte Methoden und Anwendungen*; 4.erw. Aufl.; Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin 2000
- Liu HM, Yang LH, Yang YJ (1995): Schwann cell properties: 3. C-fos expression, bFGF production, phagocytosis and proliferation during Wallerian degeneration. *J.Neuropath.Exp.Neurol.* 54, 487-496

-
- London CA, Abbas AK, Kelso A (1998): Helper T cell subsets: heterogeneity functions and development. *Vet.Immunol.Immunopathol.* 63, 37-44
- Loughlin AJ, Copelman CA, Hall A, Armer T, Young BC, Landon DN, Cuzner ML (1997): Myelination and remyelination of aggregate rat brain cell cultures enriched with macrophages. *J.Neurosci.Res.* 47, 384-392
- Lubinska L (1977): Early course of Wallerian Degeneration in myelinated fibres of the rat phrenic nerve. *Brain Res.* 130, 47-63
- Lüllmann-Rauch R: Histologie; 2. Aufl.; Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York 2006
- 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
- Luttges MW, Kelly PT, Gerren RA (1976): Degenerative changes in mouse sciatic nerves: electrophoretic and electrophysiologic characterizations. *Exp.Neurol.* 50, 706-733
- Martini R, Fischer S, López-Vales R, David S (2008): Interactions between Schwann cells and macrophages in injury and inherited demyelinating disease. *Glia* 56, 1566-1577
- Mäurer M, Müller M, Kobsar I, Leonhard C, Martini R, Kiefer R (2003): Origin of pathogenic macrophages and endoneurial fibroblast-like cells in an animal model of inherited neuropathy. *Mol.Cell.Neurosci.* 23, 351-359
- McKeon RJ, Schreiber RC, Rudge JS, Silver J (1991): Reduction of neurite outgrowth in a model of glial scarring following CNS injury is correlated with the expression of inhibitory molecules on reactive astrocytes. *J.Neurosci.* 11, 3398-3411
- Miledi R, Slater CR (1970): On the degeneration of rat neuromuscular junctions after nerve section. *J.Physiol.* 207, 507-528
- Moalem G, Xu K, Yu L (2004): T lymphocytes play a role in neuropathic pain following peripheral nerve injury in rats. *Neuroscience* 129, 767-777
- Montzka K, Führmann T, Wöltje M, Brook GA (2010): Expansion of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells: serum-reduced medium is better than conventional medium. *Cytotherapy* 12, 587-592
- Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL (1986): Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J.Immunol.* 136, 2348-2357
- Mosser DM, Edwards JP (2008): Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat.Rev.Immunol.* 8, 958-970
- Mumenthaler M, Stöhr M, Müller-Vahl H, Schliack H: Läsionen peripherer Nerven und radikuläre Syndrome; 9. erw. Aufl.; Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2007

