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

**Die Rolle des Interleukin-6 bei der Wallerschen Degeneration
im peripheren Nervensystem der Maus**

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

vorgelegt von
Peggy Curter
aus Berlin

Göttingen 2009

Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel

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

II. Berichterstatter: PD Dr. med. Lingor

III. Berichterstatterin: Prof. Dr. rer. nat. Virsik-Köpp

Tag der mündlichen Prüfung: 06.12.2010

Abkürzungsverzeichnis

APAAP	Alkalische-Phosphatase-Antialkalische Phosphatase
AS	Aminosäure
BCDF	B-Zelldifferenzierungsfaktor
BHS	Blut-Hirn-Schranke – <i>blood-brain barrier (BBB)</i>
BSA	bovines Serumalbumin
BSF2	B-Zellstimulatorischer Faktor 2
CD4	<i>Cluster of differentiation</i> 4 – T-Zellmarker
CD8	<i>Cluster of differentiation</i> 8 – T-Zellmarker
CNTF	Ziliärer neurotropher Faktor
CR3	<i>complement receptor</i> 3 – Komplementrezeptor Typ 3
CSF	<i>colony stimulating factor</i> – Kolonie-stimulierender Faktor
CT-1	Cardiotrophin-1
DTH	<i>Delayed type hypersensitivity</i>
EAE	Experimentelle Autoimmune Enzephalitis
EC	<i>endothelial cells</i> – Endothelzellen
F4/80	Makrophagen-Antikörper
G-CSF	Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
GFAP	<i>glial fibrillary acid protein</i> – Gliales fibrilläres saures Protein
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
gp130	Glykoprotein 130
ICAM	Interzelluläres Adhäsionsmolekül
IFN	Interferon
IFN- γ	Interferon-gamma
IL	Interleukin
JAK	Janus-Kinase
kD	Kilodalton
LFA-1	Lymphozytenfunktionsprotein-1

LIF	Leukämie-Inhibitor-Faktor
LPS	Lipopolysaccharide
MAC-1	Makrophagenantigen 1
MAF	Makrophagen-Aktivierungsfaktor
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i> – mitogen-aktivierte Proteinkinase
MCP-1	Makrophagen-chemotaktisches Protein-1
M-CSF	Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
MHC II	<i>major histocompatibility complex II</i> – Hauptkomplex der Histokompatibilitätsantigene
MΦ	Makrophagen
NSE	Neuron-spezifische Enolase
OSM	Oncostatin M
OT	Objektträger
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> – Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PLA2	Phospholipase A2
PNS	Peripheres Nervensystem
POX	Pentoxifyllin
SHP-2	<i>src homology 2-containing tyroxine phosphatase</i>
STAT3	<i>signal transducer and activator of transcription 3</i>
TBS	<i>tris buffered saline</i> – TRIS-gepufferte Kochsalzlösung
TGF-β	<i>transforming growth factor</i> – transformierender Wachstumsfaktor Beta
TNF-α	Tumornekrosefaktor Alpha
WD	Wallersche Degeneration
WT	Wildtyp-Tiere
ZNS	Zentrales Nervensystem

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungsverzeichnis.....	III
1. Einleitung	1
1.1 Wallersche Degeneration.....	1
1.1.1 Definition.....	1
1.1.2 Ablauf der Wallerschen Degeneration im peripheren Nervensystem... ..	2
1.1.3 Die Makrophagen bei der Wallerschen Degeneration.....	2
1.2. Die Rolle der Zytokine	3
1.2.1 Definition.....	3
1.2.2 Die Familien der Zytokine.....	4
1.3. Die Rolle der Interleukine	4
1.3.1 Definition.....	4
1.3.2 Interleukin-6 und sein Rezeptor	5
1.3.3 Interleukin-6 im peripheren Nervensystem	7
1.3.4 Interleukin-6 im zentralen Nervensystem.....	8
1.4. Unterschiede zwischen peripherem und zentralem Nervensystem	9
1.5. Knockout-Mäuse und ihre Generierung	11
1.6. Ziel der Arbeit	13
2. Material und Methoden	14
2.1 Gewebeentnahme.....	14
2.2 Aufarbeitung für die Immunhistochemie	14
2.2.1 Immunhistochemisches Protokoll	15

2.3 Anfertigung der Semidünnschnitte	17
2.3.1 Dehydrieren der Proben	17
2.3.2 Einbettung	18
2.4 Morphometrie	18
2.5 Statistik	19
3. Ergebnisse	20
3.1 Wallersche Degeneration	20
3.2 Phagozytierende Makrophagen	20
3.3 Myelindichte	22
3.4 Ergebnisse der Immunhistochemie	26
4. Diskussion	30
4.1. Ergebnisse der experimentellen Untersuchung	30
4.2. Die Rolle der Makrophagen bei der Wallerschen Degeneration	30
4.3. Die Myelinolyse bei der Wallerschen Degeneration	32
4.4. Die Immunreaktion bei der Wallerschen Degeneration	33
4.5. Das Interleukin-6 bei der Wallerschen Degeneration	35
5. Zusammenfassung	38
6. Literaturverzeichnis	39

1. Einleitung

1.1 *Wallersche Degeneration*

1.1.1 Definition

August Volney Waller (1816-1870) – englischer Physiologe – beschrieb 1850 erstmals den physiologischen Prozess der Degeneration im peripheren Nervensystem. Er stellte fest, dass von ihrem Axon abgetrennte Ganglienzellen zu Grunde gehen. Unter Wallerscher Degeneration – auch sekundäre Degeneration genannt – versteht man komplexe physiologische und molekulare Vorgänge, die nach Beschädigung eines Nervis im peripheren Nervensystem (PNS) oder von Nervenfasern des zentralen Nervensystems (ZNS) ablaufen (Waller 1850).

Die Wallersche Degeneration beschreibt die Vorgänge, die nach der Durchtrennung einer Nervenfaser im distalen Abschnitt am Achsenzylinder und an der Markscheide auftreten. Der Achsenzylinder zeigt nach der Schwellung eine Fragmentierung und granulären Zerfall (David 1990). Die Markscheiden lassen Veränderungen in Form von Markballen erkennen, die sich mit Chrom-Osmiumsäure anschwärzen lassen (Marchi-Methode). Die Neurolemmzellen wandeln sich zu Phagozyten um und nehmen Axon- und Myelinfragmente auf. Schon während dieser degenerativen Vorgänge teilen sich die Neurolemmzellen mitotisch und bilden die Hanken-Büngner-Bänder. Sie dienen den zentrifugal regenerierenden Axonen als Leitstruktur. Von entscheidender Bedeutung bei der Regeneration ist der Erhalt der bindegewebigen Hüllen der Nervenfaszikel (Perineurium). Wird das Perineurium zerstört, wachsen axonale Regenerate in das Epineurium aus und können, zusammen mit überschießender Bindegewebs- und Schwann-Zell-Proliferation, zu einem traumatischen Neurom („Amputationsneurom“) führen (Böcker 2001).

1.1.2 Ablauf der Wallerschen Degeneration im peripheren Nervensystem

Die zellulären Ereignisse nach Beschädigung eines Nervs gliedern sich zeitlich in fünf Abschnitte oder Phasen (Brück 1997, S. 743):

1. Die Diskonnektion der Axone ist beispielsweise durch traumatische, toxische, degenerative, ischämische oder metabolische Beeinträchtigung ausgelöst worden.
2. Innerhalb der ersten 24 Stunden nach der Läsion finden die kalziumabhängige axonale Degeneration mit granulärem Zerfall des Zytoskeletts, eine Abnahme bzw. ein Verlust der Aktionspotentiale, der Rückzug von Schwann-Zell-Zytoplasma von den Myelinscheiden, die Herunterregulation der Myelin-mRNA-Synthese der Schwann-Zellen sowie die Bildung von Myelinovoiden statt.
3. Zwischen dem ersten und vierten Tag (24h–96h) erfolgt eine ausgeprägte Schwann-Zell-Proliferation und die Rekrutierung von hämatogenen Phagozyten. Danach findet die Opsonierung von degeneriertem Myelin durch aktiviertes Komplement statt, jedoch ohne Bildung von Komplement-Angriffs-Komplex (MAC).
4. Zwischen dem dritten und achten Tag erfolgt die Phagozytose von degeneriertem Myelin durch eingewanderte hämatogene oder ortsansässige Makrophagen und Schwann-Zellen.
5. Nach zehn bis zwanzig und mehr Tagen erfolgen die Bildung von Hanken-Büngner-Bändern und die Regeneration der Nervenfasern.

1.1.3 Die Makrophagen bei der Wallerschen Degeneration

Makrophagen sind langlebige, aus Blutmonozyten hervorgehende, bewegliche Zellen des monozytären Systems, die zusammen mit Gewebsmakrophagen das mononukleäre Phagozytensystem bilden. Die Makrophagen haben eine Schlüsselfunktion bei der angeborenen Immunantwort. Sie stimulieren beispielsweise die Produktion von Interleukinen, Enzymen und Wachstumsfaktoren. Die Rezeptoren an ihrer Oberfläche

vermitteln der Zelle ihren Aktivitätszustand, ihre Differenzierung, die Phagozytose und andere Funktionen. Durch Phagozytose eliminieren die Makrophagen Zelltrümmer im Allgemeinen und speziell im Nerven Myelinabbauprodukte. Sie wirken in vier Phasen: Invasion, Phagozytose, Sekretion und Regeneration (Brück 1997, S. 745).

Während der Invasion erfolgt die Expression von Adhäsionsmolekülen (z. B. LFA-1 „lymphocyte function antigen“) und zwar in einer Interaktion mit Endothelzellen, die Adhäsionsmoleküle wie ICAM-1 („intercellular adhesion molecule“) exprimieren. Ausgehend von degenerierten, axonalen und Myelin-Strukturen oder auch vom Serum-Komplement entstehen chemotaktische Stimuli.

Danach folgt die rezeptorvermittelte Phagozytose von opsoniertem Myelin durch Makrophagen über den Komplementrezeptor 3 (CR3) sowie die Beteiligung an der Opsonierung durch die Synthese von Komplement-Komponenten, dies allerdings ohne Beteiligung von Makrophagen-Fc-Rezeptor (Brück 1997, S. 745).

Während der Invasion und Phagozytose sezernieren die Makrophagen u. a. Interleukin-6 (IL-6), Phospholipase A, Apolipoprotein E, Lysozym sowie den Tumornekrosefaktor- α (TNF- α). Daran schließt sich die Regeneration aufgrund der Expression von Wachstumsfaktoren an (Brück 1997, S. 745).

1.2. Die Rolle der Zytokine

1.2.1 Definition

Als Zytokine werden induzierbare, wasserlösliche heterogene Proteinmediatoren mit einem Molekulargewicht von mehr als 5000 Dalton definiert, die in Zielzellen oder den sie produzierenden Zellen spezifische, via Rezeptoren vermittelte Wirkungen auslösen (Keller 1994). Sie können von verschiedenen Zelltypen freigesetzt werden. Durch Makrophagen produzierte Zytokine können zur unspezifischen Immunität beitragen. Im Verlauf der spezifischen Immunreaktion können Zytokine von T-Zellen sezerniert werden und Wachstum, Differenzierung und funktionelle Aktivität der Lymphozyten regulieren. Um das Wirkungsspektrum eines Zytokins zu bestimmen, ist es nötig, die

Wirksamkeit spezifischer neutralisierender Anti-Zytokin-Antikörper auf die durch das rekombinante Zytokin ausgelösten Effekte zu prüfen. Ebenso können Versuche mit knockout-Tieren, denen bestimmte Zytokingene fehlen, wertvolle Hinweise liefern (Keller 1994).

1.2.2 Die Familien der Zytokine

Im Wesentlichen unterscheidet man fünf Gruppen von Zytokinen: die Interferone (IFN), die Interleukine (IL), Kolonie-stimulierende Faktoren (CSF), Tumornekrosefaktoren (TNF) sowie Chemokine (Roitt et al. 1995, Rook 1988).

