

Aus der Neurologischen Klinik der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Direktor: Universitätsprofessor Dr. H.-J. Freund

---

**Inflammation und Zytokininduktion in der  
ischämischen Hirnläsion**

Habilitationsschrift

der Hohen Medizinischen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
vorgelegt von

Dr. med. Sebastian Jander  
Düsseldorf

2000

	2
<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>6</b>
1.1 Pathophysiologie der zerebralen Ischämie	7
1.2 Entzündungsreaktionen im Zentralnervensystem	8
<b>2. FRAGESTELLUNG</b>	<b>11</b>
<b>3. MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>12</b>
3.1 Tierexperimente	12
3.1.1 Ischämieinduktion durch Photothrombose	12
3.1.2 Ischämieinduktion durch distale Okklusion der A. cerebri media (MCAO)	12
3.1.3 Systemische Makrophagendepletion	13
3.1.4 NMDA-Rezeptorblockade mit MK-801	14
3.1.5 Induktion der experimentell autoimmunen Encephalomyelitis (EAE)	14
3.1.6 Induktion der Wallerschen Degeneration	15
3.2 Immunhistochemische Methoden	15
3.2.1 Antikörper	15
3.2.2 Gewinnung nativen Kryostatmaterials	15
3.2.3 Paraffinmaterial	17
3.2.4 Immunfärbung mit der Avidin-Biotin-Komplex (ABC)-Methode	17
3.2.5 Doppelimmunfluoreszenz und konfokale Lasermikroskopie	17
3.2.6 Quantifizierung ED1-positiver Makrophagen	18
3.2.7 Immunhistochemie an humanem Autopsiematerial	19
3.3 Apoptosenachweis mittels TUNEL-Technik	19
3.4 Molekularbiologische Methoden	20
3.4.1 RNA-Isolierung	20
3.4.2 Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)	21

<b>4.</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>25</b>
4.1	Zelluläre Infiltration in ischämischen Kortextläsionen	25
4.2	Transiente Expression von Zelladhäsionsmolekülen und Immunaktivierungsmarkern in der Infarkttrandzone	29
4.3	Zeitlich-räumliche Koinzidenz von Immunaktivierung und verzögertem apoptotischen Zelltod	31
4.4	Der differentielle Beitrag residenter Mikroglia und hämatogener Makrophagen zur postischämischen Phagozytenreaktion	34
4.5	Die differentielle Expression von CD4 und CD8 auf Makrophagen-Subpopulationen in ischämischen Läsionen	37
4.6	Abwesenheit von CD8-positiven Makrophagen in autoimmunen und degenerativen Läsionsparadigmen des ZNS	46
4.7	Die Entzündungsreaktion beim humanen Hirninfarkt	48
4.8	Zytokinexpression im ZNS: Die EAE als autoimmunologisches Vergleichsparadigma	53
4.9	Zytokinexpression in ischämischen Hirnläsionen: Untersuchungen im MCAO-Modell	59
4.10	Läsionelle vs. läsionsferne Zytokininduktion: Untersuchungen im Photothrombosemodell	62
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>68</b>
5.1	Inflammation und verzögerter Zelltod in der Infarkttrandzone	69
5.2	Die Rolle residenter Mikroglia	72
5.3	Eine neue Subpopulation CD8-positiver ZNS-Makrophagen	74
5.4	Zytokine als Regulatoren lokaler Entzündungsprozesse im ZNS: Vergleich zwischen autoimmuner Enzephalomyelitis und Ischämie	78
5.5	Differentielle Zytokin- und iNOS-Induktion im infarzierten und nichtinfarzierten Kortex: Die Rolle NMDA-Rezeptor-vermittelter Signaltransduktion	81

5.6	Ausblick: Eine Rolle von Zytokinen für neuronale Dysfunktion und postläsionelle Plastizität?	86
<b>6.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>88</b>
<b>7.</b>	<b>LITERATUR</b>	<b>92</b>
<b>8.</b>	<b>ABBILDUNGSNACHWEIS</b>	<b>106</b>
<b>9.</b>	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>107</b>

## ABKÜRZUNGEN

AMPA	$\alpha$ -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazolpropionat
BDNF	'Brain-derived neurotrophic factor'
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenyl-Indolyldihydrochlorid
EAE	experimentelle autoimmune Encephalomyelitis
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
ICAM-1	'Intercellular adhesion molecule-1'
IFN	Interferon
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
LFA-1	'Leukocyte-function-associated antigen-1'
mAb	monoklonaler Antikörper
MBP	basisches Myelinprotein
MCAO	mikrochirurgische Okklusion der A. cerebri media ('middle cerebral artery occlusion')
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex)
NGF	Nervenwachstumsfaktor
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NMDAN-Methyl-D-Aspartat	
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion
SD	'Spreading depression'
TBS	Tris-gepufferte Saline
TGF	'Transforming growth factor'
Th1	T-Helfer-Typ1
Th2	T-Helfer-Typ2
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TUNEL	Terminales Desoxyribonukleotidyltransferase-katalysiertes dUTP-Digoxigenin Nick End Labeling
VCAM-1	'Vascular cell adhesion molecule-1'
VLA-4	'very late activation antigen-4'

## 1. EINLEITUNG

Der ischämische Insult ist eine der häufigsten Ursachen bleibender neurologischer Behinderung und mit hoher sekundärer Mortalität behaftet. Grundlegender Pathomechanismus des ischämischen Insultes ist die akute Durchblutungsstörung im Versorgungsgebiet einer intrakraniellen Arterie, die in den meisten Fällen auf arteriosklerotische Gefäßveränderungen oder eine kardiale Emboliequelle zurückgeht. Bisherige Forschungsansätze konzentrierten sich auf hämodynamische und metabolische Veränderungen in der Frühphase nach fokaler Ischämie. Große Therapiestudien zeigten jedoch, daß über die reine Perfusionswiederherstellung mittels Lysetherapie nur in einem sehr begrenzten Zeitfenster von bis zu 3 Stunden eine günstige Beeinflussung des ischämischen Hirnschadens möglich ist (The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group, 1995). Kontrastierend hierzu legen experimentelle und klinische Befunde nahe, daß es über mehrere Tage nach ischämischem Insult einerseits zu sekundärer Verschlechterung mit Zunahme der Läsionsgröße und klinischen Ausfälle (Heiss et al., 1992; Hossmann, 1994b; Baird et al., 1997), andererseits aber auch zu plastisch-regenerativen Prozessen mit zumindest partieller Funktionswiederherstellung kommen kann (Stroemer et al., 1995; Furlan et al., 1996; Witte und Stoll, 1997). Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zum Verständnis zellulärer und molekularer Pathomechanismen im Sekundärstadium nach fokaler Hirnischämie beizutragen. Hierbei wurde der Schwerpunkt auf die Analyse inflammatorischer Prozesse gelegt, deren Bedeutung für die Pathogenese akuter und chronischer Neurodegeneration in den letzten Jahren zunehmend in den Mittelpunkt des Interesses gerückt ist (Giulian und Robertson, 1990; Lees, 1993; Meda et al., 1995; London et al., 1996; Rothwell et al., 1997).

## 1.1 Pathophysiologie der zerebralen Ischämie

Experimentelle und klinische Untersuchungen zeigten, daß im Zentrum eines Hirninfarktes durch die kritische Durchblutungsminderung eine Zone schwerster Energiedepletion entsteht, die innerhalb weniger Minuten über den Zusammenbruch der zellulären Ionenhomöostase (anoxische Depolarisation) zum neuronalen Zelltod und zur Entwicklung einer ischämischen Pannekrose führt (Siesjö, 1992). Ischämischer Zelltod erfolgt hierbei überwiegend passiv über die primäre Störung der Membranfunktion mit konsekutiver Zellschwellung, während Veränderungen der Kerne erst sekundär hinzutreten (Garcia et al., 1993). Im Unterschied zum Läsionszentrum ist die Durchblutungsminderung in der Randzone des Infarktes geringer ausgeprägt, so daß es zwar zum Verlust elektrischer Erregbarkeit und Auftreten neuronaler Funktionsstörungen kommt, das Membranpotential und die zelluläre Überlebensfähigkeit aber erhalten bleiben (Siesjö, 1992). Zahlreiche Befunde sprechen dafür, daß sich ischämische Läsionen über mehrere Tage hinweg in ihre Randzone (die sog. "ischämische Penumbra") hinein ausdehnen (Heiss et al., 1992; Ginsberg und Pulsinelli, 1994; Hossmann, 1994a; Baird et al., 1997). Die Pathomechanismen dieses verzögerten Läsionswachstums werden bislang erst ansatzweise verstanden. Eine wichtige Rolle spielt wahrscheinlich die Freisetzung des exzitatorischen Neurotransmitters Glutamat, der über ionotrope Glutamatrezeptoren vom NMDA- und AMPA-Typ zum Einstrom zytotoxischen Kalziums in die Neurone führt (Choi und Rothman, 1990). Glutamaterge Signaltransduktion vermittelt darüberhinaus die Entstehung von Perinfarktdepolarisationen, die sich vom ischämischen Fokus aus repetitiv über die gesamte ipsilaterale Hemisphäre ausbreiten, den Sauerstoff- und Energiebedarf erhöhen und hierdurch die metabolische Situation in der ischämischen Penumbra weiter verschlechtern (Hossmann, 1994b). Verzögerter postischämischer Zelltod scheint zumindest teilweise über den aktiven, d.h. energieabhängigen und Protein-neusynthese erfordernden Vorgang der Apoptose zu erfolgen (Linnik et al., 1993; Charriaut-Marlangue et al., 1995; Li et al., 1995).

Zur systematischen Untersuchung der Infarktpathogenese im ZNS stehen zahlreiche Tiermodelle zur Verfügung. Eine weit verbreitete Methode ist die direkte mikrochirurgische Koagulation der A. cerebri media nach Abgang der Stammganglienarterien ('middle cerebral artery occlusion' = MCAO), die über eine permanente Ischämie zur Ausbildung großer kortikaler Territorialinfarkte führt (Bederson et al., 1986). Als alternative Methode führten Watson et al. (1985) die Photothrombose ein. Hierbei wird der photoaktivierbare Farbstoff Bengalrosa intravenös injiziert und nachfolgend die Hirnoberfläche durch die intakte Schädelkalotte hindurch fokal belichtet. Durch die photochemisch ausgelöste Radikalbildung kommt es zur Endothelschädigung in zerebralen Mikrogefäßen mit nachfolgender Plättchenaggregation und Gefäßthrombosierung. Photochemisch induzierte Ischämien gehen mit anderen Modellen vergleichbaren Veränderungen des lokalen Blutflusses und Glukosemetabolismus einher (Dietrich et al., 1986a; Dietrich et al., 1986b). Neben ihrer Nichtinvasivität hat die Photothrombose den Vorteil, lokal scharf umgrenzte, gut reproduzierbare Läsionen zu erzeugen, welche die differentielle Analyse zellulärer Reaktionen im ischämischen Fokus selbst, seiner Randzone und in weiter entfernt liegenden Regionen der gleichen Hemisphäre zulassen. Demgegenüber sind die Läsionen bei der MCAO oft unscharf abgrenzbar und in ihrer Größe schlechter reproduzierbar.

## 1.2 Entzündungsreaktionen im Zentralnervensystem

Lange Zeit wurde davon ausgegangen, daß das ZNS als "immunologisch privilegiertes" Organ von einer effektiven Immunüberwachung weitgehend ausgenommen ist und Entzündungsreaktionen nicht oder nur in äußerst begrenztem Ausmaß zuläßt. Als Ursache hierfür wurde die Existenz der sog. "Blut-Hirn-Schranke" und das scheinbare Fehlen zellulärer Immunreaktivität im ZNS angesehen. Neuere Befunde zeigten aber, daß die Blut-Hirn-Schranke keine absolute Barriere für das Eindringen aktivierter Entzündungszellen in das ZNS darstellt (Wekerle et al., 1986; Hickey et al., 1991). Neurone und Gliazellen sind außerdem entgegen ursprünglichen Annah-

men zur Expression von Immunmolekülen wie Antigenen des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC) (Matsumoto und Fujiwara, 1986; Streit et al., 1989; Neumann et al., 1995; Corriveau et al., 1998; Linda et al., 1998) und inflammatorischen Zytokinen (Merrill und Benveniste, 1996; Mehler und Kessler, 1997; Pan et al., 1997) in der Lage, so daß von vielfältigen wechselseitigen Interaktionen zwischen dem Nerven- und Immunsystem ausgegangen werden muß.

Grundlegende Konzepte zellulärer Immunreaktivität im Nervensystem wurden zunächst am Modell der experimentell autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) entwickelt. Die EAE wird in geeigneten Versuchstieren - zumeist genetisch suszeptiblen Nagern - durch autoantigenspezifische CD4-positive T-Helferzellen vermittelt und dient in Teilaspekten als Tiermodell der humanen Multiplen Sklerose (Raine, 1984). Im Akutstadium der Erkrankung findet sich eine massive lymphomonozytäre Infiltration des ZNS, die klinisch von der Entwicklung aufsteigender Paresen begleitet wird (Hickey et al., 1983). Enzephalitogene T-Zellen exprimieren ein charakteristisches Muster proinflammatorischer Zytokine, das im wesentlichen die Zytokine Interferon (IFN)- $\gamma$ , Interleukin (IL)-2 und Tumornekrosefaktor (TNF)- $\alpha$  umfaßt (Weinberg et al., 1993). Hierdurch sind sie als sog. T-Helfer Typ1 (Th1)-Zellen zu kategorisieren (Abbas et al., 1996). Demgegenüber produziert eine funktionell antagonistische Population von sog. Th2-Zellen überwiegend antiinflammatorische Zytokine wie IL-4 und IL-10, die bei der oft beobachteten Spontanlimitierung entzündlicher Reaktionen im Nervensystem eine wichtige Rolle spielen könnten (Kennedy et al., 1992; Bettelli et al., 1998). Kritische Voraussetzung für die effiziente Prägung und Aktivierung von Th1-Zellen ist die Sekretion des kostimulatorischen Zytokins IL-12 durch antigenpräsentierende Zellen im Initialstadium der Immunantwort (Trinchieri, 1993). Proinflammatorische Zytokine induzieren auf zerebralen Endothelzellen Adhäsionsmoleküle wie das ICAM-1 und VCAM-1, die an die Integrine LFA-1 bzw. VLA-4 auf der Oberfläche aktivierter Leukozyten binden (Butcher, 1991; Springer, 1994) und hierüber ihre Adhäsion und

nachfolgende Transmigration in das ZNS ermöglichen (Cannella et al., 1990; Yednock et al., 1992). Hier lösen sie eine pathogene Effektorkaskade aus, an der sowohl residente Gliazellen als auch hämatogen rekrutierte Makrophagen beteiligt sind (Bauer et al., 1995).

In den letzten Jahren wurde zunehmend die Bedeutung inflammatorischer Mechanismen für die Pathogenese neurodegenerativer Erkrankungen erkannt. Aktivierte Entzündungszellen bilden eine Vielzahl toxischer Substanzen, die neuronalen Zelltod direkt auslösen oder zumindest zu seiner sekundären Exazerbation beitragen können (Piani et al., 1991; Banati et al., 1993; Giulian et al., 1993; Lees, 1993; Talley et al., 1995). Die durch proinflammatorische Zytokine hervorgerufene Induktion reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffverbindungen wie dem Stickstoffmonoxid (NO) führt *in vitro* zur signifikanten Potenzierung glutamatvermittelter Neurotoxizität (Chao et al., 1992; Hewett et al., 1994; Chao et al., 1995a). Andererseits fördern aktivierte Entzündungszellen über die Sekretion von IL-1 die Sekretion neurotropher Faktoren in anderen nichtneuronalen Zellen (Lindholm et al., 1987) und sind nach adäquater Stimulation auch selbst zur Neurotrophinproduktion in der Lage (Elkabes et al., 1996; Kerschensteiner et al., 1999). Neurotrophine und inflammatorische Zytokine können unter bestimmten Voraussetzungen Neurone vor exzitotoxisch und oxidativ bedingtem Zelltod schützen (Mattson und Cheng, 1993; Cheng et al., 1994). Auch fokalischemische Hirnläsionen induzieren einen ausgeprägten lokalen Entzündungsprozeß (Clark et al., 1993; Garcia et al., 1994), der in seinen zellulären und molekularen Pathomechanismen bislang unvollständig charakterisiert und seiner Bedeutung für die Läsionspathogenese weitgehend unverstanden ist.

## 2. FRAGESTELLUNG

Die vorliegende Arbeit ist der Bearbeitung folgender Fragen gewidmet:

- In welchem Zeitgang und welcher räumlichen Verteilung infiltrieren immunkompetente Zellen fokale ischämische Läsionen des Rattenkortex?
- Welche Rolle spielen residente Gliazellen bei der Läsionsentstehung?
- Gibt es eine Beziehung zwischen dem lokalen Entzündungsprozeß und dem Auftreten sekundären apoptotischen Zelltods?
- Welche Zytokine werden bei der fokalen Ischämie exprimiert? Kommt es zusätzlich zur Expression proinflammatorischer Zytokine auch zu antiinflammatorischer Gegenregulation, die die postischämische Entzündungsreaktion limitieren könnte? Wie ist das zeitliche und räumliche Verteilungsmuster der einzelnen Faktoren?
- Welche Rolle spielt NMDA-Rezeptor-vermittelte Signaltransduktion für die postischämische Induktion pro- und antiinflammatorischer Zytokine?
- Finden sich hinsichtlich der Entzündungsreaktion Parallelen zwischen experimenteller fokaler Ischämie und humanen Hirninfarkten?
- Unterscheidet sich die postischämische Inflammation von der bei autoimmunen oder degenerativen Läsionsparadigmen des ZNS?

### 3. MATERIAL UND METHODEN

#### 3.1 Tierexperimente

##### 3.1.1 Ischämieinduktion durch Photothrombose

Die Photothrombose wurde im rechten parietalen Kortex männlicher Wistar-Ratten (250 - 300 g Körpergewicht; Eigenzucht der zentralen Tierversuchsanlage der Heinrich-Heine-Universität) nach der Methode von Watson et al. (1985) induziert. Die Tiere wurden durch eine Halothan-Inhalationsnarkose [1,3 % in O<sub>2</sub>/N<sub>2</sub> (1:2)] anästhesiert und in einem stereotaktischen Rahmen befestigt. Ein Venenkatheter wurde in der linken Femoralvene plziert und eine Inzision des Skalps zur Exposition der Kalottenoberfläche vorgenommen. Anschließend wurde auf der Kalotte ein 1,5 mm dickes Fiberglasoptikbündel 3,5 - 4 mm posterior zum Bregma und 3,5 - 4 mm lateral zur Mittellinie stereotaktisch positioniert und eine 20-minütige Belichtung mit einem kalten, weißen Lichtstrahl (150 W) durch die intakte Kalotte hindurch vorgenommen. Während der ersten 2 Minuten der Belichtungsperiode wurde Bengalrosa (1,3 mg/100 g Körpergewicht bei einer Konzentration von 10 mg/ml in 0,9 % NaCl) intravenös injiziert. Die Temperatur im Bereich der Belichtungstelle und die rektale Körpertemperatur wurde mit einem digitalen Computerthermometer (CTA 1220 in Verbindung mit dem EB01 Sensor der Fa. Ebro) kontrolliert und lag üblicherweise bei  $36,5 \pm 0,5$  °C.