-
- Needham LK, Tennekoon GI, McKhann GM (1987): Selective growth of rat Schwann cells in neuron- and serumfree primary culture. *J.Neurosci.* 7, 1-9
- Nikolaeva MA, Bukherjee B, Stys PK (2005): Na⁺-dependent sources of intra-axonal Ca²⁺ release in rat optic nerve during in vitro chemical ischemia. *J.Neurosci.* 25, 9960-9967
- Perkins NM, Tracey DJ (2000): Hyperalgesia due to nerve injury: role of neutrophils. *Neuroscience* 101, 745-757
- 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
- Pilling D, Fan T, Huang D, Kaul B, Gomer RH (2009): Identification of markers that distinguish monocyte-derived fibrocytes from monocytes, macrophages, and fibroblasts. *PLoS ONE* 4, e7475
- Raff MC, Whitmore AV, Finn JT (2002): Axonal self-destruction and neurodegeneration. *Science* 296, 868-871
- Rauch C, Feifel E, Schöffl H (2008): Alternatives to the use of fetal bovine serum: Platelet lysates as serum replacement in cell and tissue culture. *ALTEX* 25, 54-55
- Ray A, Dittel BN (2010): Isolation of mouse peritoneal cavity cells. *JOVE* 35, e1488
- 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
- Romijn HJ (1988): Development and advantages of serum-free, chemically defined nutrient media for culturing of nerve tissue. *Biol.Cell* 63, 263-268
- Rotshenker S (2011): Wallerian Degeneration: The innate-immune response to traumatic nerve injury. *J.Neuroinflamm.* 8, 109
- Saada A, Reichert F, Rotshenker S (1996): Granulocyte macrophage colony stimulating factor produced in lesioned peripheral nerves induces the up-regulation of cell surface expression of MAC-2 by macrophages and Schwann cells. *J.Cell.Biol.* 133, 159-167
- Scheidt P, Friede RL (1987): Myelin phagocytosis in Wallerian degeneration. Properties of millipore diffusion chambers and immunohistochemical identification of cell populations. *Acta Neuropathol.* 75, 77-84
- Shaw DR, Griffin FMjr (1982): Thioglycollate-elicited mouse peritoneal macrophages are less efficient than resident macrophages in antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. *J.Immunol.* 128, 433-440
- Shine HD, Readhead C, Popko B, Hood L, Sidman RL (1992): Morphometric analysis of normal, mutant, and transgenic CNS: correlation of myelin basic protein expression to myelinogenesis. *J.Neurochem.* 58, 342-349

-
- Siebert H, Sachse A, Kuziel WA, Maeda N, Brück W (2000): The chemokine receptor CCR2 is involved in macrophage recruitment to the injured peripheral nervous system. *J.Neuroimmunol.* 110, 177-185
- Siebert H, Engelke S, Maruschak B, Brück W (2001a): Concentration-dependent effects of the esterase inhibitor BNPP on macrophage migration and myelin phagocytosis. *Brain Res.* 916, 159-164
- Siebert H, Dippel N, Mäder M, Weber F, Brück W (2001b): Matrix metalloproteinase expression and inhibition after sciatic nerve axotomy. *J.Neuropath.Exp.Neurol.* 60, 85-93
- Smith KJ, Kapoor R, Hall SM, Davies M (2001): Electrically active axons degenerate when exposed to nitric oxide. *Ann.Neurol.* 49, 470-476
- 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, Hartung H-P (1992): The role of macrophages in degeneration and immune-mediated demyelination of the peripheral nervous system. *Adv.Neuroimmunol.* 2, 163-179
- Toews AD, Barrett C, Morell P (1998): Monocyte chemoattractant protein 1 is responsible for macrophage recruitment following injury to sciatic nerve. *J.Neurosci.Res.* 53, 260-267
- Tsao JW, George EB, Griffin JW (1999): Temperature modulation reveals three distinct stages of Wallerian Degeneration. *J.Neurosci.* 19, 4718-4726
- van Rossum D, Hilbert S, Straßenburg S, Hanisch U-K, Brück W (2008): Myelin-phagocytosing macrophages in isolated sciatic and optic nerves reveal a unique reactive phenotype. *Glia* 56, 271-283
- Vaughn JE, Pease DC (1970): Electron microscopic studies of wallerian degeneration in rat optic nerves.II. Astrocytes, oligodendrocytes and adventitial cells. *J.Comp.Neurol.* 140, 207-226
- 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 fibres. *Philos.T.Roy.Soc.B* 140, 423-429
- Wang MS, Davis AA, Culver DG, Wang Q, Powers JC, Glass JD (2004): Calpain inhibition protects against Taxol-induced sensory neuropathy. *Brain* 127, 671-679
- Xin J, Wainwright DA, Mesnard NA, Serpe CJ, Sanders VM, Jones KJ (2011): IL-10 within the CNS is necessary for CD4(+) T cells to mediate neuroprotection. *Brain Behav.Immun.* 25, 820-829
- Yong VW, Power C, Forsyth P, Edwards DE (2001): Metalloproteinases in biology and pathology of the nervous system. *Nat.Rev.Neurosci.* 2, 502-511