Interferone sind Glykoproteine, deren Synthese durch doppelsträngige RNA induziert wird. Sie haben eine virusunspezifische, antivirale Aktivität und wirken antiproliferativ und immunmodulierend. Sie kommen in drei Formen vor: als IFN- α , IFN- β und IFN- γ . Bei den CSF handelt es sich um Wachstumsfaktoren der Erythrozyten und Leukozyten. Ein besonderer Wachstumsfaktor der Leukozyten ist der Granulozyten-Kolonie-stimulierende Faktor (G-CSF).

Der Tumornekrosefaktor ist ein potenter, parakriner und endokriner Mediator von Entzündungen und Immunantworten. Seine Bildung in Monozyten und Makrophagen wird besonders durch Lipopolysaccharide (LPS) ausgelöst. TNF stimuliert u. a. die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse und in Makrophagen die Phagozytose. Außerdem wirkt TNF auf neutrophile Granulozyten migrationsfördernd. Viele seiner Wirkungen geschehen in Kombination mit anderen Zytokinen (Doenecke et al. 2005).

1.3. Die Rolle der Interleukine

1.3.1 Definition

Interleukine (IL) sind als Mediatorsubstanzen verantwortlich für die Induktion und den Verlauf der T-Zell-vermittelten zytotoxischen Immunreaktion sowie der B-Zell-Aktivierung. Die von verschiedenen Zellen sezernierten Glykoproteine beeinflussen die

funktionelle Aktivität der sie sezernierenden Zelle (autokriner Effekt) und die benachbarter Zellen (parakriner Effekt). Die mittlerweile mehr als 30 verschiedenen identifizierten Interleukine können von Makrophagen, Endothelzellen, Mastzellen, B-Lymphozyten, T-Lymphozyten und/oder Monozyten gebildet werden (Staines et al. 1994).

1.3.2 Interleukin-6 und sein Rezeptor

Interleukin-6, früher auch als Interferon- β 2 (IFN- β 2), Hepatozytenstimulierungsfaktor, zytotoxischer T-Zelldifferenzierungsfaktor, B-Zelldifferenzierungsfaktor (BCDF) oder B-Zell-stimulierender Faktor-2 (BSF2) bezeichnet, regelt als pleiotropes Zytokin zahlreiche Immunreaktionen des Organismus. Es wirkt pro- und antiinflammatorisch, als Modulator für Knochenresorption, als Promotor für die Hämatopoese und „Inducer“ der Plasmazellentwicklung (Naka et al. 2002).

Zur IL-6-Familie gehören Zytokine mit einer α -helikalen Struktur. Dies schließt den Leukämie-Inhibitor-Faktor (LIF), Oncostatin M (OSM), den Ziliären neurotrophischen Faktor (CNTF), Cardiotrophin-1 (CT-1) und IL-11 ein (Taga und Kishimoto 1997).

IL-6 wird von vielen verschiedenen Zellen ausgeschüttet: CD8+-T-Zellen, Fibroblasten, Synovialiszellen, Adipozyten, Osteoblasten, Megakaryozyten, Endothelzellen, sympathische Neurone, zerebrale Kortexneurone, chromaffine Zellen der adrenalen Medulla, Retinapigmentzellen, Mastzellen, Keratinozyten, Langerhans-Zellen, fetale und adulte Astrozyten, Neutrophile, Monozyten, Eosinophile, Colonepithelzellen, B1- und B-Zellen (Kishimoto et al. 1995).

Zirkulierendes IL-6 kann im Blut von normalen weiblichen Individuen in einer Höhe von 1 pg/ml, mit leichter Erhöhung während des Menstruationszyklus, gefunden werden. In geringer Höhe (10 pg/ml) kommt es bei bestimmten Krebsarten vor (z. B. Melanom) und in großer Höhe nach Operationen (30–430 pg/ml).

Der funktionelle Rezeptor für IL-6 ist ein Komplex von zwei transmembranösen Glykoproteinen: dem 80 kD schweren IL-6-Rezeptor (IL-6R), der der spezifischen Erkennung von IL-6 dient, und dem 130 kD schweren Glykoprotein (gp130), das für die Signaltransduktion zuständig ist (vgl. Abb. 1). Beide sind Mitglieder der Klasse 1 der Zytokinrezeptorsuperfamilie, die durch ihre extrazelluläre Region zweier angrenzender

Fibronectin-I-III-Domänen definiert sind. Dazu gehören auch die Rezeptoren für den Leukämie-Inhibitor-Faktor (LIF R), den Ziliären neurotrophen Faktor (CNTF R α), für Oncostatin M (OSM R β), Interleukin-11 (IL-11 R α) sowie für Cardiotrophin-1 (CT-1R α).

Abb. 1: IL-6 und sein Rezeptor (Graphik: J. Hülpiusch)

Der menschliche gp130-Rezeptor ist 896 AS lang, mit einer 597 AS extrazellulären Region, einer 22 AS transmembranösen Domäne und einem 277 AS zytoplasmatischen Segment. Von ihm werden zwei Signalwege (siehe unten) aktiviert, einschließlich der JAK/STAT-, RAS/RAF- und Src-Familie von Kinasen.

Obwohl die IL-6-Bindung mit gp130 beschrieben wurde, ist allgemein berichtet worden, dass der 80-kD-IL-6R das eigentliche IL-6-Bindungsprotein ist.

Im Blut von normalen Individuen existiert lösliches gp130 in einer Konzentration von annähernd 400 ng/ml. Die Präsenz der transmembranösen Region von gp130 ist notwendig für das volle IL-6-Signal. Lösliches gp130 bindet nicht an den löslichen IL-6-Rezeptor, es sei denn IL-6 ist anwesend (www.rndsystems.com, 2002).

Die lösliche 55-kD-Form des IL-6R entsteht über zwei proteolytische Prozesse und alternatives „Splicen“. In gesunden Individuen betragen die Blutspiegel von löslichem IL-6 und löslichen Rezeptoren eine Größenordnung von 75–80 ng/ml. Lösliche IL-6-Rezeptoren binden zirkulatorisch IL-6 und verlängern seine Halbwertszeit, und auf der Oberfläche der Zelle wird gp130 ausgeschüttet (www.rndsystems.com, 2002).

Die Signaltransduktion erfolgt über zwei Wege: 1. Die Phosphorylierung der Janus-Kinase (JAK2) führt zur Phosphorylierung und zugleich zur Dimerisierung des „signal

transducer and activator of transcription 3“ (STAT3). STAT3 transloziert in den Zellkern und aktiviert dort die Zielgene. 2. Phosphorylierte JAK2 aktiviert über die „Src homology 2-containing tyrosine phosphatase“ (SHP-2) den Ras/Raf-Weg, der die „mitogen-activated protein kinase“ (MAPK) reguliert (Heinrich et al. 2003). Auf diese Weise wird die Transkription in den Zielgenen ermöglicht (vgl. Abb. 2).

Bekannte Zellen, die IL-6R exprimieren, sind einschließlich CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen Hepatozyten, CD34⁺-Stammzellen, Neurone, Neutrophile, Monozyten und Osteoblasten. Das gp130 ist auf fast allen Zellen des menschlichen Körpers vorhanden.

Abb. 2: Die molekularen Mechanismen des IL-6 und seines Rezeptors (www.biocarta.com)

1.3.3 Interleukin-6 im peripheren Nervensystem

Das IL-6-Protein wird von Schwann-Zellen, Fibroblasten und Makrophagen exprimiert (Bolin et al. 1995; Reichert et al. 1996).

Das Interleukin-6 spielt eine Rolle während der lokalen Entzündung und fördert die Nervenreparatur. In einigen Geweben ist die Ausschüttung von gp130 durch IL-6 potent hochreguliert. Der Anstieg von gp130 in geschädigten Nerven könnte durch IL-6 induziert sein (Ito et al. 1998).

In den ersten 12 h nach Quetschung des N. ischiadicus ist die IL-6-Expression initial induziert. Die mRNA-Ausschüttung war distal der Quetschungsverletzung am höchsten. Im normalen erwachsenen N. ischiadicus gibt es keine IL-6-Expression (Bolin et al. 1995). Dagegen exprimieren immortale Schwann-Zellen (iSC) den IL-6-Rezeptor und gp130. Im peripheren Nervensystem (PNS) wird IL-6 durch Schwann-Zellen produziert; sowohl in vitro als auch in vivo nach Nervenverletzung (Bolin et al. 1995). In Ratten-Schwann-Zellen erreichte die mRNA für IL-6 zwölf Stunden nach Verletzung ihre höchsten Spiegel. Bereits nach 24 h war die Ausschüttung wieder gravierend gesunken (Bourde et al. 1996).

1.3.4 Interleukin-6 im zentralen Nervensystem

Im zentralen Nervensystem (ZNS) wird IL-6 durch Astrozyten und Mikroglia sezerniert, die örtlich begrenzt entzündliche Antworten im Gehirn auslösen. IL-6 ist zum Triggern für entgegen gesetzte Aktionen auf Neuronen verantwortlich: entweder für das neuronale Überleben nach Verletzung oder für neuronale Degeneration (Muñoz-Fernández et al. 1998). Lau und Yu (2001) fanden in Astrozyten-Kulturen IL-6 mit TNF- α , IL-1 α und IFN- γ hochreguliert, während Sawada et al. (1992) in Kultur Astrozyten und Mikroglia untersuchten und fanden, dass beide nach LPS-Stimulation IL-6 produzierten. Die Mikroglia antwortete schneller auf LPS als auf Astrozyten. LPS konnte meistens IL-6 in Astrozyten wirkungsvoll induzieren. IL-1 und TNF- α waren niedriger in Astrozyten, und IL-6 nicht induziert in Mikroglia (Sawada et al 1992).

Hauptorte der IL-6-Synthese sind Neuronen und Gliazellen (Gadient und Otten 1997). GM-CSF induziert die IL-6-Produktion durch Mikroglia, aber nicht durch Astrozyten. Kein anderes CSF stimulierte IL-6 auf Mikroglia. GM-CSF hemmt die IFN- γ -induzierte Ausschüttung von MHC II auf Mikroglia (Suzumura et al. 1996). Nach Verletzung des Striatums oder einer LPS-Injektion nach Verletzung erfolgte eine gesteigerte Ausschüttung von IL-1 β , IL-6 und IL-6R (Yan et al. 1992). Nach neuesten Erkenntnissen löst die WD beim N. opticus der Maus eine Transkription von TGF- β 1 und TNF- α aus, aber keine der proinflammatorischen Zytokine IL-1 β und IL-6. Es erfolgt auch keine Aktivierung der Mikroglia (Palin et al. 2008).

1.4. Unterschiede zwischen peripherem und zentralem Nervensystem

Die Nervenfasern werden im ZNS durch Glia zu Bahnen, im PNS durch Bindegewebe zu Nerven verbunden. In präpariertem Zustand ist die Markscheide einer Nervenfaser stark lichtbrechend. Sie enthält Lipide, vor allem Phosphatide und Cholesterin. Das Axon zieht sich durch die ganze Nervenfaser. Im PNS wird es von speziellen Gliazellen, den Schwann-Zellen umschichtet. Die Axonscheide eines Segmentes wird von einer einzigen Schwann-Zelle gebildet. Sie gliedert sich in die Markscheide (Myelinscheide) und einen äußeren zytoplasmareichen Mantel, Neurolemm genannt. Er enthält den Kern der Schwann-Zelle sowie Zellorganellen. Der Schwannzell-Kern liegt in der Mitte zwischen zwei Schnürringen, ist längsoval, flach, groß und blass.