##### 3.1.2 Ischämieinduktion durch distale Okklusion der A. cerebri media (MCAO)

Zur Induktion einer MCAO wurde bei 280-320 g schweren männlichen Ratten (Sprague-Dawley oder Wistar) unter Halothan-/N<sub>2</sub>-Narkose (s.o.) zunächst ein koronarer Hautschnitt zwischen dem rechten Auge und Ohr ausgeführt. Anschließend wurde unter Erhaltung des N. facialis, der arteriellen Blutversorgung und des Orbitainhaltes

der M. temporalis zurückgezogen. Die temporale Kalotte wurde knapp oberhalb des Os zygomaticum dargestellt und von aufliegendem Periost und Muskelinsertionen befreit. Die Kalotte wurde anschließend mit einem mikrochirurgischen Bohrer (Meisinger, Düsseldorf) ausgedünnt und mit einer Pinzette kurz oberhalb der A. cerebri media eröffnet. Anschließend wurde die Dura mit der Spitze einer 27G-Kanüle eröffnet, die Arterie vorsichtig von der Hirnoberfläche angehoben und proximal der V. cerebri inferior und distal des Tractus olfactorius mit einer mikrochirurgischen Koagulationspinzette (Leibinger, Freiburg) koaguliert. Um die permanente Unterbrechung des Blutstroms sicherzustellen, wurde die Arterie schließlich im Bereich der Okklusion durch Koagulation durchtrennt. Anschließend wurden der M. temporalis und die Haut in separaten Schichten verschlossen und die Inhalationsnarkose beendet. Während der gesamten Operation und der anschließenden Aufwachphase wurde eine konstante Körpertemperatur von  $36,5^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  durch Lagerung der Tiere auf einer Heizdecke bzw. unter einer Heizlampe eingehalten.

### 3.1.3 Systemische Makrophagendepletion

Periphere Makrophagen und Monozyten wurden durch intravenöse Injektion multilamellarer mannosylierter Liposomen, die mit Dichlordimethyldiphosphonat gefüllt waren, depletiert (Huitinga et al., 1990; Van Rooijen et al., 1990). Die Liposomen wurden als Suspension in phosphatgepufferter Saline (PBS) von Dr. Inge Huitinga (Vrije Universiteit Amsterdam, Niederlande) zur Verfügung gestellt. Insgesamt erhielten 12 Wistarratten je 3 sequentielle Liposomeninjektionen 2 Tage vor (1,8 ml), am Tag der Photothrombose selbst (1,8 ml) und 2 Tage danach (0,9 ml) in die linke Femoralvene. Hierdurch war eine effiziente Depletion peripherer Makrophagen vom Zeitpunkt der Ischämieinduktion bis zum 8. Tag nach Ischämie zu erreichen. Die effektive Depletion peripherer Makrophagen wurde jeweils durch immunhistochemische Untersuchung der Milz sichergestellt. 12 weitere Tiere erhielten parallel zur Kontrolle lediglich PBS-gefüllte Liposomen (n=6) oder PBS (n=6). Zwischen beiden

Kontrollgruppen waren hinsichtlich der immunhistochemischen Befunde keine signifikanten Unterschiede feststellbar. Die Tiere wurden an Tag 1 (n=3 in jeder Gruppe), Tag 3 (n=6) und Tag 6 (n=3) mit einer Überdosis Halothan getötet. Zur immunhistochemischen Analyse wurde jeweils das Gehirn und die Milz entnommen und nativ eingefroren.

#### 3.1.4 NMDA-Rezeptorblockade mit MK-801

Die *in vivo*-Blockierung des NMDA-Rezeptors erfolgte 30 Minuten vor Photothrombose oder MCAO durch intravenöse Injektion des nichtkompetitiven NMDA-Rezeptorantagonisten MK-801 (Dizocilpine, Research Biochemicals, Natick, USA) in einer Dosierung von 2 mg/kg Körpergewicht in 0,9 % NaCl. Kontrollen erhielten ein äquivalentes Volumen 0,9 % NaCl ohne MK-801.

#### 3.1.5 Induktion der experimentell autoimmunen Encephalomyelitis (EAE)

10 bis 14 Wochen alten weiblichen Lewisratten wurde unter Narkose mit Chloralhydrat (0,385 g pro kg Körpergewicht i.p.) 25 µg eines synthetischen Peptids (MBP68-86), das der enzephalitogenen Region [Aminosäuren 68-86 nach Fritz und McFarlane (1989)] des Basischen Myelinproteins (MBP) vom Meerschweinchen entsprach, in 150 µl komplettem Freundschens Adjuvanz subkutan in den linken Hinterlauf injiziert. MBP68-86-Peptid wurde am Institut für Biochemie II der Georg-August-Universität in Göttingen von Dr. B. Schmidt synthetisiert und über Hochdruckflüssigkeitschromatographie gereinigt. Die Gewebeentnahme zur Cryostataufarbeitung bzw. RNA-Isolierung (s.u.) erfolgte in Gruppen zu 3 - 5 Tieren nach 8, 11, 13, 15, 18, 21 und 28 Tagen.

### 3.1.6 Induktion der Wallerschen Degeneration

Unter Narkose mit Chloralhydrat (s.o.) wurde der N. opticus einer Seite direkt hinter dem Bulbus mit einer sterilen Pinzette gequetscht. Die Gewebeentnahme zur Cryostataufarbeitung erfolgte am Tag 1, 2, 4, 7, 14, 28 und 60 nach Läsion.

## 3.2 Immunhistochemische Methoden

### 3.2.1 Antikörper

Immunhistochemische Färbungen beim experimentellen Hirninfarkt wurden abhängig vom verwendeten Primärantikörper (vgl. Tab. 1) überwiegend an Cryostatschnitten nativgefrorenen Gewebes durchgeführt. Lediglich mit den monoklonalen Antikörpern (mAb) ED1, 15-6A1 und NeuN konnten auch Paraffinschnitte paraformaldehydfixierten Materials angefärbt werden.

### 3.2.2 Gewinnung nativen Kryostatmaterials

Native Gewebeproben wurden nach Töten der Tiere mit einer Überdosis Äther rasch präpariert, in Tissue Tek-Medium (Sakura Finetek, Torrance, USA) eingebettet und in Methylbutan, das zuvor mit Trockeneis auf ca.  $-50^{\circ}\text{C}$  gekühlt worden war, eingefroren. Die gefrorenen Gewebelöcke wurden bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.  $5\ \mu\text{m}$  Cryostat-schnitte wurden auf einem CM 3050 Cryotom der Fa. Leica angefertigt, auf silanierte Objektträger aufgezogen und luftgetrocknet. Anschließend erfolgte in den meisten Fällen eine 10-minütige Fixierung in Aceton bei  $-20^{\circ}\text{C}$ , die von erneuter Luft-trocknung gefolgt wurde. Abweichend hiervon wurden Schnitte von Ischämiehirnen zur besseren Darstellung des CD11b/c-Antigens mit 4 % Paraformaldehyd für 10 min bei  $4^{\circ}\text{C}$  mit nachfolgender je 2-minütiger Inkubation in 50/100/50 %igem Aceton fixiert.

Tabelle 1: Für die Immunhistochemie verwendete Primärantikörper.

Antikörper	Spezifität	Verdünnung	Quelle
Ox-42 (m)	CD11b/c (Makrophagen, Mikroglia, Granulozyten)	1:1600 (IP) 1:50 (IF)	Serotec (Oxford, England)
ED1 (m)	Makrophagen, phagozytisch transformierte Mikroglia	1:2000 (IP) 1:1000 (IF)	Serotec
Ox-35 (m)	CD4 (T-Zellen, Makrophagen, Mikroglia)	1:2000 (IP) 1:500 (IF)	Serotec
Ox-8 (m)	CD8 $\alpha$ [T-Zellen, Natürliche Killer (NK)-Zellen]	1:2000 (IP) 1:500 (IF)	Serotec
R1-10B5 (m)	CD8 $\alpha$ (T-Zellen, NK-Zellen)	1:1000 (IP) 1:50 (IF)	Seikagaku (Tokyo, Japan)
341 (m)	CD8 $\beta$ (T-Zellen)	1:1000 (IP)	Serotec
R1-3B3 (m)	CD5 (T-Zellen)	1:1000 (IP)	Seikagaku
15-6A1 (m)	T-Zellen	1:1000 (IP)	Holland Biotechnology (Leiden, Niederlande)
HIS48 (m)	Granulozyten	1:500 (IF)	Pharmingen (San Diego, USA)
3.2.3 (m)	NK-Zellen	1:500 (IP)	Serotec
1A29 (m)	ICAM-1	1:500 (IP)	Pharmingen
WT-1 (m)	LFA-1	1:500 (IP)	Pharmingen
Ox-6 (m)	MHC Klasse II	1:1000 (IP)	Serotec
Ox-18 (m)	MHC Klasse I	1:1000 (IP)	Serotec
NeuN (m)	Neurone	1:1000 (IP)	Dr. R. Kuhn, La Jolla
NSE (p)	Neurone	1:100 (IP)	DAKO, Hamburg
GFAP (p)	Astrozyten	1:10000 (IP) 1:1000 (IF)	Sigma, Deisenhofen

(IP = Immunperoxidase; IF = Immunofluoreszenz; m = monoklonaler Mausantikörper; p = polyklonaler Kaninchenantikörper)

### 3.2.3 Paraffinmaterial

Die Tiere wurden mit Chloralhydrat (0,4 g/kg Körpergewicht) narkotisiert und mit 4 %iger Paraformaldehydlösung in 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,4, transkardial perfundiert. Die Gewebe wurden anschließend im gleichen Fixierungsreagenz über Nacht bei 4°C nachfixiert und anschließend nach Standardmethoden in Paraffin eingebettet. 5 -10 µm dicke Schnitte wurden auf einem Reichert-Jung-Mikrotom angefertigt und auf silanisierte Objektträger aufgezogen. Vor der Immunfärbung erfolgte eine Deparaffinierung der Schnitte in Xylol.

### 3.2.4 Immunfärbung mit der Avidin-Biotin-Komplex (ABC)-Methode

Fixierte Cryostat- bzw. entparaffinierte Paraffinschnitte wurden mit 3 % igem Normalserum (Spezies identisch zu der des Sekundärantikörpers) in PBS für 30 min bei Raumtemperatur geblockt und über Nacht bei 4°C in einer geeigneten Verdünnung des jeweiligen Primärantikörpers in PBS inkubiert (s. Tabelle). Nach kurzem Waschen in PBS wurden die Schnitte anschließend für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit dem biotinylierten Sekundärantikörper (Vector, Burlingame, CA, USA), 1:200 in PBS, inkubiert. Nach erneutem Waschen erfolgte die Inkubation mit dem ABC-Elite-Reagenz (Vektor) nach Anleitung des Herstellers. Der Peroxidasenachweis erfolgte durch 10-minütige Inkubation in 0,2 mg/ml Diaminobenzidin, 0,004 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in PBS. Die Reaktion wurde durch Waschen in Wasser abgestoppt. Die Schnitte wurden anschließend über eine aufsteigende Alkoholreihe dehydriert und mit Entellan (Merck) eingedeckelt.

### 3.2.5 Doppelimmunfluoreszenz und konfokale Lasermikroskopie

Zur Doppelimmunfluoreszenz wurden die Schnitte über Nacht simultan mit zwei Antikörpern unterschiedlichen Isotyps bei 4°C inkubiert, die anschließend mit isotypspe-

zifischen Sekundärantikörpern der Fa. Southern Biotechnology (Birmingham, Alabama, USA) detektiert wurden. Für die mAb Ox-35 und Ox-42 wurde biotinyliertes Ziege-anti-Maus (GAM) IgG2a (1:50), gefolgt von Avidin-Texas Red (1:100, Vector), verwendet. Der mAb Ox-8 wurde mit Fluoreszein-markiertem GAM IgG1 (1:50), mAb ED1 mit Texas Red-markiertem GAM IgG1 (1:50), mAb R1-10B5 mit Fluoreszein-markiertem GAM IgG2a (1:50) und mAb HIS48 mit biotinyliertem GAM IgM (Vector, 1:100), gefolgt von Avidin-Texas Red, detektiert. Isotyp-identische Primärantikörper gegen irrelevante Antigene wurden bei gleicher Verdünnung als Negativkontrollen verwendet. Fluoreszenzgefärbte Schnitte wurden mit Vectashield Mounting Medium (Vector) eingedeckelt und mit einem konfokalen Lasermikroskop analysiert (Bio-Rad MRC 1024 laser scanning system in Verbindung mit Nikon DIAPHOT 300). Die einzelnen Bilder wurden durch die x,y-Ebene der Schnitte bei 488 nm und 568 nm Wellenlänge aufgezeichnet und zur Lokalisation unterschiedlicher Antigene in doppelfluoreszenzgefärbten Schnitten übereinander gelagert.

### 3.2.6 Quantifizierung ED1-positiver Makrophagen

Die immunhistochemische Detektion ED1-positiver Makrophagen erfolgte bei liposomenbehandelten und Kontroll-Ratten jeweils parallel in den ischämischen Läsionen und den Milzen. Zur Färbung wurde der mAb ED1 nach der unter 3.2.4 beschriebenen Standardmethodik eingesetzt. Zur Quantifizierung in den Läsionen wurde der prozentuale Anteil makrophageninfiltrierter Areale an der Gesamtläsionsfläche auf koronaren Schnitten durch das Zentrum der Läsionen mittels computergestützter Planimetrie (Mandi YG 9220 Kamera, 256 x 256 Pixel, Hamamatsu DVS 3000 Video image processing unit, NIH Bildanalyse Software auf einem Apple Macintosh-Computer) bestimmt.

### 3.2.7 Immunhistochemie an humanem Autopsiematerial

Paraffinblöcke humaner Hirninfarkte standen über eine Kooperation mit Herrn PD Dr. W. Brück, Institut für Neuropathologie der Georg-August-Universität in Göttingen, zur Verfügung. Untersucht wurden durchweg Territorialinfarkte im Gebiet der A. cerebri media. Die Latenz zwischen Insultereignis und Eintritt des Todes betrug in den einzelnen Fällen 4 (n=2), 6 (n=3), 7 (n=1), 9 (n=2) bzw. 14 Tage (n=2). Todesursache waren in allen Fällen primär insultunabhängige internistische Komplikationen wie schwere Allgemeininfekte oder kardiorespiratorisches Allgemeinversagen.

5 - 10  $\mu\text{m}$  dicke Paraffinschnitte wurden auf silanisierten Objektträgern aufgezogen, entparaffiniert und zur Wiederherstellung antigener Epitope einer 10-minütigen Inkubation in 10 mM Natriumzitatpuffer, pH 6,0, in einem Mikrowellen-Ofen bei 600 W unterzogen (Cattoretti et al., 1993). Zur Darstellung von Makrophagen wurde der mAb KP-1 (DAKO, 1:50), von MHC Klasse II-Antigen der mAb CR3/43 (DAKO, 1:500), von T-Zellen ein polyklonaler Kaninchenantikörper gegen humanes CD3 (DAKO, 1:100), von ICAM-1 und VCAM-1 polyklonale Ziegenantikörper [R+D Systems, No. BBA-17 (ICAM-1) bzw. BBA-19 (VCAM-1), beide in einer Verdünnung von 1:2000] verwendet. Alle Antikörper wurden an Paraffinschnitten humaner Lymphknoten getestet und gaben dort jeweils typische Färbemuster [vgl. Rice et al. (1991) zur Lokalisation von VCAM-1 in lymphatischem Gewebe]. Die Detektion mit geeigneten Sekundantikörpern und dem ABC-Elite-Kit (Vector) erfolgte wie unter 3.2.4 beschrieben.

### 3.3 Apoptosenachweis mittels terminaler Desoxyribonukleotidyltransferase-katalysierter dUTP-Digoxigenin Nick End Labeling (TUNEL)-Technik

5  $\mu\text{m}$  dicke Paraffinschnitte wurden entparaffiniert und mit 20  $\mu\text{g/ml}$  Proteinase K (Sigma) für 15 Minuten bei Raumtemperatur angedaut. Anschließend wurden die

Schnitte mit dem TUNEL-Reaktionsgemisch [jeweils 10  $\mu$ l 5 x Tailing-Puffer, 0,5  $\mu$ l Digoxigenin (DIG) DNA Labeling-Mischung, 0,5  $\mu$ l 25 mM Kobaltchlorid, 4 U Terminale Transferase (alle Reagenzien von Boehringer Mannheim), 39  $\mu$ l H<sub>2</sub>O] für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Hiernach wurden die Schnitte kurz mit TBS (10 mM Tris/HCl, pH 7,4, 0,9 % NaCl) gespült, für 30 Minuten in 3 % normalem Ziegenserum in TBS bei Raumtemperatur geblockt und mit Alkalische Phosphatase -gekoppeltem Schaf-anti-DIG (1:500 in TBS/3 % normales Ziegenserum) für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Detektion erfolgte unter Verwendung des 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat/4-Nitroblue-Tetrazoliumchlorid (BCIP/NBT) Substrat-Systems der Fa. Boehringer Mannheim. Anschließend folgte die Kern-Fluoreszenzfärbung durch kurze Inkubation mit 2 mg/ml 4',6-Diamidin-2-phenyl-indoldihydrochlorid (DAPI).

### 3.4 Molekularbiologische Methoden

#### 3.4.1 RNA-Isolierung

Sämtliche Tiere wurden mit einer Überdosis Äther getötet. Die mittels Photothrombose oder MCAO erzeugten ischämischen Läsionen wurden nach Eröffnung der Kalotte und Entfernung der anhaftenden Hirnhäute rasch mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten, unmittelbar in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bis zur weiteren Aufarbeitung bei -80°C gelagert. Bei der Photothrombose wurden zusätzlich gleichgroße Gewebestücke (ca. 30-50 mg Feuchtgewicht) aus nichtischämischem Kortex der ipsilateralen Hemisphäre (temporolateral, frontal und occipital) sowie homotop zur Läsion gelegenen kontralateralen Kortex präpariert. Zur RNA-Isolierung wurden die tiefgefrorenen Gewebestücke mit je 700  $\mu$ l TRIZOL-Reagenz (GIBCO BRL, Gaitherburg, MD, USA) versetzt und unmittelbar mit einem Polytron Homogenisator für 15 Sekunden bei maximaler Geschwindigkeit homogenisiert. Das weitere Vorgehen richtete sich exakt nach dem Protokoll der Fa. GIBCO. Die Gesamt-RNA aus einer

Gewebeprobe wurde in jeweils 30  $\mu$ l Diethylpyrocarbonat (DEPC)-behandeltem H<sub>2</sub>O gelöst.