Zhai Q, Wang J, Kim A, Liu Q, Watts R, Hoopfer E, Mitchison T, Luo L, He Z (2003):
Involvement of the ubiquitin-proteasome system in the early stages of Wallerian
degeneration. *Neuron* 39, 217-225

Danksagung

Zunächst möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. med. Wolfgang Brück als Leiter des Instituts für Neuropathologie im Zentrum Pathologie für die Überlassung des Themas meiner Doktorarbeit bedanken. Ich habe während der Zeit meiner Dissertation viele Einblicke in das wissenschaftliche Arbeiten der Abteilung bekommen und habe mich während dieser drei Jahre sehr gut aufgehoben gefühlt.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. rer. nat. Heike Siebert, die mich als engagierte Betreuerin meiner Dissertation nicht nur inhaltlich unterstützt hat, sondern auch bei dem einen oder anderen Tiefpunkt menschlich wieder aufgebaut und motiviert hat. Eine bessere Zusammenarbeit hätte ich mir nicht wünschen können.

An dieser Stelle möchte ich Frau Brigitte Maruschak hervorheben, die mich in vielen Laborarbeiten verständnisvoll angeleitet hat und mir bei zahlreichen Fragen stets zur Seite stand.

Ebenfalls danke ich Frau Uta Scheidt für die tatkräftige und freundliche Unterstützung während meiner Laborarbeiten.

Auch möchte ich mich ganz herzlich bei Frau Doris Bode und Frau Margit Kollhof bedanken, die mir bei meinen Fragen rund um die Laborarbeit und die verschiedenen Färbemethoden stets zur Verfügung standen.

Für die Durchführung der FACS-Analyse und anschließende Besprechung der Ergebnisse bedanke ich mich ganz herzlich bei Herrn Dr. Stefan Nessler und Frau Martina Ott.

Ein weiterer Dank geht an Herrn Dr. Rolf, Leiter des Forschungslabors der ZMK-Chirurgie, bei dem die Zellzahl-Messungen mit dem Casy-System durchgeführt wurden.

Für die tatkräftige und freundliche Unterstützung möchte ich mich bei den Mitarbeitern/innen der Abteilung Neuropathologie recht herzlich bedanken. Ich habe meine Zeit als Doktorandin sehr genossen und wünsche dem Team der Neuropathologie alles Gute.

Zuletzt möchte ich mich auch ganz herzlich für die persönliche Unterstützung durch meine Familie und Freunde während meiner Zeit als Doktorandin bedanken.

Lebenslauf

Ich, Jana Aline Schulte, wurde am 01.01.1987, als Tochter von Dr. Walter Schulte und dessen Ehefrau Annette Schulte, geb. Schnitzmeier, in Recklinghausen geboren.

Dort besuchte ich von 1993 bis 1997 die Hohenzollern Grundschule.

Ab 1997 verbrachte ich neun Jahre am Gymnasium Petrinum in Recklinghausen, wobei ich von 2003 bis 2004 im Rahmen des Parlamentarischen-Partnerschafts-Programmes einen zehnmonatigen High School Aufenthalt in den USA/Louisiana absolvierte. 2006 verließ ich das Gymnasium Petrinum mit der Allgemeinen Hochschulreife.

Von 2006 bis 2007 leistete ich mein Freiwilliges Soziales Jahr im Bereich der Pflege im Prosper Hospital in Recklinghausen ab.

Schließlich nahm ich in 2007 mein Studium der Humanmedizin an der Georg-August-Universität in Göttingen auf.

Mein Praktisches Jahr werde ich zunächst in der Schweiz aufnehmen, wo ich mein erstes Tertial in der Chirurgie in Visp absolvierten werde. Für mein zweites Tertial werde ich in der Inneren Medizin an der Uniklinik in Basel tätig sein. Anschließend plane ich mein Praktisches Jahr mit dem dritten Tertial in der Neurologie im Knappschafts Krankenhaus in meiner Heimatstadt Recklinghausen zu beenden.

Das zweite Staatsexamen werde ich voraussichtlich an der Georg-August-Universität in Göttingen in 2014 ablegen.