Der Vorgang der Myelogenese (Markscheidenbildung, Markreifung) erklärt den Bau der Axonscheide. Die markscheidenführenden zentralen Nervenfasern unterscheiden sich von den peripheren durch das Fehlen des Neurolemms und der Schwannzell-Kerne. In zentralen Fasern sind die Ranvier-Schnürringe schwer zu diagnostizieren, da sie aus flacheren und gedehnteren „Einschnürungen“ der Myelinscheide bestehen als bei peripheren Fasern.

Markscheidenführende zentrale Nervenfasern sind grundsätzlich wie die markscheidenführenden peripheren Nervenfasern gebaut, doch ist bei der zentralen Nervenfaser der Extrazellulärraum des Schnürrings Teil des allgemeinen Extrazellulärspaces. Eine zusätzliche gliöse Abdeckung wie an den Schnürringen der peripheren Nervenfasern ist nicht ausgebildet.

Die Markscheiden im ZNS werden von Oligodendrozyten gebildet. Ein Oligodendrozyt sendet mehrere Fortsätze aus und kann mit diesen an unterschiedlichen Axonen jeweils die Markscheide eines Internodiums bilden. Den zentralen markscheidenführenden Nervenfasern liegen, im Unterschied zu den peripheren, selten Zellkerne der Gliazellen an. Schmidt-Lantermann-Einkerbungen und Basallamina fehlen (Leonhardt 1990).

Die Durchtrennung von Nervenfasern hat im PNS eine relativ schnelle Regeneration zur Folge, die im ZNS ausbleibt. Nach Nervendurchtrennung zerfällt der distal gelegene Abschnitt und hinterlässt Markscheidenbestandteile, die das Wachstum aus dem proximalen Stumpf hemmen. Diese Reste werden im PNS von aus dem Blut einwandernden Makrophagen schnell abgeräumt, während die Makrophagen-

rekrutierung im ZNS mit erheblicher Verzögerung einsetzt. Das molekulare Milieu des degenerierenden distalen Nervenabschnitts scheint die für eine erfolgreiche Regeneration wichtige Makrophagenaktivierung nachhaltig zu beeinflussen. Makrophagen werden durch Zytokine entweder aktiviert oder gehemmt (Stoll et al. 1999).

In den distalen Nervenabschnitten durchtrennter peripherer Nerven fand man eine erhöhte Expression von Zytokinen mit unterschiedlicher zeitlicher Dynamik. IL-1 β fördert die Synthese von Nervenwachstumsfaktoren in Schwann-Zellen und damit die Regeneration sensibler Fasern (Stoll und Jander 1999).

Zusätzlich wurden IL-6 und IL-10 in der Frühphase nach einer Nervenläsion von Schwann-Zellen exprimiert. Mäuse, denen das IL-6-Gen fehlte, zeigten sensorische Defizite und eine deutliche Beeinträchtigung der Regeneration sensibler Nervenfasern, während die motorischen Nervenfasern davon nicht betroffen waren (Stoll et al. 2002).

Brett et al. (1995) generierten transgene Mäuse mit übermäßiger Expression von IL-6 unter Kontrolle des GFAP-Promotors: der erhöhte IL-6-Spiegel beeinflusst die Entwicklung und physiologische Funktion der Blut-Hirn-Schranke (BHS), da bei diesen transgenen Mäusen die BHS nicht entwickelt ist. Bei dieser erhöhten Expression zeigten die Tiere nach sechs Monaten parenchymale Entzündung, Gliose, spongiforme Veränderungen, axonale Degeneration und die Anhäufung von Makrophagen.

Campbell et al. (1993) konnten zeigen, dass eine Überexpression von IL-6 in Mäusen eine spontane EAE hervorruft.

1.5. Knockout-Mäuse und ihre Generierung

Eine knockout-Maus ist eine Maus, bei der mittels genetischer Manipulation gezielt ein oder mehrere Gene deaktiviert wurden. Die Veränderung geschieht an den embryonalen Stammzellen von Mäusen, die dann in die Keimbahn einer Maus eingebracht werden. Mit Hilfe dieser genetisch veränderten Tiere können biologische Mechanismen untersucht werden. Sie eignen sich als Modelle für menschliche Erkrankungen (Alberts et al. 1999).

Das Ziel von knockout-Methoden ist, das spezifische Gen von Interesse zu inaktivieren (knock out – außer Gefecht setzen), zu verändern. Das Fehlen eines Gens in einer knockout-Maus kann die Funktion der davon betroffenen Proteine erklären.

Aus Blastozysten eines Inzuchtmäusestammes werden embryonale Stammzellen entnommen und in vitro vermehrt. Durch verschiedene Verfahren (z. B. Elektroporation oder Mikroinjektion) wird ein Inaktivierungsvektor, der aus dem zu inaktivierenden Gen, das eine Mutation trägt, besteht, in die noch undifferenzierten Stammzellen übertragen. Dadurch kann das Gen von Interesse nicht mehr transkribiert werden. Der Austausch zwischen den DNA-Abschnitten erfolgt durch homologe Rekombination. Dabei lagern sich die benachbarten Abschnitte des Gens auf dem Vektor an die gleiche Stelle im Maus-Genom an und können rekombiniert werden. Um den Einbau an der richtigen Stelle im Maus-Genom zu testen, werden bestimmte Marker eingesetzt, z. B. eine sogenannte Neomycin-Kassette oder das Gen für die Thymidinkinase (HSV-tk) des Herpes-simplex-Virus (HSV) verwendet (vgl. Abb. 3).

Abb. 3: Schematische Darstellung des Knockouts bei IL-6 (Grafik: J. Hülpiusch)

Durch die Einschleusung der neo- und HSV-tk-Kassette in Exon 2 des IL-6-Gens wird dieses funktional unterbrochen.

Die rekombinierten Stammzellen werden in eine Blastozyste eingesetzt, die dann einer vorbehandelten Empfänger-Maus eingepflanzt wird. Bei den entstehenden Nachkommen wird zunächst getestet, ob das manipulierte Gen eingebaut bzw. ausgeschaltet wurde. Diese Nachkommen sind die sogenannten Gründertiere („Founder“-Mäuse), die mit normalen Tieren verpaart werden. Durch Kreuzung mit Mäusen eines normalen Stammes entstehen heterozygote Tiere und durch weitere Rückkreuzung erhält man homozygote Tiere, bei denen das gewünschte Gen inaktiviert ist (Doenecke et al. 2005). Für die vorliegende Arbeit wurden knockout-Mäuse verwendet, bei denen das Gen für Interleukin-6 inaktiviert war.

1.6. Ziel der Arbeit

Mit der hier vorgestellten Arbeit soll an einem Modell für Axotomien im peripheren Nervensystem die Auswirkung des Fehlens von IL-6 untersucht werden. Insbesondere soll auf die Menge rekrutierter Makrophagen, die in das distal degenerierende Nervenstück einwandern, und auf die Expression typischer Oberflächenmarker geachtet werden. Die Untersuchungen wurden mit immunhistochemischen und mikroskopischen Methoden an verschiedenen Probenmaterialien durchtrennter Ischiasnerven durchgeführt.

Benutzt wurden IL-6-knockout-Mäuse (Kopf et al. 1994), die freundlicherweise von Hoffmann-La Roche (heute Novartis) Basel, Arbeitsgruppe H. Bluethmann zur Verfügung gestellt wurden. Als Kontrolle dienten normale Mäuse vom Stamm C57BL/6.

2. Material und Methoden

2.1 Gewebeentnahme

Als Versuchstiere wurden IL-6-knockout-Mäuse von Hoffmann-La Roche Basel, Arbeitsgruppe H. Bluethmann, gekreuzt auf C57BL/6-Hintergrund und C57BL/6 (B6-Wildtyp)-Mäuse, bezogen von Harlan Winkelmann und gezüchtet in der Zentralen Tierexperimentellen Einheit der Universität Göttingen, verwendet.

Zunächst wurde bei den Mäusen im Alter von 8–10 Wochen operativ eine Axotomie des Ischiasnervs durchgeführt. Die Anästhesie erfolgte mit einem Gemisch aus Ketanest (Parke-Davis) und Rompun (Xylazin, Bayer) im Verhältnis 2:1. Die Dosierung betrug 12 mg Ketanest und 6 mg Rompun pro 100g Lebendgewicht und wurde intraperitoneal injiziert. Danach wurde der rechte N. ischiadicus freigelegt, in Höhe des Femurs durchtrennt und die Muskel- und Hautschicht mit einigen Nähten wieder verschlossen. Nach ca. 30–60 Minuten konnten sich die Tiere frei bewegen.

Die zweite Operation erfolgte zur Entnahme der Nerven nach 4 und nach 6 Tagen. Dazu wurden die Mäuse mit 14%igem Chloralhydrat getötet, dekapitiert und etwa 0,7 cm lange Stücke aus dem distalen Teil des N. ischiadicus entnommen.

Anschließend wurden sie für die Immunhistochemie und für die Lichtmikroskopie unterschiedlich aufgearbeitet.

Jede Versuchsgruppe bestand aus 5 knockout-Tieren und 5 Wildtypen (WT), jeweils an Tag 4 und 6 nach Axotomie.

2.2 Aufarbeitung für die Immunhistochemie

Die frischen Nervenstücke wurden sofort in Tissue Tek (OCT-Compound; Sakura Finetek, Holland) eingebettet und in stickstoffgekühltem Isopentan auf Korkplatten 12 Sekunden schockgefroren. Anschließend wurden die Proben luftdicht verschlossen und bei –80 °C bis zum Schneiden aufbewahrt. Mit einem Gefriermikrotom („Frigocut 2800“ von Reichert & Jung) wurden 5–6 µm dicke Schnitte der Nerven angefertigt und

auf "Superfrost"-Objektträger (Menzel-Gläser, Braunschweig) aufgezogen. Nach mindestens 3 Stunden wurden die getrockneten Schnitte in eiskaltem Aceton für 10 Minuten fixiert.

Der Antigennachweis an den Gefrierschnitten wurde mit der indirekten 3-Schritt-APAAP-Methode durchgeführt. Bei dieser Technik bindet als erstes ein Primärantikörper (F4/80, LFA-1, MAC-1) an sein Antigen. Anschließend wird ein zweiter Antikörper (Brückenantikörper), der gegen das Fc-Fragment des Primärantikörpers (jetzt als Antigen zu betrachten) gerichtet ist, aufgetragen.

Da alle Primärantikörper aus der Ratte stammen, muss der Sekundär- oder Brücken-Antikörper gegen Ratte gerichtet sein.

Das Hinzufügen eines dritten Antikörpers ist Grundlage für die Signalentwicklung und dient der weiteren Signalverstärkung, da mehrere Antikörper an das zuerst gebundene sekundäre Reagenz binden können. Das bringt mehr Enzymmoleküle zum Gewebsantigen und bewirkt daher eine stärkere Farbintensität.

Der APAAP-Komplex besteht aus zwei Molekülen alkalischer Phosphatase, die an einen monoklonalen Ratte-anti-alkalische-Phosphatase-Antikörper gekoppelt sind. Die Unterdrückung endogener alkalischer Phosphataseaktivität wird durch Zugabe von Levamisol zur Substratlösung erzielt.

Alle Inkubationen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Als letzter Schritt erfolgte die Zugabe des Chromogens Neufuchsin zur Darstellung des APAAP-Komplexes, wodurch eine rote Farbreaktion entsteht (Naish 1989).

2.2.1 Immunhistochemisches Protokoll

1. Die 5 µm dicken Nervenschnitte werden 10–20 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet und in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gespült.
2. Dann wird einer der drei Primärantikörper MAC-1, F4/80, LFA-1 aufgetragen (alle drei sind monoklonale Ratte-anti-Maus-Antikörper, bezogen von Biozol, München) oder ein anti-IL-6 Antikörper (1:400, von R&D Systems) im Verhältnis 1:25 verdünnt in 0,1 M mit PBS und 2%igem bovinem Serumalbumin und 10%igem Kaninchenserum verdünnt auf die Objektträger gebracht. Inkubiert wird 1–2 h in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur.