Bei der EAE wurde nach Dekapitierung der Tiere das lumbale und untere thorakale Rückenmark (ca. 300 mg Feuchtgewicht pro Tier) durch Insufflation von 50 ml Luft in den Spinalkanal gewonnen, unmittelbar anschließend in je 5 ml TRIZOL-Reagenz homogenisiert, in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bis zur RNA-Isolierung bei -80°C gelagert. Die weitere Präparation erfolgte ebenfalls nach dem Protokoll der Fa. GIBCO. Die Gesamt-RNA aus einem Rückenmark wurde in je 200  $\mu$ l DEPC-H<sub>2</sub>O gelöst.

Die Nukleinsäurekonzentrationen der gewonnenen Gesamt-RNA-Proben wurden mittels Spektralphotometrie als  $A_{260\text{nm}} \times 40$  [ng/ $\mu$ l] bestimmt. Zur Abschätzung der Reinheit der RNA-Präparationen wurde zusätzlich die Absorption bei 280 nm erfaßt und der Quotient  $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$  gebildet, der routinemäßig größer als 1,75 war und damit eine akzeptable Reinheit der Proben anzeigte. Die Intaktheit der RNA wurde mittels denaturierender Formaldehyd-Agarose Gelelektrophorese geprüft.

### 3.4.2 Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)

1 $\mu$ g Gesamt-RNA wurde unter Verwendung von oligo-dT20 Primern und SuperscriptII (GIBCO BRL) reverser Transkriptase entsprechend dem Protokoll der Fa. GIBCO BRL revers transkribiert. Der 20  $\mu$ l große Ansatz wurde nach Beendigung der Reaktion mit Wasser auf 50  $\mu$ l aufgefüllt. Entsprechend einer RNA-Menge von 20 ng pro Ansatz wurde zur anschließenden PCR Analyse je 1  $\mu$ l cDNA eingesetzt. Jeder PCR-Ansatz enthielt darüberhinaus in einem Reaktionsvolumen von 30  $\mu$ l je 25 pmol des jeweiligen *sense*- und *antisense*-Primers (vgl. Tab. 2), 10 mM Tris-HCl pH 8,3 (bei 25°C), 50 mM KCl, 10% Dimethylsulfoxid, 1,25 mM MgCl<sub>2</sub>, je 250  $\mu$ M dATP, dCTP, dGTP und dTTP sowie 1,5 Einheiten AmpliTaq DNA-Polymerase (Perkin-El-

mer, Oak Brook, IL, USA). Um Interferenzen durch die unerwünschte Amplifikation kontaminierender genomischer DNA auszuschließen, wurden - soweit die Genstruktur bekannt war - Exon-Intron-Grenzen überspannende Primerkombinationen gewählt. Zusätzlich zu den in Tab. 2 aufgeführten Primern wurden noch kommerziell erhältliche Primer der Fa. Biosource International (Cammarillo, USA) für IL-12p35 [Annealingtemperatur ( $T_{Ann}$ ) 60°C, 30 Amplifikationszyklen] und iNOS ( $T_{Ann}$  60°C, 25 Zyklen) verwendet, deren Sequenzen vom Hersteller nicht mitgeteilt wurden. Die PCR-Ansätze wurden in einem TRIO-Block Thermocycler der Fa. Biometra, Göttingen, bei folgenden Bedingungen inkubiert: 1.) 2 Minuten bei 93°C, 2.) 30 Sekunden bei 93°C, 30 Sekunden bei der jeweiligen  $T_{Ann}$  des Primers (s.o. und Tab. 2), 45 Sekunden bei 72°C für abhängig vom jeweiligen Primer 18 bis 35 Zyklen (s.o. und Tab. 2), 3.) 10 Minuten bei 72°C.

Zur gelelektrophoretischen Analyse wurden von jedem Ansatz 15 µl in einem 1,5 %igen Agarosegel aufgetrennt, das 10 µg/ml Ethidiumbromid enthielt. Die Gele wurden im UV-Durchlicht mit einer CSC-Kamera der Fa. Cybertech, Berlin, fotografiert. Die Bandenintensitäten wurden unter Verwendung des Programmes TINA 2.0 der Fa. Raytest, Straubenhardt, densitometrisch quantifiziert. In jedem PCR-Experiment wurde als Negativkontrolle für jede Primerkombination ein Ansatz ohne Zugabe von cDNA mitgeführt, der durchweg negativ blieb. Zusätzlich wurden mit jeder Primerkombination auch RNA-Proben ohne vorherige reverse Transkription amplifiziert, wodurch in keinem Fall spezifische Banden zu erhalten waren. Um die Identität der Amplifikate sicherzustellen, wurden repräsentative PCR-Produkte einer automatisierten DNA-Sequenzierung (ABI PRISM 310 Genetic Analyzer der Fa. Perkin Elmer) unterzogen.

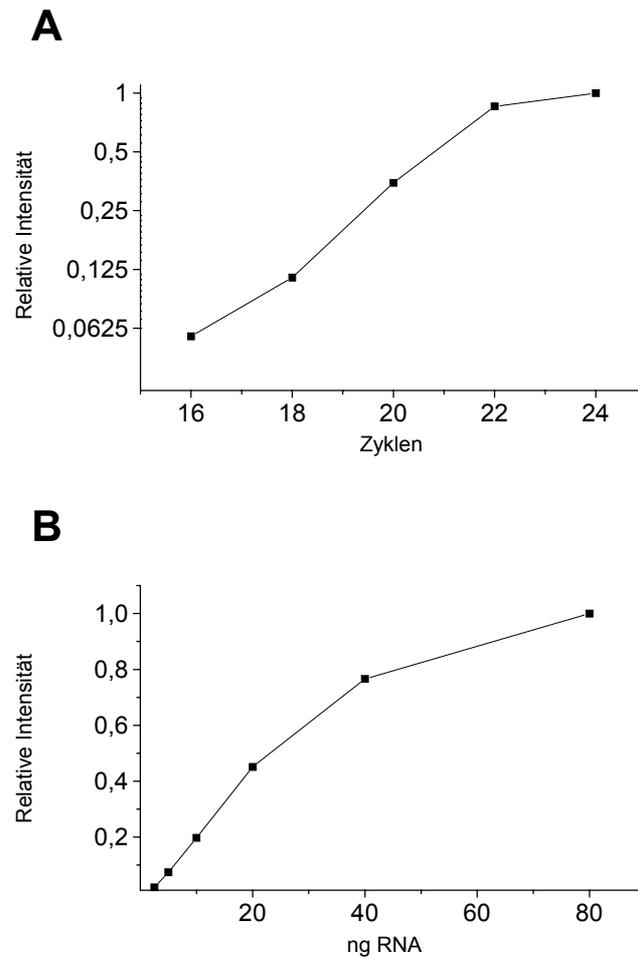
Tabelle 2: Primerkombinationen für die RT-PCR-Analyse

(s = sense-Primer; a = antisense-Primer; GAPDH = Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase)

cDNA (Acc.-Nr.)	Sequenz (5' → 3')	Lokalisation (nt)	T <sub>Ann</sub> (°C)	Zyklen
CD3 (D13555)	CTAGGGCGAAGAGAAGGAATATGATG (s) GGGTGAAGCCTTTGAGTGAGAAATC (a)	348-372 648-624	60	25
CD4 (M15768)	AAGCAGGAGAATCAGGAGGCCAGGG (s) TCTGGCGTAAAGGCAGCTACGGAGG (a)	1080-1104 1638-1662	60	30
CD8 $\alpha$ (X03015)	CACGGGTGATCTGCTTTCTGTCTGCTG (s) AGCAGAAGAACCGCGCAGATTCCG (a)	53-78 630-653	58	30
CD8 $\beta$ (X04310)	GGTGTCTCAAAGAGCGCCAAGATG (s) GGACATTGTTTCTTCTTCAGTGTAG (a)	19-43 476-500	58	30
IFN- $\gamma$ (M29316/7)	ATCTGGAGGAAGCTGGCAAAGGACG (s) CCTTAGGCTAGATTCTGGTGACAGC (a)	160-184 447-423	60	30-35
IL-10 (X60675)	GAAAACAGAGCTTCAGCATGCTTGG (s) TTTGAGTGTCACGTAGGCTTCTATGC (a)	28-52 569-544	62	30-32
IL-1 $\beta$ (M98820)	AGAAGAGCCCCTCCTCTGTGACTC (s) TCGACAATTGCTGCCTCGTGAC (a)	370-393 1150-1130	58	25
TNF- $\alpha$ (D00475)	TACTGAACTTCGGGGTGATTGGTCC (s) CAGCCTTGTCCTTGAAGAGAACC (a)	955-979 2180-2157	60	26
IL-12p40 (U16674)	GGAGAAACGGTGACCCTCACCTGTG (s) GGGTCCGGTTTGATGATGTCCCTG (a)	143-167 720-697	64	32
GAPDH (M17701)	CCTTCATTGACCTCAACTACATGGT (s) TCATTGTCATACCAGGAAATGAGCT (a)	131-155 974-950	58	20

Zur Validierung der semiquantitativen PCR-Methodik wurde in Vorversuchen von repräsentativen Proben - wie in Abb. 1 für die Analyse von GAPDH mRNA veranschaulicht - zunächst jeweils 20 ng RNA mit ansteigender Zyklenzahl amplifiziert, wobei jeweils die in der Mitte eines Bereiches exponentiell ansteigender relativer Bandenintensität gelegene Zyklenzahl als optimal angenommen wurde (Abb. 1A). Mit dieser Zyklenzahl wurden von 2,5 bis 80 ng zunehmende RNA-Mengen amplifiziert (Abb. 1B). Generell stellte sich hierbei eine lineare Zunahme der relativen Ban-

denintensität zwischen ca. 2,5 bis 40 ng eingesetzter Gesamt-RNA-Menge heraus. Somit waren über einen breiten Konzentrationsbereich lineare Amplifizierungsbedingungen sichergestellt.



*Abb.1: Validierung der semiquantitativen PCR-Methodik.*

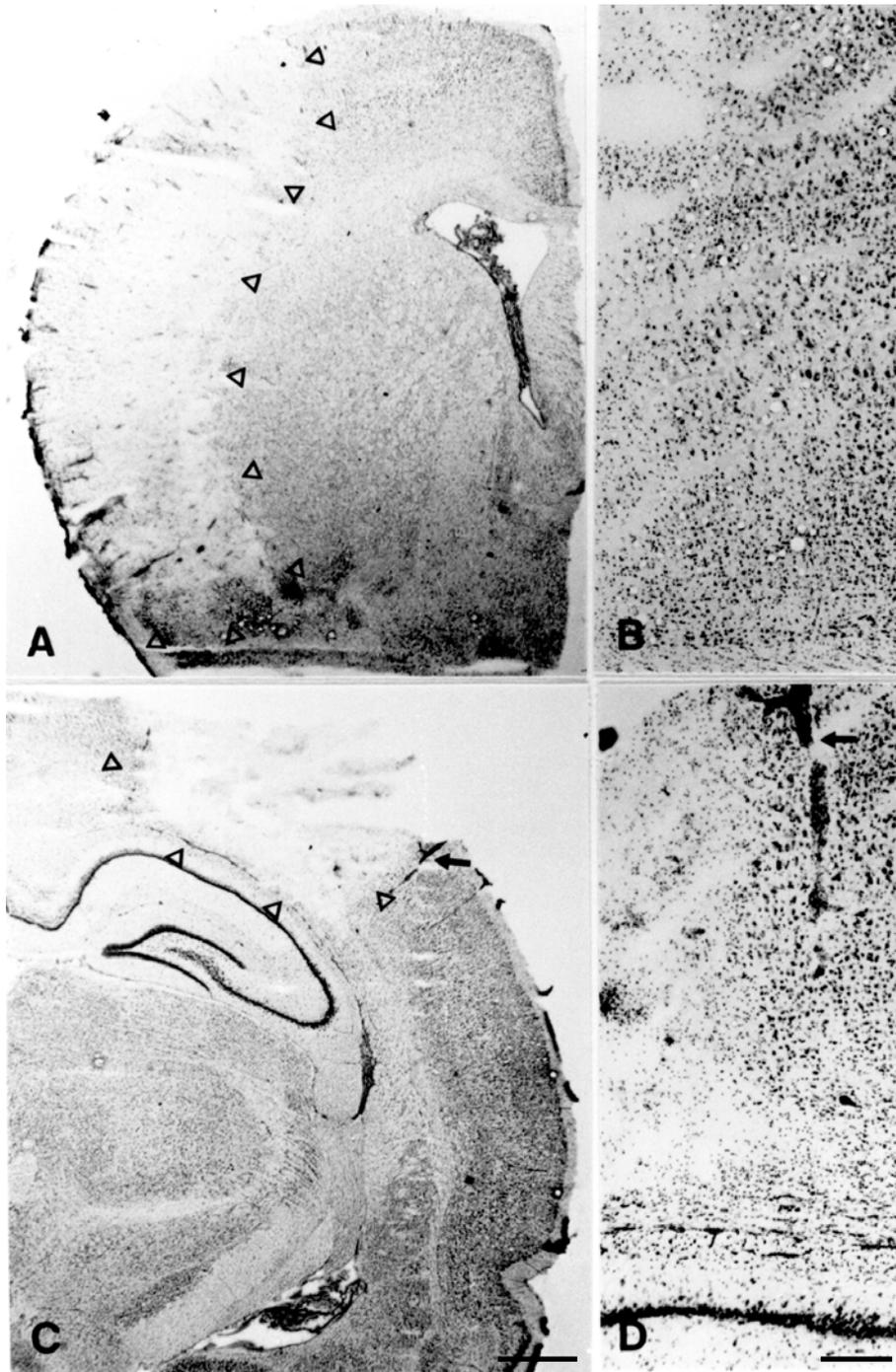
## 4. ERGEBNISSE

### 4.1. Zelluläre Infiltration in ischämischen Kortextläsionen

Fokale kortikale Ischämie führte im MCAO-Modell zur Entstehung großer, in ihrem Randbereich relativ unscharf und variabel zum umgebenden Kortex abgrenzbarer Läsionen (Abb.2 A,B). Demgegenüber lagen im Photothrombosemodell kleine, schärfer abgrenzbare Läsionen vor (Abb.2 C,D). Nichtläsionelle kortikale Areale im Photothrombosemodell wiesen keinerlei morphologisch faßbare neuronale Pathologie auf. Ab dem 3. Tag nach Ischämie kam es zu einer ausgeprägten Zunahme der Zellularität insbesondere im Randbereich der Läsionen. Im Verlauf der 2. Woche nahmen Volumen und Zellularität der Läsionen deutlich ab. 30 Tage nach Ischämie verblieben narbig abgeheilte, z.T. zystisch demarkierte Defekte.

Die Charakterisierung der entzündlichen Infiltratzellen erfolgte immunhistochemisch unter Verwendung monoklonaler Antikörper gegen etablierte Markerantigene der verschiedenen Leukozytensubpopulationen (vgl. S.16, Tab.1). Bezüglich der Zusammensetzung der Infiltrate ergaben sich in beiden Modellen weitgehend übereinstimmende Befunde, die im folgenden deshalb für beide Modelle gemeinsam dargestellt werden. Auf modellspezifische Besonderheiten, die in erster Linie das quantitative Ausmaß und den Zeitverlauf der Infiltration betrafen, wird jeweils lediglich kurz hingewiesen.

Als erste infiltrierende Zellen traten segmentkernige Granulozyten auf, die anhand ihrer typischen Kernmorphologie und durch den immunhistochemischen Nachweis des HIS48-Antigens identifiziert werden konnten (Abb.3 A,B). Bis zu 24 Stunden infiltrierten die Granulozyten überwiegend meningeal und wurden im Verlauf des zweiten Tages auch parenchymal infiltrierend in den Läsionen gefunden. Die



*Abb.2: Histopathologie kortikaler Infarkte 3 Tage nach fokaler Ischämie durch permanente distale MCAO (A,B) bzw. Photothrombose kortikaler Mikrogefäße (C,D) in der Kresylviolett-färbung. Die Pfeilköpfe in A und C markieren die Infarkttrandzone, die in B und D in stärkerer Vergrößerung gezeigt ist. Bei der MCAO liegt eine breitere Übergangszone zwischen infarziertem und intaktem Kortex vor, während die Photothromboseläsionen relativ scharf abgegrenzt sind.*

*Maßstäbe: 1mm in A und C, 300  $\mu$ m in B und D.*

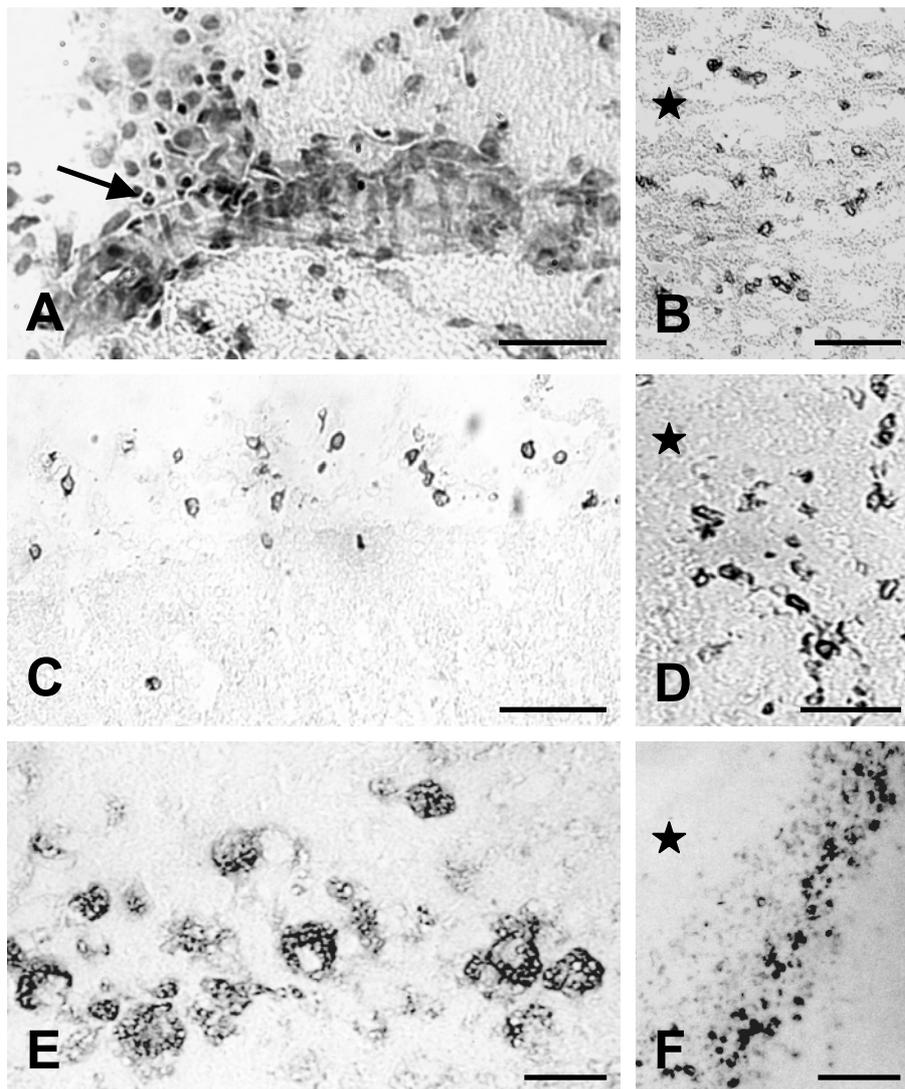


Abb.3: Entzündliche Infiltration in ischämischen Hirnläsionen. Kortikale Infarkte nach MCAO (A-D) bzw. Photothrombose (E,F) 24 Stunden (A,C), 2 Tage (B,D) bzw. 6 Tage (E,F) nach Ischämie. Kresylviolett-färbung zur Darstellung der Kernmorphologie segmentkerniger Granulozyten (Pfeil) in A. Immunhistochemische Darstellung von Granulozyten (mAb HIS48, B), CD5-positiven T-Zellen (C,D) bzw. ED-1-positiven Makrophagen (E,F). Im Frühstadium nach Ischämie finden sich Granulozyten und T-Zellen im Bereich der Hirnhäute an der Oberfläche der Läsionen (A,C). Zu späteren Zeitpunkten infiltrieren alle Zelltypen das Parenchym insbesondere im Übergangsbereich zwischen Infarktkern (Stern) und umgebendem normalen Kortex. Maßstäbe: 50  $\mu\text{m}$  in A, 100  $\mu\text{m}$  in B-D, 30  $\mu\text{m}$  in E, 300  $\mu\text{m}$  in F.

granulozytäre Infiltration persistierte in signifikantem Ausmaß bis Tag 3 und nahm danach deutlich ab.