3. Es folgt das mehrfache Spülen mit PBS 0,1 M unter Beachtung der Trennung der unterschiedlichen Antikörper voneinander.
4. Der Brückenantikörper (Kaninchen-anti-Ratte, DAKO Z 0494 für Mausgewebe) wird im Verhältnis 1:250 (in 0,1 M PBS) auf die Objektträger gebracht. Die Inkubationszeit beträgt 45 min. (30 min.–1h).
5. Mehrfaches Spülen in 0,1 M PBS.
6. Der APAAP-Komplex (rat-APAAP, DAKO D 488) wird im Verhältnis 1:25 angesetzt und in PBS mit 0,1%iger BSA-Lösung und 10%igem Kaninchenserum auf die Objektträger gebracht. Die Inkubationszeit beträgt 45 min. (30–60 min.).
7. Gespült wird in diesem Schritt nur einmal mit PBS und dann dreimal mit TBS.
8. Die Schnitte werden mit der chromogenen Lösung Neufuchsin entwickelt.

Anfertigung der Chromogen-Lösung:

Lösung 1: 50 ml Tris-Puffer pH 8,8, 12,5 ml Propandiol, 20 mg Levamisol (Sigma L-9756)

Lösung 2: 10 mg Natriumnitrit, 250 µl Aqua bidest, 100 µl Neufuchsin (Aldrich 22931-8)

Lösung 3: 14 mg Naphtol-AS Bi-Phosphate (Sigma N-2125) in 300 µl N, N-Dimethylformamid

Zuerst wird die *Lösung 2* in *Lösung 1* gegeben und dann *Lösung 3* zugefügt, danach wird die Mischung filtriert. Die Inkubationszeit ist unterschiedlich und abhängig von der gewünschten Farbtintensität. Normalerweise beträgt sie ca. 20 min., maximal 30 min. auf dem Schüttler.

9. Spülen der Objektträger mit „aqua demin“
10. Es erfolgt die Gegenfärbung mit Mayer's Hämalaun (Merck, Darmstadt) für 30 sek., nur bei anti-IL-6.
11. Letztmaliges Spülen der Objektträger mit Wasser und Eindecken mit „Gurr-aquamount“ (BDH Laboratory).

2.3 Anfertigung der Semidünnschnitte

Für die Weiterverarbeitung zu Semidünnschnitten wurden die entnommenen Nervenstücke sofort in gekühltem 3%igem Glutaraldehyd (in PBS) fixiert und in dieser Lösung bis zur weiteren Bearbeitung im Kühlschrank belassen. Alle Fixierlösungen, die in der Lichtmikroskopie gebraucht werden, müssen in einer Pufferlösung angesetzt werden, wobei Isotonie und Osmolarität des zu fixierenden Materials zu berücksichtigen sind (Naish 1989).

Glutaraldehyd hat durch seine zwei Aldehydgruppen sehr gute und schnelle Fixiereigenschaften. Sein Nachteil ist, dass die Eindringtiefe der Lösung sehr gering ist, daher dürfen die Gewebestücke nur maximal 0,5 cm dick sein. Vor der weiteren Bearbeitung wurden sie in 0,1 M PBS 5 min. gewaschen. Dann folgte die Nachfixierung in PBS-verdünntem Osmiumtetroxid für 1 h im Kühlschrank.

Osmiumtetroxid bewirkt zum einen eine optimale Lipidfixierung und zum anderen lagert es sich an Proteine an und bildet elektronendichte Verbindungen. Diese ermöglichen die Bilderzeugung und den Kontrast im Lichtmikroskop. Da es stark giftig und ätzend ist, darf es bei Laborexperimenten nur unter einem Abzug gehandhabt werden.

Die Präparate müssen in Kunststoff eingebettet werden, um später sehr dünne Schnitte erzielen zu können. Es gibt Kunststoffe, die nicht mit Wasser mischbar sind, deshalb müssen die Präparate entwässert werden. Dazu wird eine aufsteigende Alkoholreihe verwendet, wodurch das gesamte Wasser aus der Probe durch Alkohol entzogen wird.

2.3.1 Dehydrieren der Proben

Das Dehydrieren der Proben erfolgt in aufsteigender Alkoholreihe: im ersten Schritt werden sie mit 50%igem Alkohol für 10 min. und im zweiten Schritt mit 70%igem Alkohol plus 0,5%igem Uranylacetat behandelt und 1 h im Kühlschrank aufbewahrt. Danach wird in 80%igem Alkohol, dann in 96%igem Alkohol je 10 min. und zuletzt in 100%igem Alkohol zweimal je 15 min. dehydriert.

2.3.2 Einbettung

Die Einbettung der Proben erfolgt in Araldit und Propylenoxid im Verhältnis 1:1 und anschließend im Verhältnis von 2:1 für jeweils 35 Minuten. Dann werden die Proben in reinem Araldit für 1 h, davon 40 min. im Wärmeschrank bei 40 °C aufbewahrt.

Danach werden die Nervensegmente in vorgetrocknete Flachformen mit frischem Araldit eingelegt. Bei 60 °C härten dann die Blöcke mindestens 48 h aus.

Nach der Polymerisation werden die Blöcke aus den Formen entfernt und sind somit für die weitere Bearbeitung vorbereitet.

Mit dem Ultramikrotom (OMU3, Reichert & Jung) wurden davon Semidünnschnitte von ca. 0,5–1 µm Schichtdicke angefertigt. Vor dem Schneiden wird ein Überschuss an Kunststoff um die Probe herum mit einer Rasierklinge entfernt. Für die Semidünnschnitte werden Glasmesser verwendet. Die Schnitte werden auf einer Heizplatte gestreckt und anschließend mit Färbelösung nach Richardson (2 Teile 2% Methylenblau 1 Teil 1% Azur II und 1 Teil 1% Borax) angefärbt und in Araldit eingedeckt. Die einzelnen Gewebe- und Zellanteile nehmen unterschiedliche Blautöne an.

Nach dem vollständigen Trocknen werden die Schnitte lichtmikroskopisch kontrolliert, mit Araldit eingedeckt und ausgehärtet.

2.4 Morphometrie

Die Myelindichte der degenerierenden Nerven wurde in den Semidünnschnitten lichtmikroskopisch mit einem 100fach Objektiv mit Ölimmersion bestimmt. Dazu benutzte man ein Okular mit Zählraster der Firma Zeiss, das 25 Punkte auf das Objekt projizierte. Dieses Zählraster wird mäanderförmig zirka zehnmal über den Nervenquerschnitt gelegt und jedesmal werden die Punkte gezählt, die auf einer Myelinscheide zu liegen kommen, die nicht von einem Makrophagen phagozytiert ist. Diese werden in Beziehung zu den Punkten gesetzt, die nicht auf Myelin abgebildet wurden, wohl aber innerhalb des Nervens liegen. Die Myelindichte wurde als Anteil der auf Myelin liegenden Punkte an der Gesamtzahl der die Nerven treffenden Punkte definiert (Maximum = 25).

Die Myelindichte der Makrophagen ist also ein anteiliger Wert von 25, dargestellt in „arbitrary units“ (aU). Die Myelindichten der Makrophagen sind als relative Werte in Tabelle 2 (S. 24) erfasst.

Die Anzahl F4/80-, LFA-1- und Mac-1-positiver Zellen sowie die Anzahl phagozytierender Makrophagen in den Semidünnschnitten wurde ebenfalls mit dem Lichtmikroskop bei 100er Vergrößerung mit Hilfe eines morphometrischen Zählgitters (10x10, Zeiss) quantitativ ermittelt. Die Gesamtzahl der Makrophagen pro Fläche im Nervensegment wurde mittels eines weiteren Zählgitters bestimmt. Die Makrophagen sind im Semidünnschnitt als große phagozytische Zellen mit Pseudopodien zu identifizieren, die Myelinschutt und Fetttröpfchen im Zytoplasma enthalten. Pro Nervenquerschnitt wurden wiederum zehn Felder ausgezählt. Die zufällig ausgewählten Messfelder hatten bei dieser Vergrößerung (Objektiv 100x) jeweils eine Größe von $10.000 \mu\text{m}^2$. Die Werte werden als Zelldichte pro mm^2 Gewebe angegeben. Alle Messungen wurden für jede Gruppe mehrfach ausgeführt und dann gemittelt.

2.5 Statistik

Die erhobenen Daten wurden mit Hilfe des Student-t-Tests und des Mann-Whitney-U-Tests statistisch überprüft.

Dabei dient der Student-t-Test der Feststellung von Mittelwertsunterschieden, während der U-Test als eine Variante des Wilcoxon-Prinzips ein Rangreihentest ist, der speziell für unabhängige Stichproben entwickelt wurde und gleiche Verteilungsformen in den Grundgesamtheiten voraussetzt.

3. Ergebnisse

3.1 Wallersche Degeneration

Nach den Axotomien waren alle Tiere gesund und aktiv. Sie zeigten lediglich eine typische Parese des rechten Hinterbeins, die aber bereits am 2. Tag nach der Operation gut kompensiert wurde.

Nach der Durchtrennung des Nervus ischiadicus traten die typischen Phänomene der Wallersche Degeneration im distalen Teil des Nerven auf. Die Degeneration der Myelinscheiden und der Untergang der axonalen Strukturen waren deutlich zu erkennen, sowohl bei den Wildtyp- als auch bei den IL-6-knockout-Mäusen. Zahlreiche Makrophagen wanderten in die Durchtrennungsstelle ein und sorgten für den Myelinabbau.

Bei beiden Mäusestämmen war nach der Durchtrennung eine große Zahl an Makrophagen zu beobachten.

3.2 Phagozytierende Makrophagen

Lichtmikroskopisch erkannte man die phagozytierenden Makrophagen an ihren intrazytoplasmatischen, lichtbrechenden Vakuolen, Pseudopodien und dem phagozytierten Myelin. Eine Vielzahl von Makrophagen (periphere Phagozyten) war nach der Durchtrennung der Nerven in das Endoneurium gewandert.

Bei beiden Mausstämmen erhöhte sich ihre Zahl nach 4 Tagen und ein weiteres Mal nach 6 Tagen.

Der Vergleich zwischen Wildtyp- und IL-6-defizienten Mäusen (Tab. 1) zeigte folgende Unterschiede: Am Tag 4 nach Durchtrennung lag der Mittelwert der phagozytierenden Makrophagen der Wildtyp-Mäuse bei 1130 ± 339 Zellen/mm² und bei den IL-6-knockout-Mäusen bei 921 ± 288 Zellen/mm² und war damit signifikant unterschiedlich. Am Tag 6 lag der Mittelwert der Wildtyp-Mäuse bei 1606 ± 298 Zellen/mm² und der der IL-6-knockout-Mäuse bei 1194 ± 269 Zellen/mm². Hier wurde

sogar ein extrem signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen festgestellt ($p < 0,0001$).

Damit erhöhte sich sowohl bei den Wildtypen als auch bei den knockout-Tieren von Tag 4 zu Tag 6 die Anzahl der phagozytierenden Makrophagen signifikant. An beiden Versuchstagen war die Zahl der Makrophagen bei den IL-6-knockout-Mäusen jedoch geringer als bei den Wildtyp-Kontrollen (vgl. Tab. 1 und Abb. 4).

In den contralateralen, nicht durchtrennten Kontrollnerven aller Tiere konnten keine Makrophagen detektiert werden.

Tab. 1: phagozytierende Makrophagen im Vergleich zwischen Wildtyp- und IL-6-knockout-Mäusen

Tag der Axotomie	Tiergruppen	Stichproben- größe n	Phagozytier. Makrophagen Zellen/mm ²	Student- t-Test p
4	WT	26	1130 +/- 339	$p < 0,0055$ (WT4d–IL-6 4d) **
	IL-6ko	60	921 +/- 288	$p < 0,0001$ (IL-6 4d–IL-6 6d) ****
6	WT	30	1606 +/- 298	$p < 0,0001$ (WT4d–WT6d) ****
	IL-6ko	56	1194 +/- 269	$p < 0,0001$ (IL-6 6d–WT6d) ****

Abb. 4: Vergleich der phagozytierenden Makrophagen aus den Semidünnschnitten zwischen Wildtyp- und IL-6-knockout-Mäusen am Tag 4 und 6

Ihre Anzahl erhöht sich bei beiden Mausstämmen nach 4 Tagen und ein weiteres Mal nach 6 Tagen. Bei den IL-6-knockout-Mäusen ist sie dabei immer niedriger als bei den Wildtieren. (nach Student-t-Test: ** – signifikant, **** – extrem signifikant)

3.3 Myelindichte

Nach Durchtrennung des Ischiasnerven kommt es bei beiden Mausstämmen zu einer rapiden, signifikanten Abnahme von intaktem Myelin im Vergleich zum nicht-durchtrennten contralateralen Nerv. Der Vergleich 4 Tage und 6 Tage nach Axotomie zeigt, dass bei beiden Mausgruppen der Myelingehalt signifikant unterschiedlich abnimmt (Abb. 5).

Im Einzelnen sinkt der Myelingehalt bei den Wildtyp-Mäusen für den contralateralen Nerven vom Ausgangswert 12,98 $\pm$ 2,5 aU auf 4,62 $\pm$ 1,4 aU nach 4 Tagen und geht auf 2,6 $\pm$ 0,7 aU nach 6 Tagen zurück (Tab. 2).

Die Myelindichten der contralateralen Nerven betrugen an Tag 4 (7,16 $\pm$ 1,8 aU) und am Tag 6 (6,66 $\pm$ 1,6 aU) und waren damit nicht signifikant unterschiedlich. (vgl. Abb. 5, Tab. 2 und Tab. 3).

Abb. 5: Vergleich der Myelindichten aus den Semidünnschnitten

Die Myelindichten nehmen bei beiden Stämmen ab. Bei den Wildtieren ist die Abnahme zwischen Tag 4 und Tag 6 stärker als bei den IL-6-knockout-Mäusen. Die Knockouts zeigen am Tag 6 eine signifikant höhere Menge an erhaltenem Myelin.

(nach Student-t-Test: n. s. – nicht signifikant, ** – signifikant, **** – extrem signifikant)

Zwischen den Wildtyp-Mäusen und den Kontrollnerven 4 Tage nach Durchtrennung war ein signifikanter Unterschied feststellbar. Die Wildtyp-Mäuse zeigten 6 Tage nach Axotomie im Vergleich zu den Kontrollnerven ebenso einen signifikanten Unterschied. Bei den IL-6-defizienten Mäusen nimmt der Myelingegehalt von $4,56 \pm 1,3$ aU auf $3,3 \pm 1,2$ aU zwischen Tag 4 und Tag 6 nach Axotomie signifikant ab.

Zwischen den IL-6-defizienten Mäusen und den Kontrollnerven am Tag 4 konnte eine signifikante Reduzierung der Myelindichte festgestellt werden.

Eine massive Reduktion der Myelindichte war bei den IL-6-defizienten Mäusen nach 6 Tagen gegenüber den nichtdurchtrennten Kontrollnerven zu beobachten.

Der Unterschied hinsichtlich der Myelindichte zwischen den beiden Mausgruppen (WT und IL-6ko) war 4 Tage nach Axotomie allerdings nicht signifikant.

Die IL-6-defizienten Mäuse wiesen zwischen Tag 4 und Tag 6 nach Durchtrennung einen signifikanten Unterschied ($p < 0,0001$) auf.

Eine Übersicht der Ergebnisse ist in Tabelle 2 und Tabelle 3 enthalten.

Tab. 2: Vergleich der Myelindichten zwischen Wildtyp- und IL-6-knockout-Mäusen

Tag der Axotomie	Tiergruppen	Stichprobengröße n	Myelindichte X von 25
4	contra	17	7,16 +/- 1,8
	WT	30	4,62 +/- 1,4
	IL-6ko	131	4,56 +/- 1,3
6	contra	24	6,66 +/- 1,6
	WT	30	2,6 +/- 0,7
	IL-6ko	123	3,3 +/- 1,2

Tab. 3: Statistische Tests (Student-t-Test) für Myelindichten

Vergleich	P	Signifikanz	
contra 4d vs contra 6d	p = 0,1795	nicht signifikant	n. s.
contra 4d vs WT 4d	p< 0,0001	extrem signifikant	****
contra 4d vs IL-6ko 4d	p< 0,0001	extrem signifikant	****
contra 6d vs WT 6d	p< 0,0001	extrem signifikant	****
contra 6d vs IL-6ko 6d	p< 0,0001	extrem signifikant	****
WT 4d vs IL-6ko 4d	p< 0,7495	nicht signifikant	n. s.
WT 4d vs WT 6d	p< 0,0001	extrem signifikant	****
IL-6ko 4d vs IL-6ko 6d	p< 0,0001	extrem signifikant	****
WT 6d vs IL-6ko 6d	p< 0,0056	signifikant	**

Die Degeneration des Myelins 4 und 6 Tage nach Axotomie, sowie die typischen, teilweise schon phagozytierten Myelinovoide sind in Abb. 6 A–D zu sehen.

Abb. 6: Vergleich des N. ischiadicus 4 und 6 Tage nach der Durchtrennung

Die Degradation des Myelins (→) zwischen 4 und 6 Tagen nach Axotomie bei A + C Wildtypmäusen und bei B + D IL-6-knockout-Mäusen. Gleichzeitig nehmen die Makrophagen (→) an Zahl und Größe zu. Maßstab 50 µm

3.4 Ergebnisse der Immunhistochemie

Für alle drei Antikörper (Mac, F4/80 und LFA) war bei den Wildtyp-Mäusen 6 Tage nach Durchtrennung eine höhere Anzahl immunpositiver Zellen als an Tag 4 festzustellen (Abb. 7).

Bei den IL-6-knockout- Mäusen trifft dies für F4/80 und LFA ebenso zu, lediglich Mac-1 ist nach 4 und 6 Tagen in fast gleicher Höhe exprimiert.

Abb. 7: Vergleich der immunpositiven Makrophagen für Mac, F4/80 und LFA zwischen IL-6-knockout- und Wildtier-Mäusen am Tag 4 und am Tag 6

Nach beiden Axotomietagen zeigten die IL-6-knockout-Mäuse eine geringere Zahl von LFA-1-positiven Makrophagen.
(nach Student-t-Test: * nicht sehr signifikant, ** signifikant)

Die Färbungen für die typischen Makrophagen-Oberflächen-Marker Mac-1 und F4/80 zeigen bei beiden Stämmen keinen signifikanten Unterschied (Abb. 7 und Tab. 4). Lediglich hinsichtlich des Markers LFA-1, der auch ein Leukozyten-Antigen erkennt, gibt es an Tag 4 einen signifikanten und an Tag 6 einen leicht signifikanten Unterschied zwischen den beiden Mausstämmen. Zu beiden Zeitpunkten wurden nach Axotomie bei den Knockouts weniger LFA-1-positive Zellen gefunden.

Bei den IL-6-knockout Mäusen waren 4 Tage nach Durchtrennung 1838 ± 723 Makrophagen pro mm^2 ($\text{M}\Phi/\text{mm}^2$) immunopositiv für Mac-1 und bei den Kontrollmäusen 1450 ± 228 $\text{M}\Phi/\text{mm}^2$. Es konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Auch für F4/80 am Tag 4 wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den Mausstämmen gefunden. Für LFA-1 hingegen zeigte sich am Tag 4 ein signifikanter Unterschied ($p < 0,0018$).

Am Tag 6 konnte für Mac-1 und F4/80 kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Mausstämmen gefunden werden. Für LFA-1 dagegen wurde am Tag 6 ein leicht signifikanter Unterschied ($p < 0,0390$) zwischen IL-6-knockout- und Wildtieren festgestellt (vgl. Tab. 4).

Tab. 4: Vergleich immunopositiver Makrophagen bei unterschiedlichen Antikörpern zwischen Wildtyp-Mäusen und IL-6-knockout-Mäusen (Student-t-Test)

Tag der Axotomie	Tiergruppen	MAC-1 positive $\text{M}\Phi/\text{mm}^2$	p	F4/ 80 positive $\text{M}\Phi/\text{mm}^2$	p	LFA-1 positive $\text{M}\Phi/\text{mm}^2$	p
4d	IL-6ko	1838 ± 723	$p=0,2855$	975 ± 559	$p=0,7729$	536 ± 203	$p=0,0018$
	WT	1450 ± 228	n. s.	1050 ± 55	n. s.	1017 ± 117	**
6d	IL-6ko	1817 ± 603	$p=0,8949$	1478 ± 451	$p=0,4828$	691 ± 495	$p=0,0390$
	WT	1780 ± 69	n. s.	1660 ± 320	n. s.	1240 ± 55	*

Abbildung 8 zeigt die immunhistochemischen Färbungen als Nachweise für MAC-1, F4/80 und LFA-1 zwischen IL-6-knockout-Mäusen am Tag 4 (links) und am Tag 6 (rechts) in 40facher Vergrößerung. Für alle drei Marker ist bei den Makrophagen an Tag 6 ein stärkeres immunopositives Signal aufgetreten.

In Abbildung 9 ist zu sehen, dass IL-6 auf fleckenartigen, kleineren Flächen im Nerv (Tag 6 bei WT-Mäusen) exprimiert wird. Diese Flächen sind nur teilweise mit Makrophagen colokalisiert. Morphologisch weist das Muster in Abb. 9 D eher auf Schwann-Zellen hin, die als Cluster IL-6 exprimieren. Eventuell exprimieren einzelne Makrophagen etwas IL-6 und sind dann Stimulatoren für diese Schwann-Zellen.

Abb. 8: Immunhistochemischer Nachweis der Makrophagen-Antigene MAC-1, F4/80 und LFA-1 im Ischiasnerven bei IL-6-knockout-Mäusen

Links 4 Tage und rechts 6 Tage nach Axotomie; Maßstab 50 µm; (40fache Vergrößerung)

Abb. 9: Immunhistochemie für den Makrophagen-Marker MAC-1 (links) und für Interleukin-6 (rechts) am Tag 6 nach Axotomie bei Wildtyp-Mäusen.

A: man erkennt eine gleichmäßige Verteilung der Makrophagen in allen Nervenfaszikeln.
 B: im Folgeschnitt des selben Nerven ist IL-6 fleckenartig an einigen Stellen im Nerv nachweisbar.
 C: hier ist die fast regelmäßige Anordnung der Mac-1-positiven Makrophagen zu sehen.
 D: derselbe Ausschnitt wie C zeigt die fleckenartige Expression von IL-6, die nicht mit allen Makrophagen colokalisiert ist und die auch nicht typische Makrophagenmorphologie zeigt.
 E: im nicht durchtrennten Nerven gibt es keine IL-6 Expression.

Maßstab A + B 200 µm; Maßstab C + D + E 50 µm

4. Diskussion

4.1. Ergebnisse der experimentellen Untersuchung

Mithilfe eines Axotomie-Modells für die Wallersche Degeneration im peripheren Nerven wurde die Rolle des Interleukin 6 anhand eines Vergleichs von IL-6-knockout- und Wildtyp-Mäusen untersucht.

Die Anzahl der phagozytierenden Makrophagen erhöhte sich bei beiden Mausstämmen. Bei den IL-6-knockout-Mäusen war sie dabei immer niedriger als bei den Wildtieren.

Die Myelindichten nahmen bei beiden Stämmen ab. Bei den Wildtieren war die Abnahme stärker als bei den IL-6-knockout-Mäusen. Die Knockouts zeigten am Tag 6 eine signifikant höhere Menge an erhaltenem Myelin.