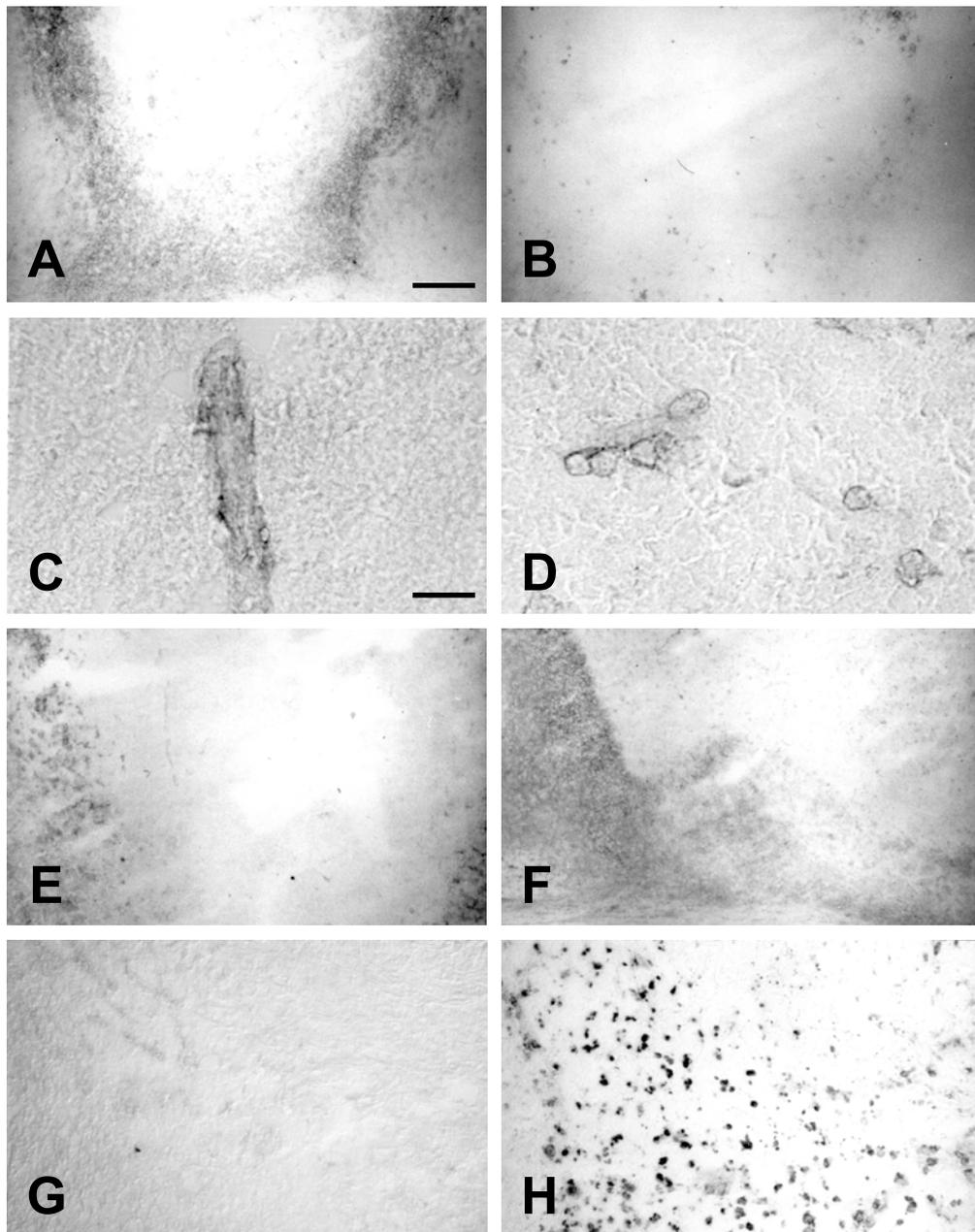
Zusätzlich kam es schon früh zur Infiltration von T-Zellen, die erstmals nach 24 Stunden nachweisbar waren, über die ganze erste Woche nach Ischämie persistierten und danach in ihrer Häufigkeit abnahmen (Abb. 3 C,D). Insgesamt war die T-Zellinfiltration bei der MCAO quantitativ stärker und länger anhaltend als bei der Photothrombose ausgeprägt. Die T-Zellen waren mit zwei unterschiedlichen ratten-spezifischen T-Zellmarkern [mAb 15-6A1 gegen ein unbekanntes Ratten-T-Zell-Oberflächenantigen; mAb R1-3B3 gegen den pan T-Zellmarker CD5 (Matsuura et al., 1993)] anfärbbar. Im Frühstadium fanden sich die T-Zellen überwiegend an der Hirnoberfläche in den Meningen (Abb. 3C). Ab dem 2. bis 3. Tag kam es dann zur Infiltration des Parenchyms, wobei eine Konzentration der Zellen in der Übergangszone zwischen infarziertem und umgebendem intakten Kortex festzustellen war (Abb. 3D). Zu keinem Zeitpunkt war eine T-Zellinfiltration in nichtinfarzierten Arealen der ipsi- oder kontralateralen Hemisphäre nachweisbar.

Im Vergleich zur Granulozyten- und T-Zellinfiltration traten Makrophagen mit einer gewissen zeitlichen Latenz auf und waren im MCAO-Modell erstmals nach 24 Stunden, bei der Photothrombose ab dem dritten Tag in signifikanter Anzahl nachweisbar. Ihr Nachweis erfolgte durch den Antikörper ED1 (Dijkstra et al., 1985) gegen ein phagolysosomales Antigen (Abb. 3 E,F), das sowohl von hämatogenen Makrophagen als auch phagozytisch aktivierten Mikrogliazellen exprimiert wird. In beiden Modellen nahm die Makrophageninfiltration nach dem dritten Tag massiv zu und zeigte in der ersten Woche ähnlich zur T-Zellinfiltration eine Konzentration im Randbereich der Läsionen (Abb. 3F). Erst im Verlauf der zweiten Woche wurde auch das Infarktzentrum vollständig durch Makrophagen infiltriert, wobei die Makrophageninvasion bei der MCAO insgesamt schneller als bei der Photothrombose verlief.

#### 4.2 Transiente Expression von Zelladhäsionsmolekülen und Immunaktivierungsmarkern in der Infarkttrandzone

Funktionelle Interaktionen zwischen immunkompetenten Zellen werden maßgeblich durch Antigene des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC) und Adhäsionsmoleküle wie dem ICAM-1 vermittelt (Altmann et al., 1989; Springer, 1990; Germain, 1994), die unter der Einwirkung proinflammatorischer Zytokine in hämatogenen Leukozyten und Endothelzellen, aber auch residenten Zellen des ZNS induzierbar sind (Vidovic et al., 1990; Panek und Benveniste, 1995; Neumann et al., 1997). In der vorliegenden Arbeit untersuchten wir deshalb die lokale Expression dieser Immunmoleküle in photochemisch und durch MCAO induzierten kortikalen Infarkten.

In der ersten Woche nach Ischämie kam es transient zur Expression von MHC Klasse I- und II-Antigenen (Abb. 4 A,B), wobei ähnlich zur Verteilung infiltrierender T-Zellen und Makrophagen überwiegend die Zellen in der Randzone des Infarktes positiv waren. Insgesamt war die Expression von MHC Klasse I-Antigenen stärker als die von Klasse II-Antigenen ausgeprägt. Bereits 24 Stunden nach Ischämie färbten sich Gefäße in der Läsion intensiv mit dem Antikörper 1A29 gegen das Adhäsionsmolekül ICAM-1 an (Abb. 4 C). Nach 2 bis 3 Tagen waren darüberhinaus zahlreiche infiltrierende Leukozyten in der Randzone ICAM-1-positiv (Abb. 4, D-F). Dagegen waren Makrophagen im nekrotischen Läsionskern in der zweiten Woche nach Ischämie stets ICAM-1-negativ (Abb. 4 G,H).



*Abb.4: Expression von MHC Klasse I (A), II(B) und ICAM-1 (C-G) nach kortikaler Photothrombose. 5 Tage nach Ischämie exprimieren zahlreiche Zellen in der Grenzzone des Infarktes MHC Klasse I, während weniger Zellen auch MHC Klasse II-positiv sind. C zeigt ein ICAM-1-positives Gefäß 1 Tag nach Photothrombose. Nach 3 (D,E) bzw. 6 (F) Tagen fand sich ICAM-1-Reaktivität auch auf infiltrierenden Zellen in der Randzone der Läsionen. Nach 14 Tagen fand sich hingegen keine ICAM-1-Expression mehr (G) trotz massiver Infiltration des Infarktes durch ED1-positive Makrophagen (H). Maßstäbe: 300  $\mu\text{m}$  in A,B,E-H, 30  $\mu\text{m}$  in C.*

#### 4.3 Zeitlich-räumliche Koinzidenz von Immunaktivierung und verzögertem apoptotischen Zelltod

Da inflammatorische Mediatoren eine Rolle bei der Induktion apoptotischen Zelltods spielen (D'Souza et al., 1995; Talley et al., 1995), analysierten wir die zeitlich-räumliche Beziehung zwischen entzündlicher Infiltration und verzögert auftretendem Zelltod im Photothrombose-Modell. Apoptotische Zellen wurden durch TUNEL-Technik detektiert (Gavrieli et al., 1992). Zusätzlich wurden die apoptosetypischen Kernveränderungen (Chromatinmarginalisierung und -fragmentierung) durch Kernfärbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff 4',6-Diamidino-2-phenyl-Indolyldihydrochlorid (DAPI) sichtbar gemacht. Zur zellulären Kolo-kalisation wurde eine Doppeldetektion mit TUNEL-Markierung und anschließender immunzytochemischer Färbung infiltrierender T-Zellen durchgeführt.

Während der ersten 24 Stunden nach Ischämie fand sich eine Vielzahl TUNEL-positiver Zellen im Bereich des gesamten ischämischen Fokus. Zwischen dem 2. und 6. Tag nach Ischämie kam es im Läsionszentrum zur Abnahme TUNEL-positiver Zellen, während sie in der Übergangszone zum umgebenden nichtischämischen Kortex parallel zur Verteilung infiltrierender T-Zellen und Makrophagen weiterhin zahlreich zu finden waren (Abb. 5 A,B). In der zweiten Woche nach Ischämie stellten sich hingegen kaum noch TUNEL-positive Zellen dar (Abb. 5C). TUNEL-positive Zellen wiesen in der DAPI-Färbung die apoptosetypischen Veränderungen der Kernmorphologie auf (Abb. 5 D,E). Doppelmarkierungsexperimente zeigten eine oft enge räumliche Beziehung zwischen infiltrierenden T-Lymphozyten und TUNEL-positiven apoptotischen Zellen in der Randzone des Infarktes (Abb. 6 A,B). Im Unterschied zu Autoimmunmodellen wie der EAE, bei der die Apoptose von T-Zellen wesentlich zur Spontanlimitierung des Entzündungsprozesses beiträgt (Schmied et al., 1993), waren die T-Zellen bei der Ischämie zu allen untersuchten Zeitpunkten stets TUNEL-negativ, d.h. fielen nicht der Apoptose anheim.

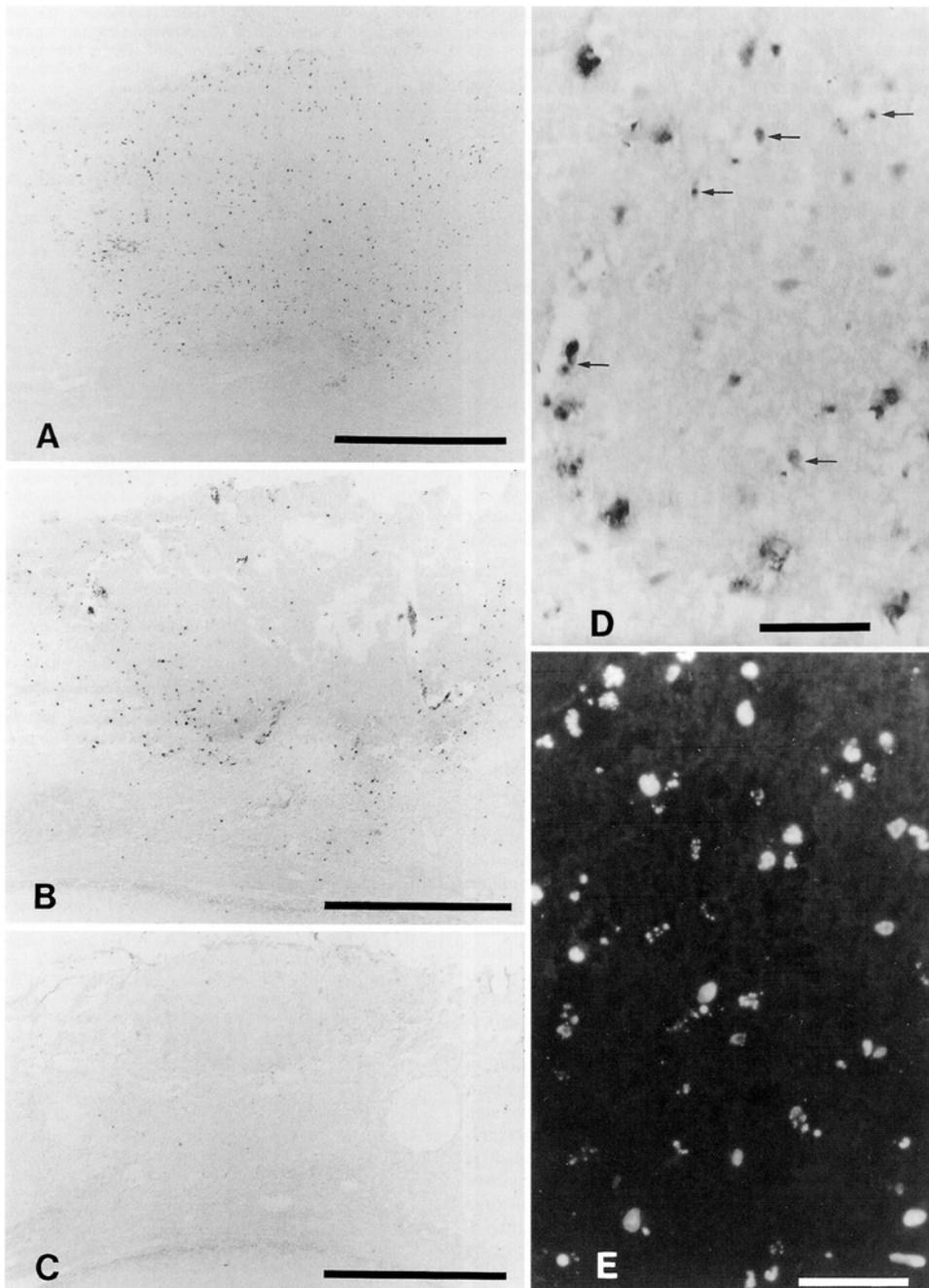
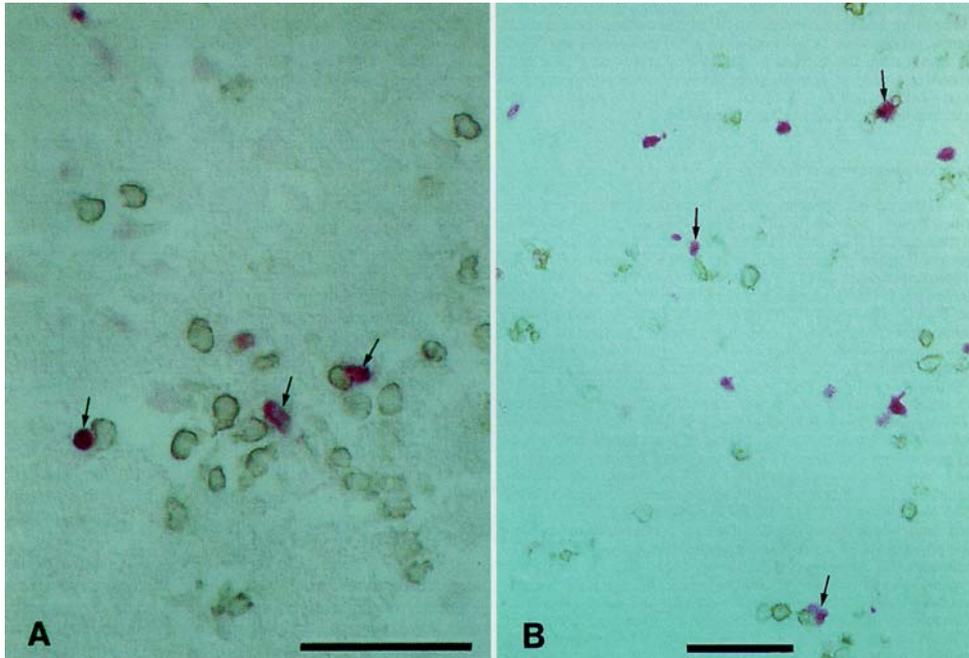


Abb.5: TUNEL-Färbung photochemisch induzierter kortikaler Infarkte 3 (A,D,E), 6 (B) und 14 (C) Tage nach Ischämie. An Tag 3 finden sich zahlreiche TUNEL-positive Zellen im Zentrum und in der Randzone des Infarktes (A). Am Tag 6 sind die apoptotischen Zellen überwiegend in der Randzone lokalisiert (B). Am Tag 14 sind keine TUNEL-positiven Zellen mehr nachweisbar (C). TUNEL-positive Zellen (Pfeile in D) weisen oft die apoptose-typische Kernfragmentierung in der DAPI-Färbung (E) auf. Maßstäbe: 1 mm in A-C, 50  $\mu$ m in D und E.