Die Färbungen für die Makrophagen-Oberflächen-Marker Mac-1 und F4/80 zeigten bei beiden Stämmen keinen signifikanten Unterschied. Lediglich hinsichtlich des Markers LFA-1 gab es einen Unterschied. Zu beiden Zeitpunkten nach Axotomie wurden bei den Knockouts weniger LFA-1-positive Zellen gefunden.

Bei den Wildtyp-Mäusen ergab die immunhistochemische Untersuchung für den Makrophagen-Marker Mac-1 und für Interleukin-6 am Tag 6 nach Axotomie eine gleichmäßige Verteilung der Makrophagen in allen Nervenfaszikeln sowie eine fleckenartige Verteilung von IL-6. Im contralateralen, nicht durchtrennten Nerven hingegen gab es keine IL-6 Expression.

4.2. Die Rolle der Makrophagen bei der Wallerschen Degeneration

Bekannt ist, dass die Makrophagen eine wichtige Rolle im Myelinabbau während der Wallerschen Degeneration spielen. Wobei die genauen Mechanismen, die zur Einwanderung der Phagozyten in den degenerierenden Nerven führen, bis heute nicht sicher geklärt sind. Eine Reihe experimenteller Ansätze zielte auf die Identifikation und Mechanismen der myelinabbauenden Zellen ab.

Die nicht residenten, Mac-1-positiven Makrophagen wurden als die für den Myelinabbau verantwortlichen Zellen identifiziert (Beuche und Friede 1984, Scheidt und Friede 1987). Mehrere in-vitro-Studien bestätigten, dass die peripheren Makrophagen für die Myelinentfernung essentiell sind und die Fc- und CR/Mac-1-Marker tragen (Scheidt und Friede 1987, Bonnekoh et al. 1989). Bei in-vivo- und in-vitro-Versuchen gelang es, die Myelinphagozytose durch einen Antikörper gegen den CR3/Mac-1-Rezeptor zu hemmen (Brück und Friede 1990, 1991). Das Zytokin IL-1 β wirkt kurzzeitig mitogen auf Makrophagen. Die Reduktion und proliferative Aktivität der Makrophagen ist dosisabhängig (Pawlinski et al. 1999).

Lysozym ist ein guter Marker für Makrophagen, die bei der Phagozytose aktiv sind (Venezie et al. 1995).

Die Makrophagen sind nicht nur für den Myelinabbau während der Nervendegeneration verantwortlich, sondern spielen auch bei der Nervenregeneration eine entscheidende Rolle. In Abwesenheit von Makrophagen ist die Nervenregeneration beeinträchtigt (Beuche und Friede 1984). Das molekulare Milieu des degenerierenden distalen Nervenabschnitts scheint die für eine erfolgreiche Regeneration wichtige Makrophagenaktivierung nachhaltig zu beeinflussen. In den distalen Abschnitten durchtrennter peripherer Nerven ließ sich eine erhöhte Expression von Zytokinen mit unterschiedlicher zeitlicher Dynamik nachweisen (Stoll und Müller 1999). Dabei wurden IL-6 und IL-10 in der Frühphase nach Nervenläsion von Schwann-Zellen exprimiert (Stoll et al. 1999). Bei IL-6-knockout-Mäusen zeigten sich sensorische Defizite und eine deutliche Beeinträchtigung der Regeneration sensibler Nervenfasern, während die motorischen Nervenfasern davon nicht betroffen waren (Stoll et al. 1999). Andererseits deuten histologische Befunde an, dass die Ausschüttung von pro-entzündlichen Zytokinen wie IL-1 β , TNF- α und IL-6 nach Quetschungsverletzung kurzzeitig (24 h) und selbst-limitierend ist. Die vorübergehende Ausschüttung dieser Moleküle kann, ähnlich dem Triggern sekundärer Ereignisse, die Wundheilung und Regeneration fördern. (Streit et al. 1998).

Anhand von Untersuchungen mit dem proinflammatorischen Zytokin IL-18 wurde gefunden, dass Makrophagen läsionsspezifisch antworten (Stoll et al. 2002, Jander und Stoll 2001, Menge et al. 2001, Jander et al. 2002).

Die unterschiedliche Expression von Zytokinen im distalen Nervenabschnitt könnte eine mögliche Erklärung für das regenerationsfördernde bzw. regenerationsfeindliche Milieu durchtrennter peripherer bzw. zentraler Nervenfasern liefern (Stoll et al. 1999).

Die funktionelle Bedeutung für den Regenerationsprozess wird weiter analysiert werden müssen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie bestätigen die wichtige Rolle der peripheren Makrophagen während der Wallerschen Degeneration. Die peripheren Makrophagen wanderten in den degenerierenden Nerv und phagozytierten das Myelin. Bei den IL-6-defizienten Mäusen war die Makrophagenzahl deutlich niedriger als bei den Wildtieren. Die Präsenz von IL-6 scheint also in der mittleren Phase der Wallerschen Degeneration für die Einwanderung der Makrophagen notwendig zu sein. Da ihre Zahl bis zum Tag 6 nach Axotomie nur leicht (aber signifikant) reduziert war, schien ihr Migrationspotenzial behindert oder zumindest verzögert gewesen zu sein.

4.3. Die Myelinolyse bei der Wallerschen Degeneration

Schwann-Zellen leiten den Prozess der Wallerschen Degeneration durch Freisetzung der proinflammatorischen Zytokine IL-1 β , MCP-1, IL-8 sowie IL-6 ein und sind an der Rekrutierung von Makrophagen und Leukozyten beteiligt (Rutkowski et al. 1999). Am beginnenden Prozess des Myelin-Zerfalls während der WD ist die Phospholipase A2 (PLA2) beteiligt (Paul und Gregson 1992).

Die Myelinaufnahme durch Makrophagen via Komplementrezeptor Typ 3 (CR3) wird durch TNF- α reduziert (Brück et al. 1992). Aber die Myelin-Phagozytose-Aktivitätsleistung der Makrophagen ist nicht beeinträchtigt. Hauptfunktion von TNF- α während der WD ist die Induktion der Makrophagen-Rekrutierung (Liefner et al. 2000). Die Zytokine TNF- α , IL-1 α und IL-1 β regulieren u. a. indirekt den Myelin-Abbau (Shamash et al. 2002).

Die Phosphodiesterase Pentoxifyllin (POX) hemmt die Produktion von TNF- α und die ICAM-1-Ausschüttung. POX wirkt auf Makrophagen und beeinflusst deren Migration sowie die Myelin-Phagozytose während der WD (Liefner et al. 2000).

Bei der Untersuchung der lokalen Wirkungen von rekombinantem IL-6 an Ratten im peripheren Nervensystem wurde einen Tag nach Injektion eine große Zahl von Makrophagen, MHC-II-positiver Zellen sowie CD4+- und CD8+-T-Zellen innerhalb des Perineuriums und Endoneuriums gefunden. Am Tag 7 nach Injektion stiegen Entzündung und Myelinzerfall signifikant. Dies wirkte sich am Tag 8 auf mehr als 80% der Nervenfasern aus (Deretzi et al. 1999).

Infolge einer reduzierten Invasion von phagozytischen Makrophagen sinkt die Myelin-Phagozytose-Leistung und es findet ein verzögerter Abbau von Myelin statt. Dies kann aber auch seine Ursache in der Defizienz für einen Chemokin-Rezeptor haben (Siebert et al. 2000) oder durch die Gabe eines Inhibitors verursacht werden (Vougioukas et al. 2001).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen, dass der Myelingehalt nach Axotomie signifikant abnimmt im Vergleich zum nicht durchtrennten kontralateralen Nerv. Die Myelindichte war bei den IL-6-knockout-Mäusen wesentlich höher. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass IL-6 einen Einfluss auf die Myelindichte während der Wallerschen Degeneration hat. Zum einen ist die Zahl der Makrophagen bei IL-6-defizienten Tieren geringer, was wahrscheinlich einen geringeren Phagozytose-Umfang des Myelins zur Folge hat. Zum anderen könnte auch ein direkter protektiver Effekt auf das Myelin durch das Fehlen des IL-6 eine mögliche Erklärung sein.

4.4. Die Immunreaktion bei der Wallerschen Degeneration

Bei der vorliegenden Studie wurden mit Hilfe der Antikörper F4/80, Mac-1 und LFA-1 die myelinbeladenen Makrophagen dargestellt.

F4/80 ist ein zellreihenspezifischer Marker, der ausschließlich auf Mausmakrophagen exprimiert wird (Austyn und Gordon 1981).

Mac-1 (oder CD11b) ist ein leukozytäres Adhäsionsmolekül und gehört zu den β -Integrinen und damit zu den wichtigsten Adhäsionsmolekülen.

Leukozyten-Funktions-Antigen (LFA-1 oder CD11a) ist ein akzessorisches Molekül, das an antigenunabhängigen Interaktionen beteiligt ist.

LFA-1 ist der Rezeptor für ICAM-1 und ICAM-2, gehört zu den β -Integrinen und kommt als Adhäsionsmolekül auf den meisten Leukozyten vor (Staines et al. 1994). Die vorliegende Studie zeigt, dass LFA-1 bei den IL-6-knockout-Mäusen (KO) schwächer exprimiert wurde, d. h. weniger Zellen waren positiv im Vergleich zu den Wildtypen. Es kann daher angenommen werden, dass bei fehlendem IL-6 die Bindung von ICAM-1 und LFA-1 negativ beeinflusst wurde und deshalb LFA-1 herabreguliert ist. Da die Wallerschen Degeneration bei beiden Stämmen (WT + KOs) relativ normal ablief, scheint der Verlust von IL-6 auf anderem physiologischen Weg kompensiert zu werden. Auch sonst sprechen die niedrigen Makrophagenzahlen bei den IL-6-knockout-Mäusen für eine leicht verzögerte Wallersche Degeneration.

In einer weniger umfangreichen Untersuchung als in dieser Arbeit konnten Zhong et al. (1999) zeigen, dass die Zahl von F4/80-positiven Makrophagen zwischen Wildtypen und IL-6-knockout-Mäusen nicht unterschiedlich war. Dies konnte mit den vorliegenden Ergebnissen für F4/80 zwar bestätigt werden, dagegen zeigen Mac-1 an Tag 4 nach Axotomie und LFA-1 an Tag 4 und 6 nach Axotomie aber unterschiedliche Werte zwischen den beiden Gruppen. Das lässt vermuten, dass IL-6 im Zusammenhang mit diesen beiden Oberflächenmarkern in andere regulative Interaktionen involviert ist.

Romano et al. (1997) untersuchten die Interaktion von IL-6 mit Endothelzellen (EC). Sie fanden, EC schütten nur die gp130-Signal-Transduktionskette und nicht die spezifische IL-6-Rezeptor-Untereinheit (IL-6R) aus und sind deshalb unempfindlich für IL-6. Jedoch sind die EC empfänglich für die Kombination von IL-6 und löslichem IL-6-Rezeptor, wobei die Autoren mit der Chemokin-Ausschüttung gleichzeitig eine Zunahme von ICAM-1 dokumentieren konnten (Romano et al. 1997).

Nach hochregulierter Ausschüttung von Interleukin-6 und Interleukin-6-Rezeptor durch Verletzung des Nervus hypoglossus mittels Ligatur fand eine beschleunigte Nerven-Regeneration an Mäusen statt. Damit verbunden war die Hochregulation der Immunoreaktivität des Interleukin-6 in Schwann-Zellen an der Stelle der Läsion sowie in den Zellkörpern der hypoglossalen Neurone. Später wurde auch die Hochregulation der Immunoreaktivität des Interleukin-6-Rezeptors gesehen (Hirota et al. 1996).

Eine weitere Studie belegt, dass Schwann-Zellen das immunsupprimierende System im PNS bestimmen (Jander et al. 1996). Die Autoren lokalisierten die unterschiedliche Ausschüttung von IL-10-mRNA während der Wallerschen Degeneration und immu-

vermittelten Entzündung des peripheren Nervensystems am N. ischiadicus der Ratte. Sie dokumentierten, dass IL-10 im normalen N. ischiadicus durch Schwann-Zellen ausgeschüttet wurde. Während der Wallerschen Degeneration wurde am Tag 2 und Tag 4 nach Durchtrennung vermehrt IL-10-mRNA ausgeschüttet (Jander et al. 1996).

Bei IL-6-defizienten Mäusen ist die Immun- und Akute-Phase-Antwort beeinträchtigt. In vitro zeigten Leukämie-Inhibiting-Faktor (LIF), Oncostatin M (OSM), Ziliärer neurotropher Faktor (CNTF) und Interleukin-11 (IL-11) überlappende Aktivitäten mit IL-6. Diese funktionelle Redundanz kann durch die Interaktionen von spezifischen Bindungsrezeptoren mit dem gemeinsamen Signal-Transduktions-Rezeptor (gp130) erklärt werden (Kopf et al. 1994).

4.5. Das Interleukin-6 bei der Wallerschen Degeneration

Interleukin-6 wird im PNS als Antwort auf axonale Schädigungen von Schwann-Zellen, Neuronen und residenten Makrophagen produziert (Bourde et al. 1996, Hirota et al. 1996, Murphy et al. 1995, Bolin et al. 1995). Ob IL-6 hierbei eine eindeutige heilende oder schädigende Wirkung ausübt, wird allerdings kontrovers diskutiert.

Zahlreiche Veröffentlichungen belegen die besonderen Einflüsse des Interleukin-6 auf Nervengewebe. IL-6 löst sowohl antiinflammatorische (Romano et al. 1997) als auch proinflammatorische Effekte im Nervensystem aus. Es beeinflusst direkt das Wachstum, das Überleben und die Differenzierung peripherer und zentraler Neurone (Reichert et al. 1996). Ein Teil der Autoren beschreibt überwiegend neuroprotektive Effekte des IL-6 (Gadient und Otten 1997).

Die IL-6-Produktion, die durch Verletzung oder Infektion induziert wird, leitet die Akute-Phase-Antwort ein und ist ein wichtiges SOS-Signal in vivo. Sie koordiniert die Aktivitäten von Leberzellen, Makrophagen und Lymphozyten (Kopf et al. 1994). IL-6 kann vollständig entgegengesetzte Wirkungen auf Neuronen auslösen, wie neuronales Überleben nach Verletzung oder die neuronale Degeneration und Zelltod, wie u. a. bei der Alzheimer-Erkrankung (Gadient und Otten 1997).

An Mäusen, die defizient für unterschiedliche Zytokine (M-CSF, IL-1, IL-6, TNF- α , TGF- β) waren, wurde gezeigt, dass diese molekularen Signale die zelluläre Antwort regulieren (Raivich et al. 1999).

Interleukin-6 spielt eine essentielle Rolle bei der Modulation sensorischer Nervenfunktionen. Die Studie von Zhong et al. (1999) zeigte bei der vergleichenden Untersuchung von sensorischen Ästen nach Quetschung des N. ischiadicus und motorischen Ästen an IL-6-defizienten Mäusen folgende Ergebnisse: Die sensorischen Äste der IL-6-defizienten Mäuse hatten ein um 60% reduziertes Aktionspotential, eine signifikant reduzierte Empfindlichkeit auf thermische Reize sowie eine verzögerte funktionelle Erholung (Zhong et al. 1999).

Im Widerspruch dazu stehen Ergebnisse von Inserra et al. (2000). Sie fanden an IL-6-defizienten Tieren nach verschiedenen Ischias-Verletzungen, dass die Erholung des peripheren Nervs nach Verletzung nicht beeinträchtigt war. Für diese Autoren scheint dieses Zytokin keine substantielle Wirkung in der funktionellen Erholung und während der Reparatur des Nerven zu haben (Inserra et al. 2000).

Transgene Mäuse mit künstlich erhöhten cerebralen Spiegeln von IL-6 entwickelten starke neurologische Erkrankungen wie Tremor, Ataxie und Krampfanfälle. Die neuropathologischen Manifestationen schließen Neurodegeneration, Astrozytose, Angiogenese und Induktion von Akute-Phase-Protein-Produktion ein. Zytokine wie IL-6 scheinen einen direkten pathogenetischen Einfluss während der Entzündung, Infektion und neurodegenerativen Erkrankungen des ZNS zu haben (Campbell et al. 1993).

Sie bewirken den Zerfall der Blut-Hirn-Schranke und ermöglichen die Wanderung von Leukozyten in den Nerven sowie die Aktivierung und Proliferation von Lymphozyten und Makrophagen, die eine direkte myelinotoxische Aktivität haben (Créange et al. 1997).

Die beiden multifunktionellen Zytokine LIF und IL-6 stimulieren die Myoblasten-Proliferation. Während LIF neurotroph für sensorische Neuronen ist, agiert IL-6 nur auf einer Population von septalen Neuronen im Gehirn. IL-6 wird von Nervenzellen nicht retrograd transportiert. LIF und IL-6 agieren als Trauma-Faktoren aber mit unterschiedlichen Rollen in verletzten peripheren Nerven (Kurek et al. 1996).

Es wurde beobachtet, dass Schwann-Zellen durch Sekretion des Chemokins MCP-1 und LIF Makrophagen anlocken. Eine nachfolgende autokrine Signalkaskade, in die auch

IL-6 neben LIF und MCP-1 einbezogen ist, könnte die verzögerte Invasion der Makrophagen erklären (Tofaris et al. 2002).

In der vorliegenden Studie deuten die Ergebnisse daraufhin, dass es mehr als eine autokrine Signalkaskade für IL-6, LIF und MCP-1 geben muss. Bis auf LFA-1 wurden keine signifikanten Unterschiede bei F4/80- und Mac-1-immunopositiven Zellen zwischen IL-6-knockout-Mäusen und WT gefunden. Grund dafür könnte sein, dass es bis heute keine sicheren Kenntnisse über die vollständigen Interaktionen des Netzwerks des IL-6 gibt. Möglicherweise interagieren die verschiedenen Rezeptoren- und Ligandenverbindungen mit ihren unterschiedlichen Molekülstrukturen.

Den Verlust von Axonen sowie axonale Dysfunktionen bei Demyelinisierungs-Erkrankungen wie MS untersuchten Siebert und Brück (2003) an verschiedenen Mäusen, die für ICAM-1, TNF- α und IL-6 defizient waren. IL-6 ist nicht am Abbau des axonalen Zytoskeletts beteiligt. Diese Daten deuten darauf hin, dass diese Zellen und deren sezernierende Faktoren eine essentielle Rolle spielen, namentlich TNF- α , aber nicht IL-6 am Abbau des Zytoskeletts im peripheren Nervensystem beteiligt sind (Siebert und Brück 2003).

Die vorliegende Studie bestätigt die Aussage von Siebert und Brück bei den Untersuchungen von IL-6. Im Rahmen der vorgenommenen Untersuchungen gab es keinen mikroskopischen Anhalt für den Abbau des axonalen Zytoskeletts.

An dieser Stelle wurden die vielfältigen Funktionen, die die unterschiedlichsten Arbeitsgruppen dem Interleukin-6 im Immunsystem zuschreiben, insbesondere im peripheren Nervensystem, diskutiert.

Die vorliegende Arbeit bestätigte, dass IL-6 bei der Wallerschen Degeneration im PNS eine Rolle spielt. Es beeinflusst die Makrophageninvasion und damit verbunden die Phagozytose mit Myelinabbau.

Die Dysregulation der IL-6-Funktionen trägt zur Pathogenese vieler chronischer Krankheiten bei wie beispielsweise Rheumatoide Arthritis, Osteoporose oder Multiple Sklerose.

Zusätzliches Wissen um die regulatorischen Prozesse des Interleukin-6 und Wege seiner Signalübermittlung bzw. seiner Induktion wird umso wichtiger, weil davon zielgerichtet Therapien für verschiedene Krankheiten abgeleitet werden können.

5. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit hat die Rolle des Interleukin-6 in einem Axotomie-Modell für die Wallersche Degeneration im peripheren Nerven untersucht. Dafür wurden IL-6-knockout-Mäuse und entsprechende Wildtyp-Kontroll-Mäuse verwendet.

Es wurden histologische Schnitte der entnommenen Nerven 4 und 6 Tage nach Durchtrennung des N. ischiadicus angefertigt. Die Makrophagen-Phagozytose-Aktivität und die Myelindichte wurden an Semidünnschnitten und die Makrophagen-Antigene F4/80, Mac-1, LFA-1 immunhistochemisch untersucht. Die Auswertung erfolgte lichtmikroskopisch.

Nach Axotomie zeigte sich bei beiden Mausstämmen eine deutliche Makrophagen-invasion. Die Zahl der phagozytierenden Makrophagen war am Tag 6 größer als am Tag 4. Bei den IL-6-knockout-Mäusen war die Anzahl der Makrophagen immer geringer als bei den Wildtypen. Ebenso nahmen die Myelindichten bei beiden Stämmen ab, wobei bei den IL-6-knockout-Tieren an Tag 6 eine höhere Menge erhaltenen Myelins vorhanden war als bei den Wild-Typen.

Immunhistochemisch zeigte sich ein leicht differenzierteres Bild, bei dem besonders die signifikant erniedrigten Zahlen von LFA-1-positiven Makrophagen auffielen.

Diese Ergebnisse zeigen, dass das Interleukin-6 eine wichtige Rolle während der Makrophagenmigration, -invasion und deren Adhäsion an degenerierendes Myelin in der frühen Phase der Wallerschen Degeneration spielt. Die durch Makrophagen bedingte Myelinphagozytose ist in Abwesenheit von IL-6 signifikant beeinträchtigt. Die Intaktheit axonaler Strukturen in Abwesenheit von IL-6 ist ein Phänomen, das weiter untersucht werden sollte.

Die Rolle des IL-6 für immunvermittelte Demyelinisierungserkrankungen ist durch mehrere Arbeiten bestätigt worden. Es ist anzunehmen, dass IL-6 im Netzwerk mit anderen Zytokinen gemeinsam untersucht werden muss, um einen zukünftigen therapeutischen Einsatz möglicherweise mit IL-6-Antikörpern oder -Inhibitoren zu testen. Ob letztere dann isoliert oder erstere im Verbund mit anderen Zytokinen als Therapeutikum angewendet werden können, wird sich erst anschließend bei der Behandlung dieser Erkrankung zeigen.