*Abb.6: Räumliche Beziehung zwischen T-Zellen (braun) und apoptotischen Zellen (rot) in der Randzone einer photothrombotisch induzierten Läsion 1 (A) und 3 (B) Tage nach Ischämie. TUNEL-positive Zellen finden sich oft in unmittelbarem Kontakt zu infiltrierenden T-Zellen, die aber selbst TUNEL-negativ sind, d.h. nicht apoptotischem Zelltod anheimfallen. Maßstäbe: 50  $\mu$ m in A und B.*

#### 4.4 Der differentielle Beitrag residenter Mikroglia und hämatogener Makrophagen zur postischämischen Phagozytenreaktion

Residente Mikroglia ist in Schnitten normaler Gehirne durch Anfärbung des CD11b-Antigens identifizierbar und weist eine charakteristische verzweigte Morphologie auf. Phagozytisch transformierte Mikrogliazellen nehmen demgegenüber eine amoeboid-rundliche Form an und exprimieren zahlreiche Aktivierungsmarker, zu denen auch das phagolysosomale ED1-Antigen zählt (Flaris et al., 1993). Da hämatogene Makrophagen weitgehend identische Markerantigene exprimieren, ist die Unterscheidung beider Zelltypen in den ischämischen Läsionen *in situ* anhand immunhistochemischer Kriterien nicht möglich. Zur Klärung des differentiellen Beitrags beider Zellpopulationen zur Makrophagenantwort nach Photothrombose nutzten wir deshalb die Liposomen-vermittelte Makrophagendepletionstechnik nach van Rooijen et al. (1984), die Makrophagen im Blut und in den lymphatischen Organen effektiv eliminiert, residente Mikroglia des ZNS aber unbeeinflusst läßt (Bauer et al., 1995). Als Maß phagozytischer Aktivierung in den Läsionen wurden ED1-positive Zellen durch Planimetrie infiltrierter Areale in Relation zur Gesamtläsionsfläche auf Koronarschnitten durch das Zentrum der Läsionen quantifiziert. Das Ausmaß der Makrophagendepletion wurde bei allen Tieren durch Färbung ED1-positive Makrophagen in der Milz überprüft (Abb.7 C,F). In Übereinstimmung mit Befunden von van Rooijen et al. (1990) stellte sich in Vorversuchen heraus, daß eine Liposomeninjektion mit zweitägiger Latenz zur effektiven peripheren Makrophagendepletion führte und durch zwei weitere sequentielle Injektionen in zweitägigem Abstand über maximal 8 Tage zu gewährleisten war. Aufgrund toxischer Effekte waren erneute Liposomeninjektionen hiernach nicht möglich. In den Ischämiexperimenten wurden die Liposomeninjektionen deshalb zwei Tage vor, am Tag der Photothrombose selbst und zwei Tage später vorgenommen und die immunhistochemische Analyse ED1-positiver Zellen am Tag 1 (n=3), 3 (n=6) und 6 (n=3) durchgeführt.

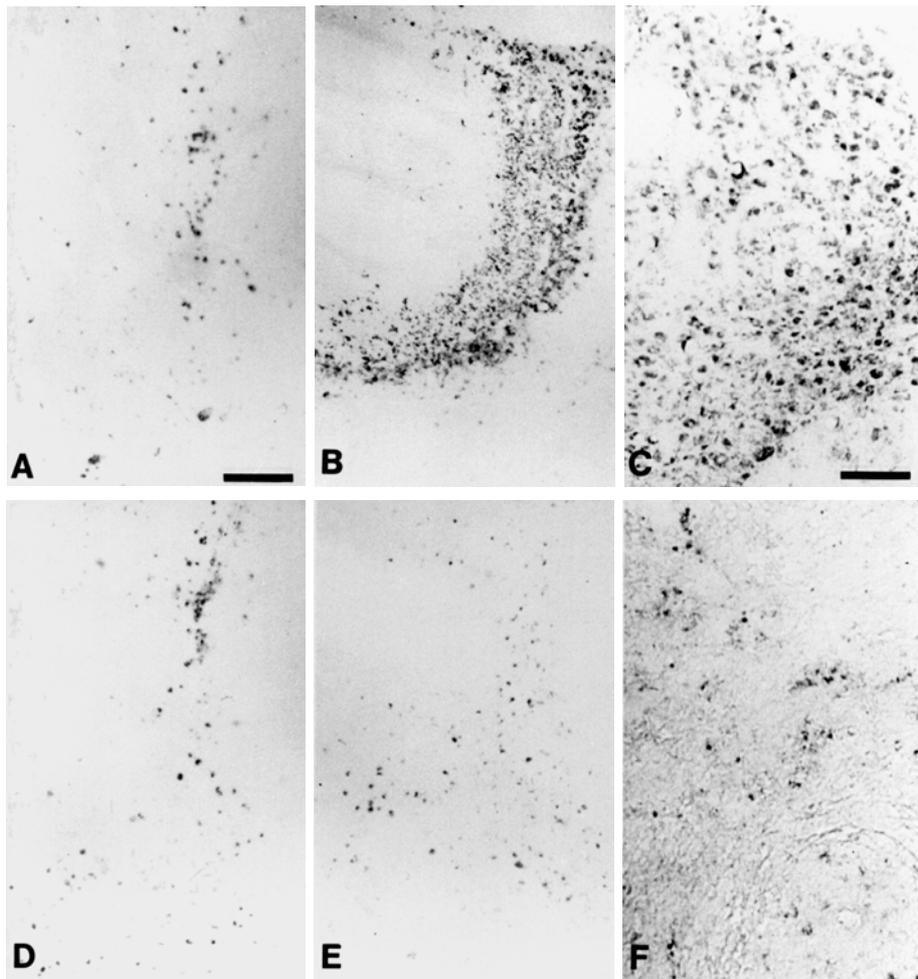
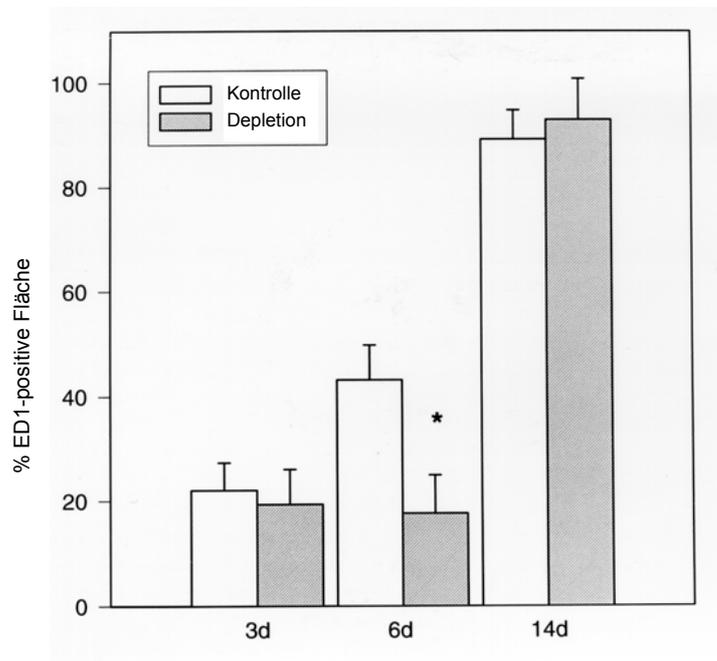


Abb.7: Verteilung ED1-positiver Mikroglia/Makrophagen in der Randzone photochemisch induzierter Infarkte 3 (A,D) und 6 (B,E) Tage nach Ischämie. A,B: Läsionen nichtdepletierter Kontrollratten. D,E: Läsionen von Tieren nach Depletion peripherer Makrophagen und Monozyten durch i.v. Injektion  $Cl_2MDP$ -gefüllter Liposomen. Das Läsionszentrum findet sich jeweils in der linken Bildhälfte. Am Tag 3 besteht kein Unterschied in der Dichte ED1-positiver Zellen zwischen nichtdepletierten (A) und depletierten (D) Tieren, so daß die Phagozytenreaktion bis zu diesem Zeitpunkt überwiegend durch Aktivierung residenter Mikroglia vonstatten geht. Am Tag 6 finden sich in den Läsionen von Kontrolltieren (B) hingegen signifikant mehr ED1-positive Zellen als in Makrophagen-depletierten (E) Tieren, was auf eine Rekrutierung peripherer Makrophagen in die Läsionen bei nichtdepletierten Tieren zwischen dem 3. und 6. Tag hinweist. C: Normale Dichte ED1-positiver Makrophagen in der Milz eines Kontrolltieres. F: Die Milz eines depletierten Tieres am Tag 3 nach Photothrombose ist hingegen weitgehend frei von ED1-Immunreaktivität. Maßstäbe: 250  $\mu m$  in A,B,D,E; 100  $\mu m$  in C und F.

ED-1-positive Zellen fanden sich am dritten Tag nach Ischämie in mäßigem Ausmaß in der Randzone der Läsionen, wobei kein Unterschied zwischen depletierten und nichtdepletierten Tieren bestand (Abb. 7 A,D). Zwischen dem dritten und sechsten Tag kam es in nichtdepletierten Kontrollen zu einer starken Zunahme ED1+ Zellen, die bei makrophagendepletierten Tieren hingegen ausblieb (Abb. 7 B,E). Dieses Ergebnis konnte durch planimetrische Quantifizierung der durch ED1-positive Zellen infiltrierten Areale bestätigt werden (Abb. 8).



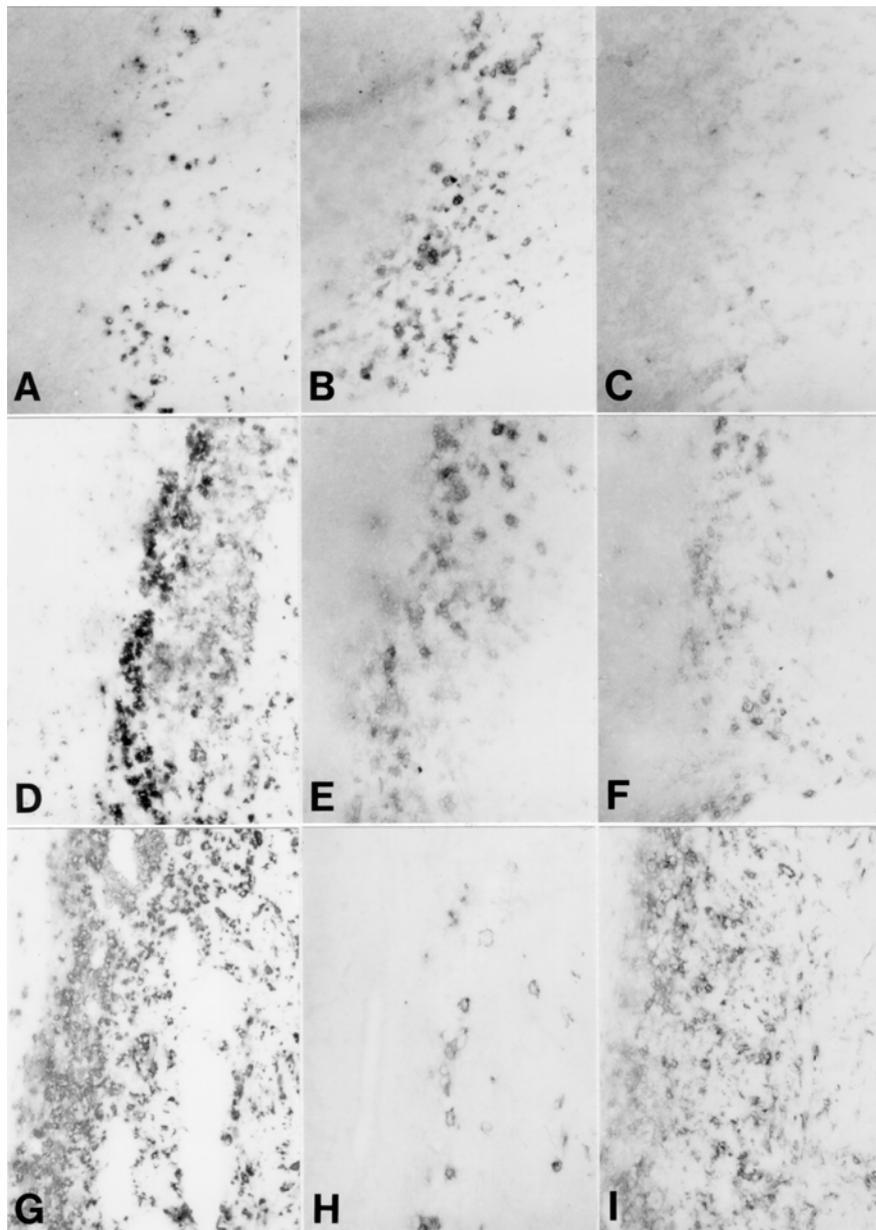
**Abb.8:** Quantifizierung ED1-positiver Areale nach Photothrombose. Der prozentuale Anteil ED1-positiver Fläche an der gesamten Infarktfläche wurde in Kontrolltieren und  $Cl_2MDP$ -Liposomen-behandelten Tieren 3, 6 und 14 Tage nach Ischämie planimetrisch bestimmt. Die Säulen geben jeweils den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung an. \*Statistische Signifikanz im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $p < .00001$ ).

Insgesamt zeigen diese Befunde, daß die Phagozytenantwort innerhalb der ersten 3 Tage überwiegend durch aktivierte residente Mikroglia getragen wurde, während hämatogene Makrophagen erst hiernach in signifikantem Ausmaß in die Läsionen infiltrierten. Die Infarktgröße wurde durch computergestützte Volumetrie serieller, 20 µm dicker Cryostatschnitte durch das Infarktareal bestimmt und zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontrolltieren und depletierten Tieren ( $18,3 \pm 6,6$  vs.  $14,3 \pm 6,3$  mm<sup>3</sup> am Tag 3;  $13,4 \pm 3,7$  vs.  $15,1 \pm 5,1$  mm<sup>3</sup> am Tag 6).

#### 4.5 Die differentielle Expression von CD4 und CD8 auf Makrophagen-Subpopulationen in ischämischen Läsionen

Zur weiteren Typisierung der zellulären Infiltrate wurden die Läsionen mit verschiedenen monoklonalen Antikörpern (mAb) gegen CD4 und CD8-Antigene gefärbt (vgl. Tab. 1). Beide Moleküle waren bislang im wesentlichen als akzessorische T-Zell-Oberflächenmoleküle bekannt gewesen (Janeway, Jr. 1992). Das CD4-, nicht aber das CD8-Antigen wurde darüberhinaus auch auf Makrophagen beschrieben (Wood et al., 1983; Jeffries et al., 1985). Das dimere CD8-Molekül wird entweder als aus 2  $\alpha$ -Ketten bestehendes Homodimer oder als  $\alpha\beta$ -Heterodimer exprimiert. In der Ratte war das Heterodimer bislang ausschließlich auf zytotoxischen T-Zellen gefunden worden, während das CD8 $\alpha\alpha$ -Homodimer auch auf aktivierten CD4+ Helferzellen, Natürlichen Killer-Zellen (NK-Zellen) und intestinalen intraepithelialen Lymphozyten beschrieben worden war (Lawetzky et al., 1990; Torres-Nagel et al., 1992).

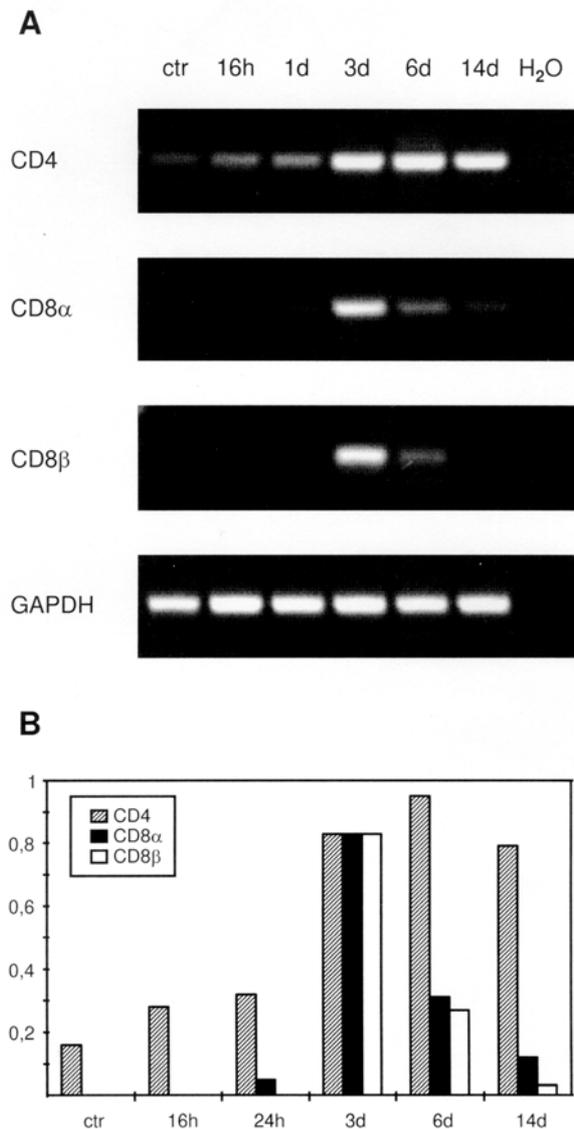
Hinsichtlich des Zeitverlaufs und der Verteilung der CD4- und CD8-Expression ergaben sich im MCAO- bzw. Photothrombosemodell weitgehend übereinstimmende Befunde. Bereits 2 bis 3 Tage nach Ischämie ließen sich mit dem mAb Ox-8 gegen die  $\alpha$ -Kette des CD8-Antigens (Barclay, 1981; Johnson et al., 1985) zahlreiche infiltrierende Zellen in der Randzone der Infarkte nachweisen (Abb.9B). Mit dem



*Abb.9: Differentieller Zeitverlauf der CD8 und CD4-Expression in der Randzone photochemisch induzierter Läsionen. Koronare Serienschritte durch das Läsionszentrum am Tag 3 (A-C), 6 (D-F) und 14 (G-I) nach Ischämie. Immunfärbung für ED1-positive Makrophagen (A,D,G), CD8 (B,E,H) und CD4 (C,F,I). Der nekrotische Infarktkern befindet sich jeweils in der rechten Bildhälfte. ED1-positive Makrophagen und CD4-positive Zellen zeigen eine kontinuierliche Zunahme bis zum 14. Tag nach Ischämie. CD8-positive Zellen sind am Tag 3 und 6 zahlreich, am Tag 14 hingegen nur spärlich vorhanden. Vergrößerung in A-I: x80.*

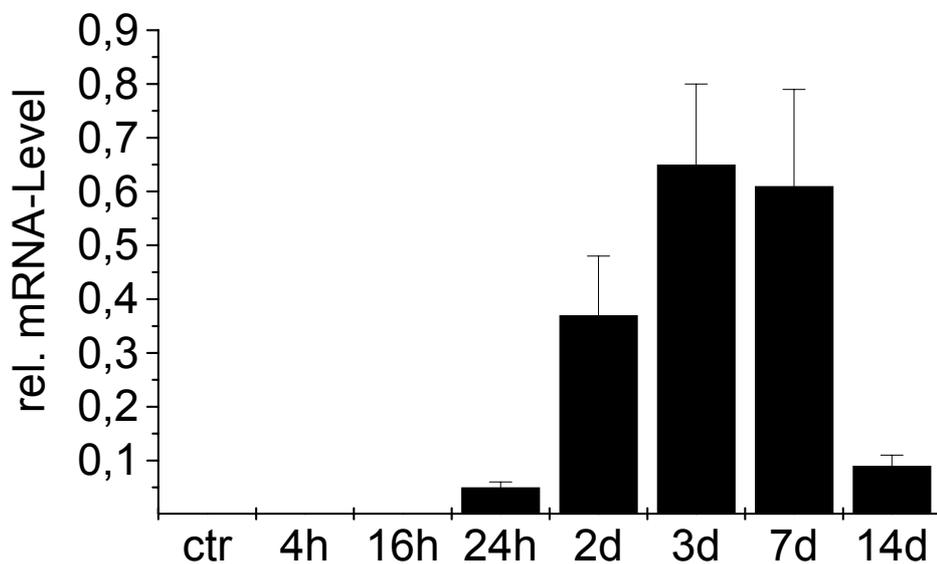
zusätzlich verwendeten mAb R1-10B5 gegen ein anderes Epitop des CD8 $\alpha$ -Moleküls (Matsuura et al., 1993) und dem mAb 341 gegen die CD8 $\beta$ -Kette (Torres-Nagel et al., 1992) erhielt man insgesamt identische Anfärbungen. CD8 $\alpha/\beta$ -positive Zellen persistierten in signifikantem Ausmaß bis zu Tag 6 nach Ischämie (Abb. 9E) und nahmen danach deutlich ab (Abb. 9H). Im Gegensatz dazu fanden sich bis zum 3.Tag nach Ischämie nur wenige CD4-positive Zellen (Abb. 9C), die dann bis zum 14. Tag kontinuierlich zunahm (Abb. 9 F,I). In der ersten Woche zeigten sowohl CD4+ als auch CD8+ Zellen eine dem ED1-Expressionsmuster (Abb. 9 A,D,G) vergleichbare räumliche Anordnung in der Randzone der Infarktes. In der zweiten Woche kam es zur massiven Infiltration des Läsionskerns durch ED1- und CD4-positive Zellen (Abb. 9 G,I), während die Expression des CD8-Antigens auch in diesem späteren Stadium weitgehend auf die Randzone beschränkt blieb (Abb. 9H). Bezüglich des Expressionsmusters von CD4- und CD8-Antigenen bestand kein prinzipieller Unterschied zwischen dem Photothrombose- und dem MCAO-Modell.

Die immunhistochemischen Daten wurden auf Ebene der mRNA-Expression durch semiquantitative Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR) weiter erhärtet. Hierzu wurde Gesamt-RNA aus den Läsionen revers transkribiert und mit CD4- sowie CD8 $\alpha$ - und  $\beta$ -spezifischen Primern amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt, mit Ethidiumbromid gefärbt (Abb. 10A), densitometrisch quantifiziert und zum parallel erhaltenen Signal des im Verlauf nach Ischämie nicht modulierten "housekeeping"- Gens Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) in Beziehung gesetzt (Abb.10B). Die so erhaltenen semiquantitativen Werte wurden als relatives Maß der jeweiligen Genexpression in den ischämischen Läsionen verwendet. Im Kortex unbehandelter Kontrolltiere fand sich eine signifikante Expression von CD4, nicht aber CD8 $\alpha$  oder  $\beta$  mRNA. In Übereinstimmung mit den immunhistochemischen Ergebnissen wurde in photothrombotischen Läsionen ab dem dritten Tag die mRNA für die CD8  $\alpha$  und  $\beta$  Kette



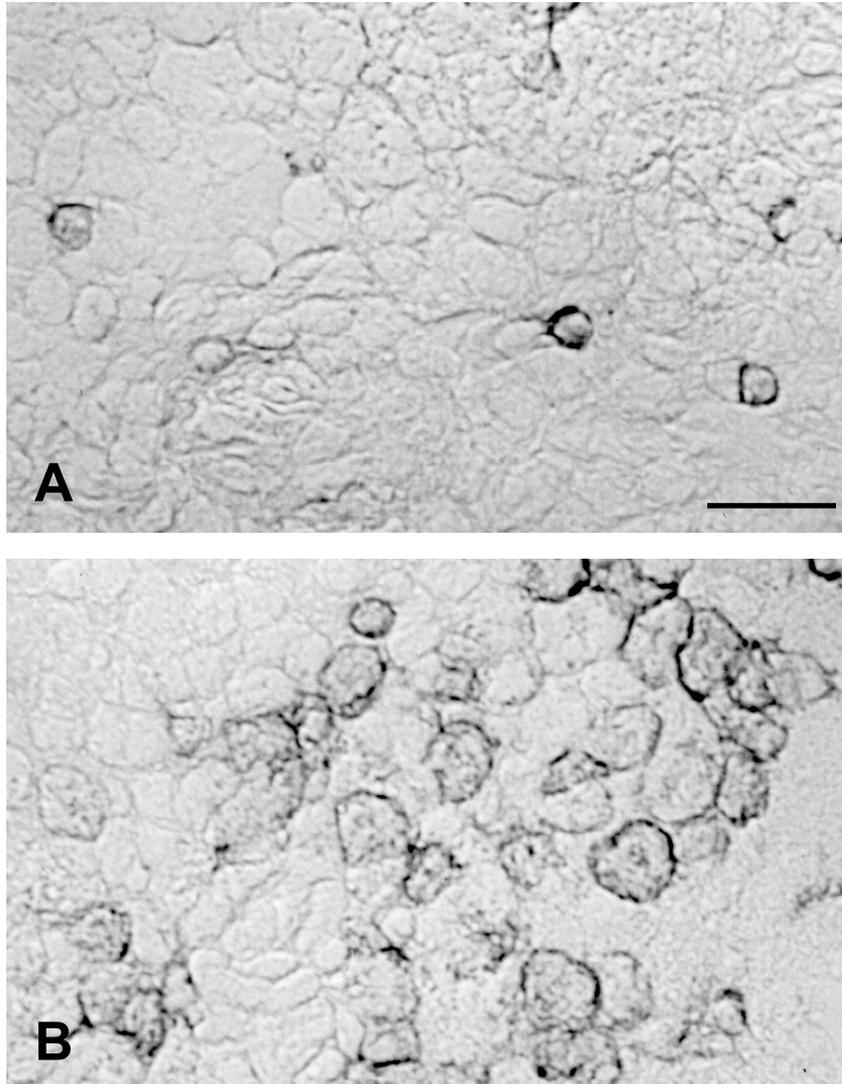
**Abb.10: Semiquantitative RT-PCR-Analyse des Expressionszeitverlaufs von CD4 und CD8  $\alpha/\beta$  mRNA in photothrombotisch induzierten Infarkten 16 und 24 Stunden sowie am Tag 3, 6 und 14 nach Ischämie. A: Repräsentative Original-PCR-Befunde im Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegel. B: Densitometrische Analyse der Bandenintensitäten in Relation zum ‚housekeeping‘-Gen GAPDH. Analog zur Immunhistochemie findet sich eine kontinuierliche Zunahme der CD4-Expression bis zu Tag 14, während die Expression von CD8  $\alpha$  und  $\beta$  mRNA nach dem 3. Tag deutlich rückläufig ist. (aus Jander et al., 1998)**

herauf- und ab dem 6. Tag wieder drastisch herunterreguliert. Kontrastierend wurde CD4 mRNA erst am 6. Tag maximal induziert und persistierte in der zweiten Woche auf anhaltend hohem Niveau. In durch MCAO induzierten Infarkten zeigte sich ein im wesentlichen identischer Zeitverlauf der CD8 $\alpha$  mRNA-Expression (Abb. 11).



*Abb.11: Semiquantitative Bestimmung der CD8 $\alpha$  mRNA-Level nach MCAO in Relation zur Expression des „housekeeping“-Gens GAPDH. Abgebildet sind jeweils die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von 5 Tieren pro Zeitpunkt.*

Zu allen untersuchten Zeitpunkten waren CD8-positive Zellen in den ischämischen Läsionen wesentlich zahlreicher als CD5-positive T-Zellen, die außerdem zumeist eine nicht überlappende Verteilung in der Randzone ischämischer Läsionen aufwiesen (Abb. 12 A,B). Somit konnten die CD8-positiven Zellen größtenteils keine T-Zellen darstellen. Basierend auf der bekannten Verteilung des CD8-Antigens bei der Ratte kamen NK-Zellen als alternative Kandidaten in Betracht, wenn auch die Koexpression des CD8 $\beta$ -Antigens eher gegen diese Zuordnung sprach. Als spezifischer NK-Zellmarker war zuletzt das NKR-P1-Antigen etabliert worden (Chambers et al., 1989). Mit dem gegen das Rattenhomolog dieses Moleküls gerichteten mAb 3.2.3 waren zu keinem Zeitpunkt NK-Zellen in den ischämischen Läsionen nachweisbar. Zur weiteren zellulären Identifizierung wurden anschließend Doppelfluoreszenzfärbungen mit dem CD8-spezifischen mAb Ox-8 und verschiedenen Makrophagenmarkern durchgeführt und mittels konfokaler Lasermikroskopie analysiert. Hierbei fand sich eine weitgehende Kolo-kalisation des CD8-Antigens mit dem CD11b-Marker, der auf Makrophagen und Granulozyten vorkommt (Robinson et al., 1986) (Abb. 13 A-F), und dem ED1-Antigen, das spezifisch für phagozytische Makrophagen/Mikroglia ist (Dijkstra et al., 1985) (Abb.14A). Weitere Doppelfärbungen zeigten keine Kolo-kalisation des CD8-Antigens mit dem Granulozyten-Marker HIS48 (Abb. 14B). Somit stellen die CD8<sup>+</sup> Zellen in den ischämischen Läsionen eine erstmals beschriebene, spezifisch differenzierte Makrophagenpopulation dar. Zu allen Zeitpunkten waren darüberhinaus CD4 und CD8 auf unterschiedlichen Zellen lokalisiert (Abb.13I). Die Expression von CD4 und CD8 differenzierte somit zwei unterschiedliche Makrophagensubpopulationen.



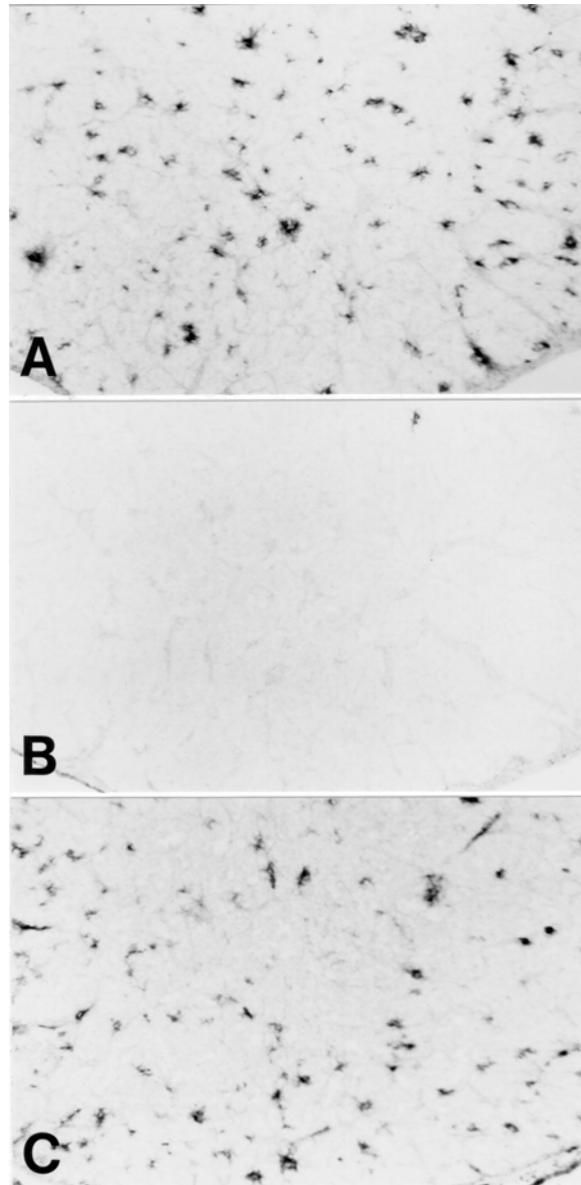
*Abb.12: Unterschiedliche Morphologie und Verteilung CD5-positiver T-Zellen (A) und CD8-positiver Zellen in der Randzone eines photochemisch induzierten Infarktes 5 Tage nach Ischämie. Im Vergleich zu CD5-positiven T-Zellen sind CD8-positiv Zellen im Mittel deutlich größer und weisen eine höhere Dichte auf. Maßstab: 30  $\mu\text{m}$  in A und B.*





#### 4.6 Abwesenheit von CD8-positiven Makrophagen in autoimmunen und degenerativen Läsionsparadigmen des ZNS

Angesichts des überraschenden Befundes einer Subpopulation CD8-positiver Makrophagen in ischämischen Läsionen wurde untersucht, ob diese Zellen auch in autoimmunen (EAE) und degenerativen (Wallersche Degeneration) Läsionen des ZNS vorkommen. Mittels Doppelimmunfluoreszenztechnik fanden wir bei der EAE einzelne CD8-positive Zellen, die überwiegend kleinen, perivaskulär lokalisierten Lymphozyten entsprachen (Abb. 13H). Das Makrophagenantigen CD11b wurde hingegen auf zahlreichen infiltrierenden Zellen und auf parenchymaler Mikroglia exprimiert, wobei nur ausnahmsweise CD11b/CD8-doppelt-positive Zellen, d.h. CD8-positive Makrophagen, vorkamen. Nur mit einer sehr sensitiven Immunperoxidasetechnik fand sich zusätzliche CD8-Reaktivität auf parenchymal gelegenen, ansatzweise verzweigten Zellen, die morphologisch aktivierter Mikroglia entsprachen. Im Verlauf der Wallerschen Degeneration nach Optikusaxotomie fand sich eine Infiltration des distalen Nervenabschnittes durch ED1-positive Makrophagen (Abb.15A), die von der Induktion des CD4 Antigens begleitet war (Abb.15C). Auf einer Vielzahl untersuchter Schnitte fanden sich hingegen nur ganz vereinzelt CD8-positive Zellen (Abb.15B). Zusammenfassend zeigten unsere Befunde also sowohl bei der EAE als auch bei der Wallerschen Degeneration keine wesentliche Infiltration CD8-positiver Makrophagen, die somit als spezifisches Merkmal der postischämischen Phagozytenreaktion anzusehen ist.