6. Literaturverzeichnis

Alberts B, Bray D, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P: Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie; Wiley-VCH, Weinheim 1999

Austyn JM, Gordon S (1981): F4/80, a monoclonal antibody directed specifically against the mouse macrophage. *Eur J Immunol* 11, 805-15

Beuche W, Friede RL (1984): The role of non-resident cells in Wallerian degeneration. *J Neurocytol* 13, 767-96

Böcker W. (Hrsg.): Pathologie, 2. Aufl.; Urban & Fischer; München 2001, 318

Bolin LM, Verity AN, Silver JE, Shooter EM, Abrams JS (1995): Interleukin-6 production by Schwann cells and induction in sciatic nerve injury. *J Neurochem* 64, 850-8

Bonnekoh PG, Scheidt P, Friede RL (1989): Myelin phagocytosis by peritoneal macrophages in organ cultures of mouse peripheral nerve. A new model for studying myelin phagocytosis in vitro. *J Neuropathol Exp Neurol* 48, 140-53

Bourde O, Kiefer R, Toyka KV, Hartung HP (1996): Quantification of interleukin-6 mRNA in wallerian degeneration by competitive reverse transcription polymerase chain reaction. *J Neuroimmunol* 69, 135-40

Brett FM, Mizisin AP, Powell HC, Campbell IL. (1995): Evolution of neuropathologic abnormalities associated with blood-brain barrier breakdown in transgenic mice expressing interleukin-6 in astrocytes. *J Neuropathol Exp Neurol* 54, 766-75

Brück W (1997): The role of macrophages in Wallerian degeneration. *Brain Pathol* 7, 741-52

Brück W, Friede RL (1990): Anti-macrophage CR3 antibody blocks myelin phagocytosis by macrophages in vitro. *Acta Neuropathol* 80, 415-8

Brück W, Friede RL (1991): The role of complement in myelin phagocytosis during PNS wallerian degeneration. *J Neurol Sci* 103, 182-7

Brück W, Brück Y, Friede RL. (1992): TNF-alpha suppresses CR3-mediated myelin removal by macrophages. *J Neuroimmunol* 38, 9-17

Campbell IL, Abraham CR, Masliah E, Kemper P, Inglis JD, Oldstone MB, Mucke L (1993): Neurologic disease induced in transgenic mice by cerebral overexpression of interleukin 6. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 10061-5

Créange A, Barlovatz-Meimon G, Gherardi RK (1997): Cytokines and peripheral nerve disorders. *Eur Cytokine Netw* 8, 145-51

David H (Hrsg.): Wörterbuch der Medizin, 2 Bd., 14. Aufl., Verlag Gesundheit; Berlin 1990

Deretzi G, Pelidou SH, Zou LP, Quiding C, Zhu J (1999): Local effects of recombinant rat interleukin-6 on the peripheral nervous system. *Immunology* 97, 582-7

Doenecke D, Koolman J, Fuchs G, Gerik W: Karlsons Biochemie und Pathobiochemie, 15. Aufl.; Thieme, Stuttgart 2005, 178, 553

Gadient RA, Otten UH (1997): Interleukin-6 (IL-6) – a molecule with both beneficial and destructive potentials. *Prog Neurobiol* 52, 379-90

Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Müller-Newen G, Schaper F (2003): Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J* 374, 1-20

Hirota H, Kiyama H, Kishimoto T, Taga T (1996): Accelerated Nerve Regeneration in Mice by upregulated expression of interleukin (IL) 6 and IL-6 receptor after trauma. *J Exp Med* 183, 2627-34

Inserra MM, Yao M, Murray R, Terris DJ (2000): Peripheral nerve regeneration in interleukin 6-deficient mice. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 126, 1112-6

Ito Y, Yamamoto M, Li M, Doyu M, Tanaka F, Mutch T, Mitsuma T, Sobue G (1998): Differential temporal expression of mRNAs for ciliary neurotrophic factor (CNTF), leukemia inhibitory factor (LIF), interleukin-6 (IL-6), and their receptors (CNTFR alpha, LIFR beta, IL-6R alpha and gp130) in injured peripheral nerves. *Brain Res* 793, 321-7

Jander S, Stoll G (2001): Interleukin-18 is induced in acute inflammatory demyelinating polyneuropathy. *J Neuroimmunol* 114, 253-8

Jander S, Pohl J, Gillen C, Stoll G (1996): Differential expression of interleukin-10 mRNA in Wallerian degeneration and immune-mediated inflammation of the rat peripheral nervous system. *J Neurosci Res* 43, 254-9

Jander S, Bussini S, Neuen-Jacob E, Bosse F, Menge T, Müller HW, Stoll G (2002): Osteopontin: a novel axon-regulated Schwann cell gene. *J Neurosci Res* 67, 156-66

Keller, R: Immunologie und Immunpathologie, 4. neubearb. und erw. Aufl.; Thieme, Stuttgart 1994, 53-55

Kishimoto T, Akira S, Narazaki M, Taga T (1995): Interleukin-6 family of cytokines and gp130. *Blood* 86, 1243-54

Kopf M, Baumann H, Freer G, Freudenberg M, Lamers M, Kishimoto T, Zinkernagel R, Bluethmann H, Köhler G (1994): Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6-deficient mice. *Nature* 368, 339-42

Kurek JB, Austin L, Cheema SS, Bartlett PF, Murphy M (1996): Up-regulation of leukaemia inhibitory factor and interleukin-6 in transected sciatic nerve and muscle following denervation. *Neuromuscul Disord* 6, 105-14

Lau LT, Yu AC (2001): Astrocytes produce and release interleukin-1, interleukin-6, tumor necrosis factor alpha and interferon-gamma following traumatic and metabolic injury. *J Neurotrauma* 18, 351-9

Leonhardt, H: Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen; Thieme, Stuttgart 1990, 247-253

Liefner M, Siebert H, Sachse T, Michel U, Kollias G, Brück W (2000): The role of TNF-alpha during Wallerian degeneration. *J Neuroimmunol* 108, 147-52

Menge T, Jander S, Stoll G (2001): Induction of the proinflammatory cytokine interleukin-18 by axonal injury. *J Neurosci Res* 65, 332-9

Muñoz-Fernández MA, Fresno M (1998): The role of tumour necrosis factor, interleukin 6, interferon-gamma and inducible nitric oxide synthase in the development and pathology of the nervous system. *Prog Neurobiol* 56, 307-40

Murphy PG, Grondin J, Altares M, Richardson PM (1995): Induction of interleukin-6 in axotomized sensory neurons. *J Neurosci* 15, 5130-8

Naish SJ (Hrsg): Handbuch II immunchemischer Färbemethoden, DAKO, Hamburg 1989

Naka T, Nishimoto N, Kishimoto T (2002): The paradigm of IL-6: from basic science to medicine. *Arthritis Res* 4, 233-42

Palin K, Cunningham C, Forse P, Perry VH, Platt N (2008): Systemic inflammation switches the inflammatory cytokine profile in CNS Wallerian degeneration. *Neurobiol Dis* 30, 19-29

Paul JA, Gregson NA (1992): An immunohistochemical study of phospholipase A2 in peripheral nerve during Wallerian degeneration. *J Neuroimmunol* 39, 31-47

Pawliński R, Setkowicz Z, Małodzińska K, Janeczko K (1999): Interleukin-1 beta affects the macrophage recruitment and proliferation in the injured brain of 6-day-old rat. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 59, 271-8

Raivich G, Bohatschek M, Kloss CU, Werner A, Jones LL, Kreutzberg GW (1999): Neuroglial activation repertoire in the injured brain: graded response, molecular mechanisms and cues to physiological function. *Brain Res Brain Res Rev* 30, 77-105

Reichert F, Levitzky R, Rotshenker S (1996): Interleukin 6 in intact and injured mouse peripheral nerves. *Eur J Neurosci* 8, 530-5

Roitt IM, Brostoff J, Male DK: Kurzes Lehrbuch der Immunologie, 3. neubearb. Aufl.; Thieme, Stuttgart 1995, 105

Romano M, Sironi M, Toniatti C, Polentarutti N, Fruscella P, Ghezzi P, Faggioni R, Luini W, van Hinsbergh V, Sozzani S, Bussolino F, Poli V, Ciliberto G, Mantovani A (1997): Role of IL-6 and its soluble receptor in induction of chemokines and leukocyte recruitment. *Immunity* 6, 315-25

Rook G (1988): The role of activated macrophages in the immunopathology of tuberculosis. *Br Med Bull* 44, 624

Rutkowski JL, Tuite GF, Lincoln PM, Boyer PJ, Tennekoon GI, Kunkel SL (1999): Signals for proinflammatory cytokine secretion by human Schwann cells. *J Neuroimmunol* 101, 47-60

Sawada M, Suzumura A, Marunouchi T (1992): TNF alpha induces IL-6 production by astrocytes but not by microglia. *Brain Res* 583, 296-9

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

Shamash S, Reichert F, Rotshenker S (2002): The cytokine network of Wallerian degeneration: tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1alpha, and interleukin-1beta. *J Neurosci* 22, 3052-60

Siebert H, Brück W (2003): The role of cytokines and adhesion molecules in axon degeneration after peripheral nerve axotomy: a study in different knockout mice. *Brain Res* 960, 152-6

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, 177-85

Staines N, Brostoff J, James K: Immunologisches Grundwissen, 2.Aufl., G. Fischer, Stuttgart 1994, 61

Stoll G, Jander S (1999): The role of microglia and macrophages in the pathophysiology of the CNS. *Prog Neurobiol* 58, 233-47

Stoll G, Müller HW (1999): Nerve injury, axonal degeneration and neural regeneration. *Brain Pathology* 9, 313-25

- Stoll G, Jander S, Schroeter M (1999): Zytokine im Nervensystem: immunologische und neurobiologische Funktionen. *Neuroforum* 5, 115-119
- Stoll G, Jander S, Myers RR (2002): Degeneration and regeneration of the peripheral nervous system: from Augustus Waller's observations to neuroinflammation. *J Peripher Nerv Syst* 7, 13-27
- Streit WJ, Semple-Rowland SL, Hurley SD, Miller RC, Popovich PG, Stokes BT (1998): Cytokine mRNA profiles in contused spinal cord and axotomized facial nucleus suggest a beneficial role for inflammation and gliosis. *Exp Neurol* 152, 74-87
- Suzumura A, Sawada M, Marunouchi T (1996): Selective induction of interleukin-6 in mouse microglia by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Brain Res* 713, 192-8
- Taga T, Kishimoto T (1997): Gp130 and the interleukin-6 family of cytokines. *Annu Rev Immunol* 15, 797-819
- Tofaris GK, Patterson PH, Jessen KR, Mirsky R (2002): Denervated Schwann cells attract macrophages by secretion of leukemia inhibitory factor (LIF) and monocyte chemoattractant protein-1 in a process regulated by interleukin-6 and LIF. *J Neurosci* 22, 6696-703
- Venezie RD, Toews AD, Morell P (1995): Macrophage recruitment in different models of nerve injury: lysozyme as a marker for active phagocytosis. *J Neurosci Res* 40, 99-107
- Vougioukas VI, Siebert H, Heinecke K, Brück W (2001): Effects of the immunomodulator linomide on macrophage migration and myelin phagocytic activity in peripheral nerve trauma: an experimental study. *J Neurotrauma* 18, 555-62
- 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 Trans R Soc London (Biol Sci.)* 140, 423-429
- Yan HQ, Banos MA, Herregodts P, Hooghe R, Hooghe-Peters EL (1992): Expression of interleukin (IL)-1 beta, IL-6 and their respective receptors in the normal rat brain and after injury. *Eur J Immunol* 22, 2963-71
- Zhong J, Dietzel ID, Wahle P, Kopf M, Heumann R (1999): Sensory impairments and delayed regeneration of sensory axons in interleukin-6-deficient mice. *J Neurosci* 19, 4305-13

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Wolfgang Brück als Leiter der Abteilung Neuropathologie im Zentrum Pathologie und Rechtsmedizin für die Überlassung des Themas, seine exzellente Betreuung und die wissenschaftlich anregenden Gespräche. Prof. Brück hat Eigenschaften, die sich eine Doktorandin wünscht. Er hat mir meinen Einstieg in die Forschung ermöglicht, hatte immer ein offenes Ohr für Fragen und war für mich als Berater jederzeit da. Ihm gebührt meine Hochachtung.

Frau Dr. rer. nat. Heike Siebert bin ich für die Einführung in die Labortechnik und die geduldige Betreuung zu großem Dank verpflichtet.

Den Mitarbeitern des neuropathologischen Institutes, namentlich Karl-Heinz Friedrich, Kathrein Permien, Hannah Plückhan und Dorothea Krupke, danke ich besonders für die Unterstützung bei den immunhistochemischen und mikroskopischen Laborarbeiten. Ohne ihre technische Hilfe würde vieles „anders“ aussehen.

Für die Erstellung der Graphiken danke ich Jan Hülpiusch.

Meiner Mutter danke ich besonders für die moralische Unterstützung, ohne die ich manchmal vielleicht aufgegeben hätte, sowie ihre hilfreichen Bemerkungen bei der Dissertation.