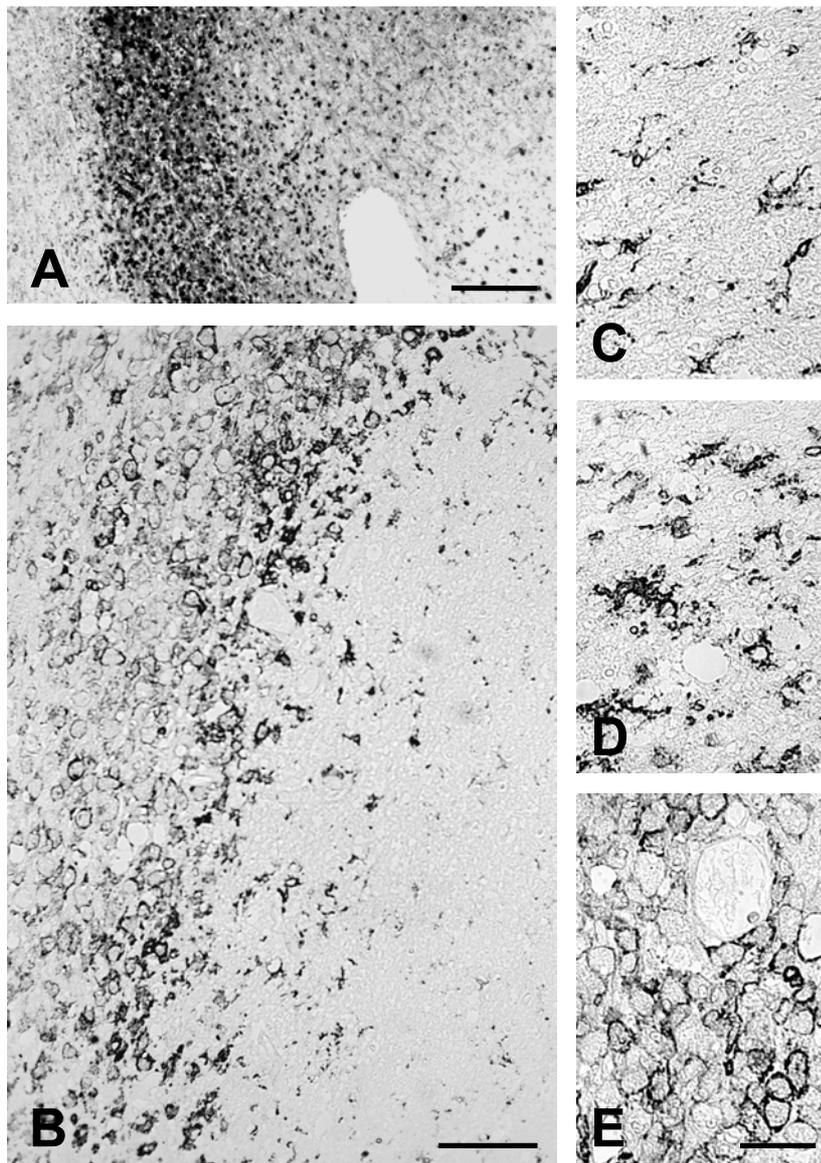


*Abb.15: CD8- und CD4-Expression im Verlauf der Wallerschen Degeneration nach intraorbitaler Quetschläsion des N. opticus. Immunhistochemische Färbung 8 Tage nach Läsion für ED1-positive Phagozyten (A), CD8 (B) und CD4 (C). Aktivierte Phagozyten exprimieren ED1 und CD4, aber kein CD8-Antigen. Vergrößerung in A-C: x80.*

#### 4.7 Die Entzündungsreaktion beim humanen Hirninfarkt

Zur Validierung der experimentellen Befunde im klinischen Kontext wurden Autopsiepräparate subakuter humaner Hirninfarkte untersucht, die über eine Kooperation mit Herrn PD Dr. Brück, Institut für Neuropathologie, Georg-August-Universität Göttingen, zur Verfügung standen. Die immunhistochemische Methodik zur Detektion der Markerantigene CD68 (mAb KP1) für Makrophagen und CD3 für T-Zellen sowie der funktionellen Aktivierungsmarker MHC Klasse II, ICAM-1 und VCAM-1 wurde in Vorversuchen an Paraffinschnitten humaner Lymphknoten etabliert. Insgesamt konnten unsere Untersuchungen an den humanen Hirninfarkten wesentliche Aspekte der tierexperimentellen Befunde bestätigen.

In sämtlichen untersuchten Präparaten fand sich eine ausgeprägte Aktivierung von Makrophagen und Mikrogliazellen (Abb.16). Insbesondere im Infarktbereich stand hierbei eine Infiltration KP-1-positiver runder Makrophagen im Vordergrund, während die Expression des KP-1-Antigens in der Umgebung der Infarkte nur gering ausgeprägt war (Abb.16A). Im Unterschied hierzu wurden MHC Klasse II-Antigene generell auch im unmittelbar der Läsion benachbarten nichtinfarzierten Kortex exprimiert (Abb.16, B-E). MHC Klasse II-positive Zellen wiesen dort die typische verzweigte Morphologie ruhender Mikrogliazellen auf (Abb.16 B,C). Zum Infarkt hin kam es typischerweise zur graduellen Zunahme der MHC Klasse II-Immunreaktivität, die ihr Maximum auf aktivierten Mikrogliazellen in der Infarkttrandzone erreichte (Abb.16 B,D). Makrophagenähnliche Zellen im Infarktkern waren hingegen insgesamt schwächer MHC Klasse II-positiv (Abb.16 B,E).

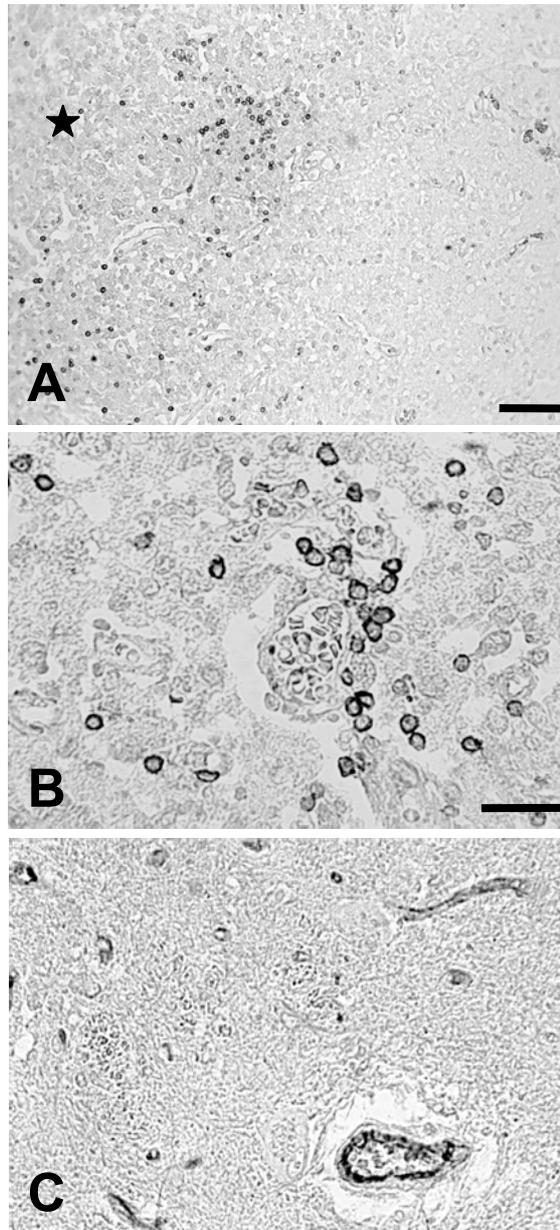


*Abb.16: Mikroglia-/Makrophagenaktivierung in einem humanen Hirninfarkt (Autopsiepräparat) 6 Tage nach Ischämie. Immunfärbung für phagozytische Makrophagen (mAb KP1, A) bzw. MHC Klasse II-Antigen auf aktivierten Makrophagen und Mikrogliazellen (B-E) . Die Expression des KP1-Antigen ist weitgehend auf das Infarktareal und seine direkte Randzone beschränkt (A). MHC Klasse II-Antigen wird hingegen auch auf verzweigter Mikroglia in der Umgebung des Infarktes exprimiert (B,C). Zum Infarkt hin kommt es zur graduellen Zunahme der MHC Klasse II-Immunreaktivität, die auf aktivierter Mikroglia in der Randzone insgesamt am stärksten exprimiert wird (B,D). Rundliche Makrophagen im Läsionszentrum sind hingegen überwiegend schwächer MHC Klasse II-positiv (B,E).*

*Maßstäbe: 150  $\mu$ m in A, 100  $\mu$ m in B, 50  $\mu$ m in C-E.*

In Übereinstimmung mit den tierexperimentellen Befunden waren in sämtlichen untersuchten humanen Infarkten CD3-positive T-Zellen nachweisbar. Obwohl das vorliegende Autopsiematerial keine umfassende quantitative Analyse zuließ, schienen die T-Zellen in späteren Stadien (ab dem Ende der ersten Woche) insgesamt zahlreicher als in den ersten Tagen nach Ischämie. Parallel zur Verteilung der MHC Klasse II-Immunreaktivität war die T-Zellinfiltration dabei im Übergangsbereich zum intakten Gewebe am ausgeprägtesten (Abb.17 A,B). Die Zellen fanden sich hier sowohl diffus im Parenchym infiltrierend (Abb.17A) als auch in Form kleinerer perivaskulärer Ansammlungen (Abb.17B).

In mehreren Präparaten konnten wir auf Gefäßen Immunreaktivität für die Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 nachweisen (Abb.17C, Abb.18A,B). Insgesamt war die Expression im Infarkttrandbereich am stärksten und damit parallel zur zellulären Infiltration verteilt. Im Einzelfällen gelang der Nachweis VCAM-1-positiver Gefäße, die auf benachbarten Serienschnitten ausgeragte perivaskuläre Infiltrate KP-1-positiver Makrophagen aufwiesen (Abb.18B,C).



*Abb.17: T-Zellinfiltration (A,B) und ICAM-1 (C)-Expression in humanen Hirninfarkten 14 (A,B) bzw. 7 (C) Tage nach Insultereignis. CD3-positive T-Zellen finden sich überwiegend in der Randzone des Infarktareals (der Stern in A markiert den Infarktkern). Bei stärkerer Vergrößerung erkennt man die z.T. typische perivaskuläre Anordnung infiltrierender T-Zellen. C: ICAM-1-Expression auf einem größeren Gefäß und auf mehreren kapillären Mikrogefäßen.*

*Maßstäbe: 100  $\mu$ m in A, 50  $\mu$ m in B und C.*

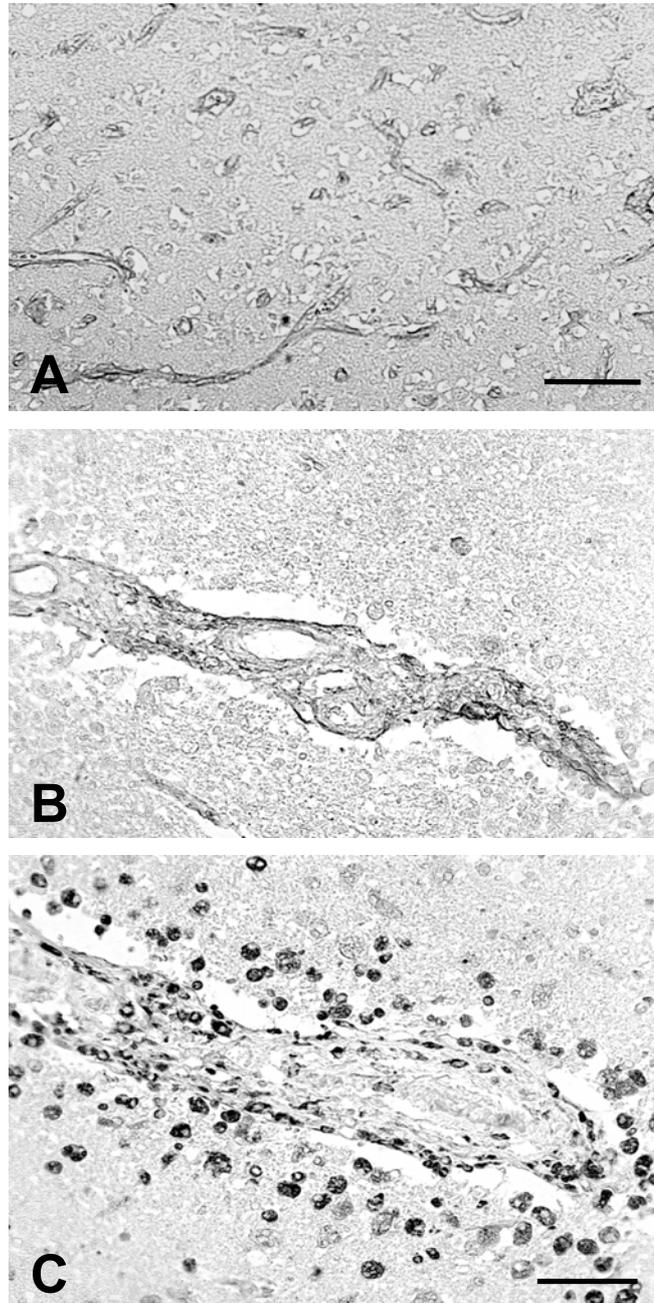


Abb.18: VCAM-1-Expression in einem humanen Hirninfarkt 9 Tage nach Insultereignis. A: VCAM-1-Expression auf kapillären Mikrogefäßen (A). B und C: Serienschnittfärbung. Perivaskuläre Akkumulation KP1-positiver Makrophagen (C) um ein größeres VCAM-1-positives Gefäß (B). Maßstäbe: 50  $\mu\text{m}$  in A, 100  $\mu\text{m}$  in B und C.

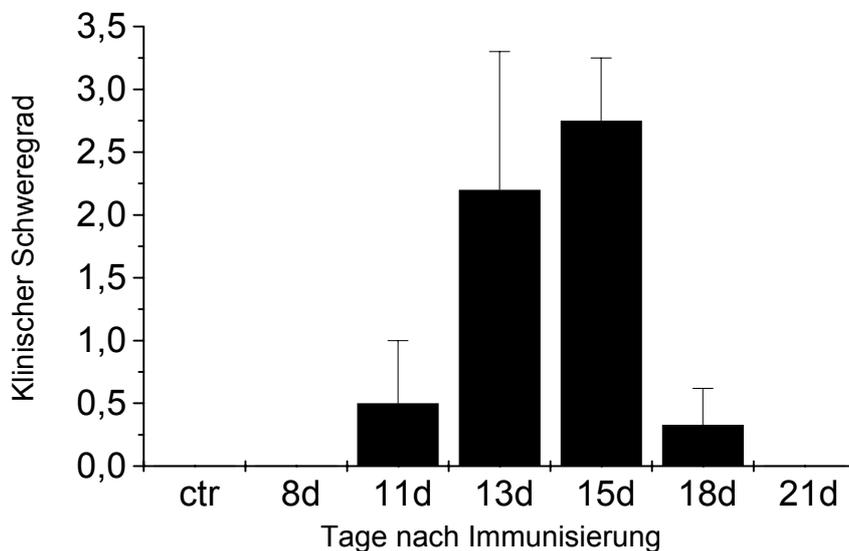
#### 4.8 Zytokinexpression im ZNS: Die EAE als autoimmunologisches Vergleichsparadigma

Zytokine als die maßgeblichen Regulatoren immunologischer Prozesse sind kleine lösliche Proteine, die in sehr geringen Mengen lokal sezerniert und nach Bindung an ihre spezifischen Rezeptoren meist rasch degradiert werden. Die *in situ*-Analyse von Zytokinen ist mit immunhistochemischen Methoden aufgrund häufig zu beobachtender unspezifischer Reaktionen der zur Verfügung stehenden Primärantikörper und kaum gegebener Quantifizierbarkeit der Färbungen meistens nicht befriedigend möglich. Als Alternative bieten sich Zytokinbestimmungen auf mRNA-Ebene an, die unter Verwendung optimierter RT-PCR-Methodik auch in kleinen Gewebeproben mit hoher Sensitivität und Spezifität möglich sind. Bei Beachtung linearer Amplifizierungsbedingungen (vgl. hierzu S. 24, Abb.1) kann darüberhinaus das relative Expressionsniveau von Zytokinen durch Normalisierung gegen konstitutiv exprimierte 'housekeeping'-Gene wie die GAPDH mit ausreichender Genauigkeit erfaßt werden.

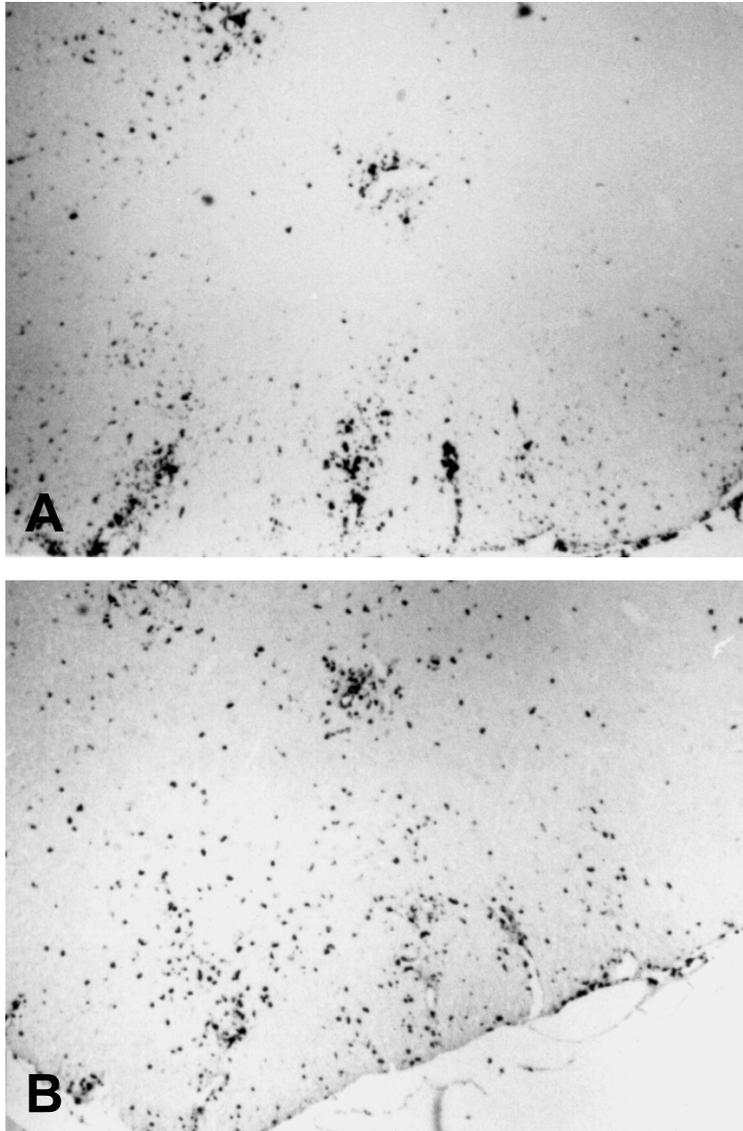
Die Bedeutung von lokal exprimierten Zytokinen für Entzündungsreaktionen im ZNS wurde bislang in erster Linie am Autoimmunmodell der EAE untersucht (Kennedy et al., 1992; Stoll et al., 1993; Issazadeh et al., 1995). In der vorliegenden Arbeit wurde die EAE deshalb zunächst zur Etablierung der semiquantitativen RT-PCR-Methodik verwendet. Die bei der EAE erhobenen Befunde dienten darüberhinaus als Grundlage zur funktionellen Interpretation der anschließend bei der Ischämie definierten Expressionsmuster pro- und antiinflammatorischer Zytokine.

Zur Induktion einer akuten EAE wurden Lewisratten mit einem der enzephalitogenen Region des basischen Myelinproteins [Aminosäuren 68-86 der Meerschweinchen-Sequenz (Fritz und McFarlin, 1989)] entsprechenden synthetischen Peptid immunisiert. Unter diesem Immunisierungsregime nahm die Erkrankung einen typischen monophasischen, d.h. sich selbst limitierenden Verlauf (Abb.19). Am 11.Tag

entwickelten die Tiere eine Schwanzlähmung als erstes Krankheitszeichen. Ab dem 12. Tag trat eine Paraparese der Hinterläufe auf, die bis zum Erreichen einer kompletten Paraplegie der Hinterläufe am 15. Tag progredient war und dann über 4-5 Tage komplett remittierte. Dem klinischen Verlauf entsprechend kam es zwischen dem 11. und 15. Tag zu einer massiven Infiltration des lumbalen Rückenmarkes durch Makrophagen und T-Zellen (Abb.20 A,B), die in späteren Krankheitsstadien weitgehend rückläufig war.



*Abb.19: Klinischer Verlauf der EAE. Abgebildet sind jeweils die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von 5 Tieren pro Zeitpunkt. Der klinische Schweregrad wurde wie folgt skaliert: 0 = Normalbefund. 1 = Schwanzlähmung. 2 = Inkomplette Paraparese der Hinterläufe. 3 = Komplette Paraplegie. 4 = Moribunder Zustand oder Tod.*

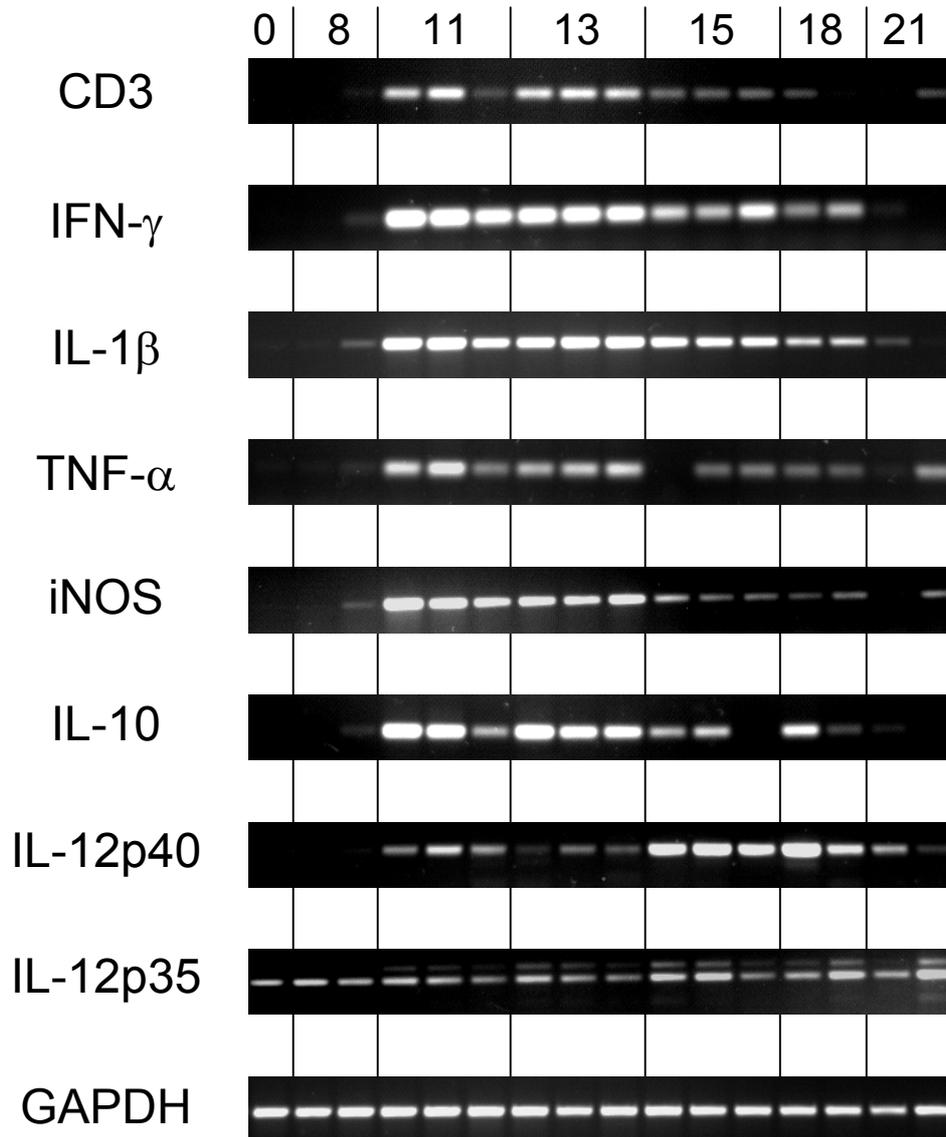


*Abb.20: Zelluläre Infiltration im Akutstadium der EAE. Immunhistochemische Darstellung von ED1-positiven Makrophagen (A) bzw. T-Zellen (B) im lumbalen Rückenmark 14 Tage nach Immunisierung. Vergrößerung: x33.*

Als Maß parenchymaler T-Zellinfiltration des Rückenmarks verwendeten wir in den RT-PCR-Experimenten (Abb.21,22) die Konzentration der T-Zellrezeptor (CD3)-mRNA, die ab Tag 11 in signifikantem Ausmaß nachweisbar war und ihr Maximum am 13. Tag, d.h. im Stadium aktiver Krankheitsprogression, erreichte. Parallel zur zellulären Infiltration kam es zur Koinduktion einer Vielzahl inflammatorischer Gene, zu denen die proinflammatorischen Zytokine IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  sowie die induzierbare NO-Synthase (iNOS) gehörten.

IL-10 ist ein antiinflammatorisches Zytokin, daß die proinflammatorischen Effekte von IFN- $\gamma$  *in vitro* effektiv antagonisiert (Moore et al., 1993) und bei monophasisch verlaufenden, Th1-vermittelten Erkrankungen wie der EAE deshalb zur Spontanlimitierung des lokalen Entzündungsprozesses beitragen könnte. Überraschenderweise wurde die mRNA des IL-10 im Verlauf der EAE parallel zu den proinflammatorischen Zytokinen bereits im Stadium der aktiven Krankheitsprogression zwischen dem 11. und 13. Tag maximal induziert und jenseits des 15. Tages herunterreguliert. Zeitgleich hiermit kam es auch zur signifikanten Abnahme der mRNAs für CD3, IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  und iNOS.

IL-12 ist ein aus 2 kovalent verbundenen Untereinheiten bestehendes Dimer, das entweder als p35/40 Heterodimer oder als (p40)<sub>2</sub> Homodimer vorliegt (Gately et al., 1998). Während das p35/p40 Heterodimer proinflammatorische Eigenschaften aufweist und eine Schlüsselrolle bei der Induktion IFN- $\gamma$ -produzierender Th1-Zellen spielt (Trinchieri, 1993), übt das (p40)<sub>2</sub> Homodimer als kompetitiver IL-12-Antagonist immunsuppressive Funktionen aus (Ling et al., 1995). Die Regulation der IL-12-Bioaktivität erfolgt in erster Linie über die Modulation der p40-Untereinheit, da die p35-Kette in einer Vielzahl unterschiedlicher Zelltypen konstitutiv exprimiert wird (Gately et al., 1998). Bei der EAE wurde IL-12p40 mRNA überraschenderweise im akuten Krankheitsstadium zwischen Tag 11 und 13 nur schwach induziert. Zum Beginn der klinischen Remissionsphase am Tag 15 kam es hingegen zu einer starken Induktion,



*Abb.21: Inflammatorische Genexpression im lumbalen Rückenmark bei der EAE. Repräsentative Original-PCR-Befunde. Als Hauptbefund kommt es im Stadium aktiver Krankheitsprogression (Tag 11-15 nach Immunisierung) zur Infiltration CD3 mRNA-positiver T-Zellen und zur Koinduktion pro- (IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , iNOS) und antiinflammatorischer (IL-10) Genexpression. Demgegenüber ist die Induktion von IL-12p40 mRNA signifikant verzögert und erreicht ihr Maximum zum Beginn der klinischen Remissionsphase (Tag 15-18). IL-12p35 mRNA wird konstitutiv exprimiert und im Krankheitsverlauf nicht signifikant reguliert.*

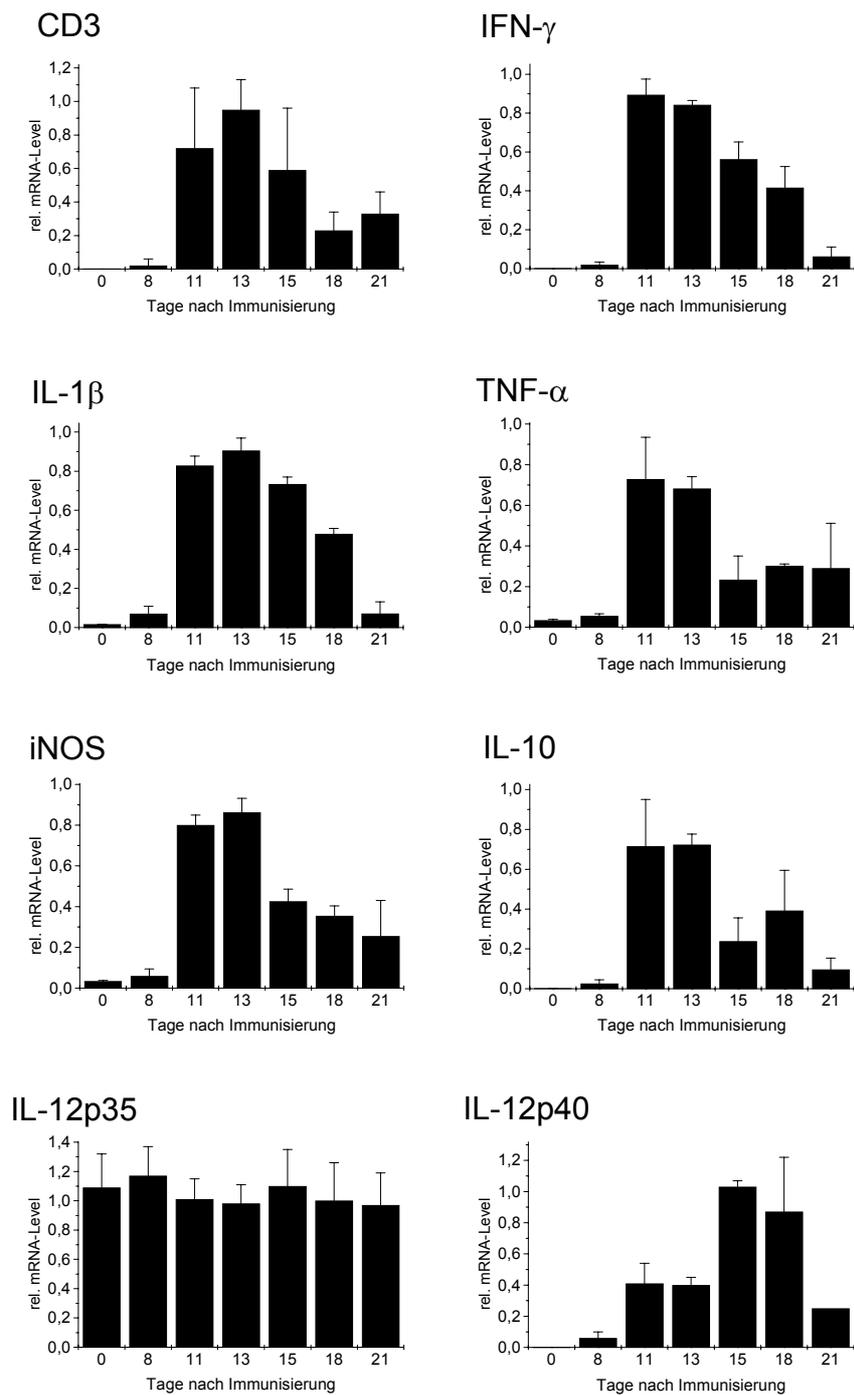


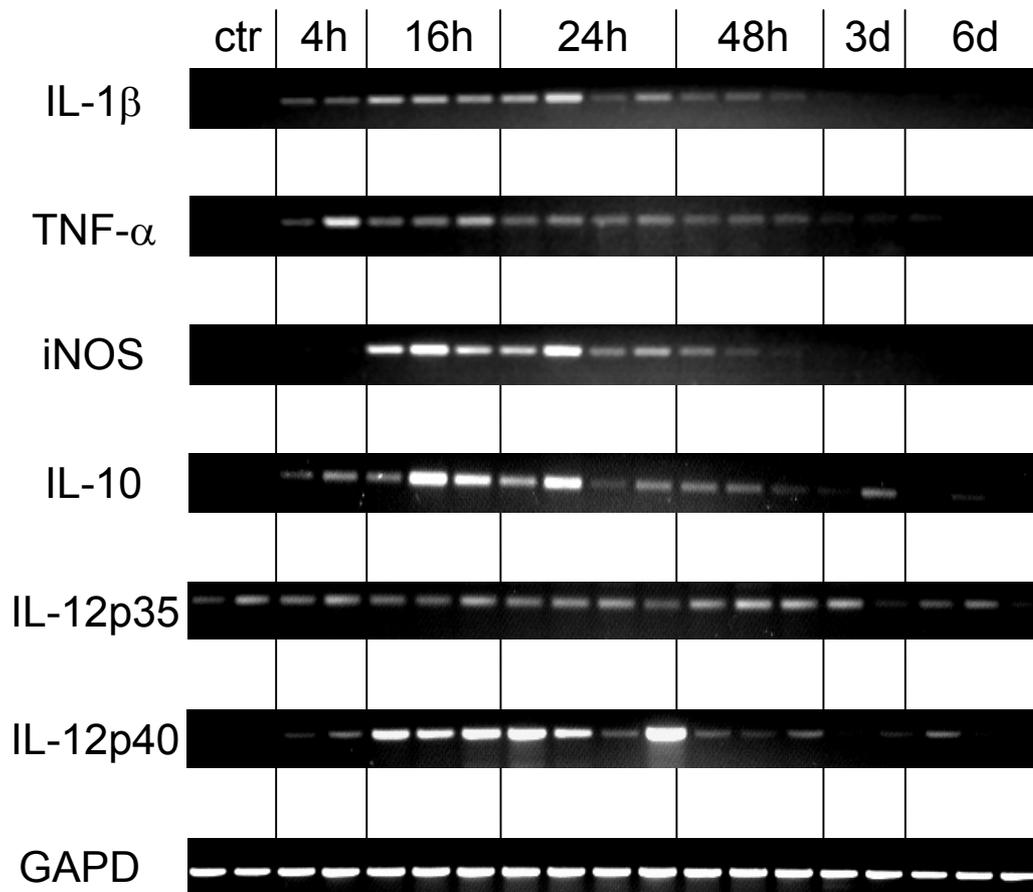
Abb.22: Semiquantitative Bestimmung der CD3-, Zytokin- und iNOS mRNA-Level bei der EAE in Relation zur Expression des „house-keeping“-Gens GAPDH. Abgebildet sind jeweils die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von 5 Tieren pro Zeitpunkt.

die bis Tag 18 persistierte und anschließend wieder herabreguliert wurde. Im Einklang mit *in vivo*-Befunden von Park und Shin (1996) in einem Mausmodell septischen Schocks fand sich IL-12p35 mRNA bereits in normalem Rückenmark und wurde im Krankheitsverlauf nicht signifikant moduliert.

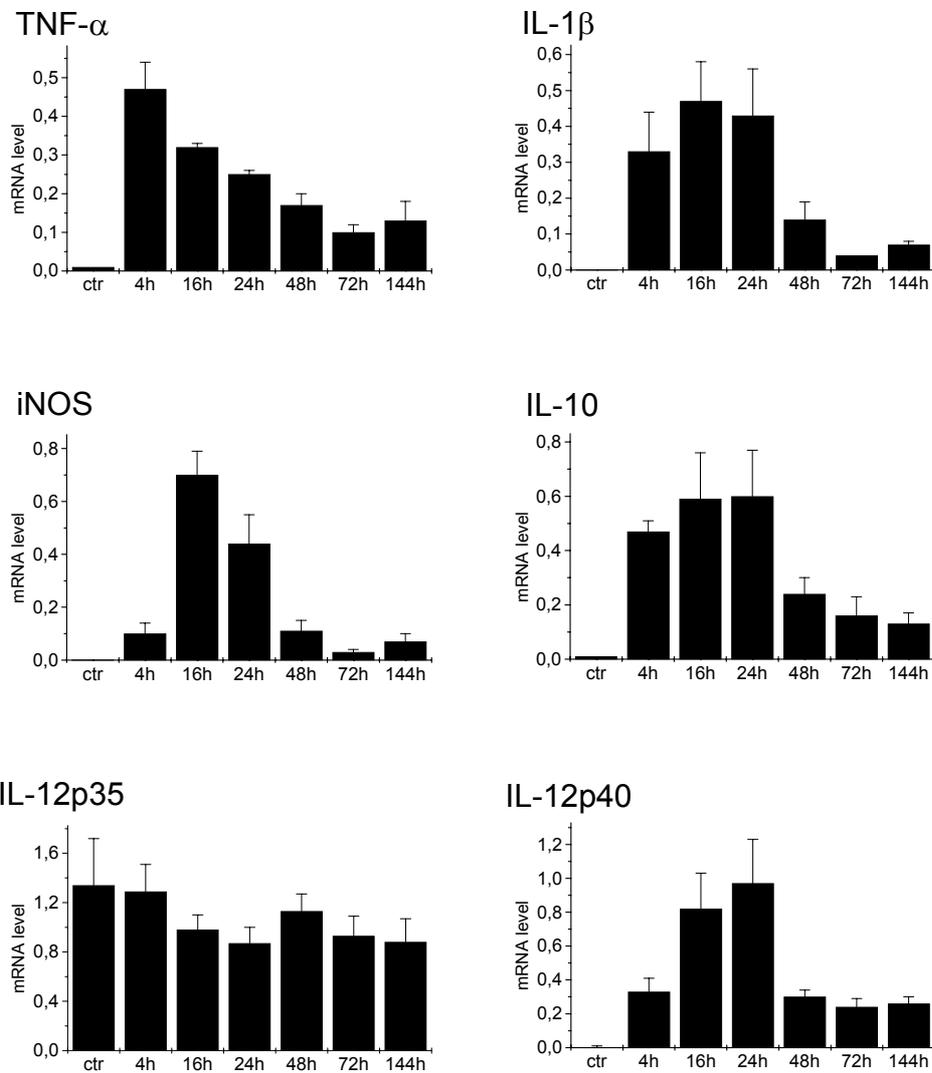
#### 4.9 Zytokinexpression in ischämischen Hirnläsionen: Untersuchungen im MCAO-Modell

Das Muster postischämischer Zytokininduktion wurde zunächst in durch MCAO induzierten Infarkten untersucht (Abbb.23,24). Bereits nach 4 Stunden, d.h. vor dem Beginn signifikanter hämatogener Makrophageninfiltration (vgl. 4.4), kam es zur starken Induktion von TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-10 mRNA. Hierbei wurde die TNF- $\alpha$  mRNA bereits nach 4 Stunden maximal induziert und anschließend kontinuierlich herabreguliert, während die Expression von IL-1 $\beta$  und IL-10 mRNA bis zu 24 Stunden auf hohem Niveau persistierte. Eine relativ verzögerte Hochregulation wiesen die mRNAs für iNOS und IL-12p40 auf, die bei 4 Stunden nur relativ schwach induziert wurden und ihr Maximum nach 16 bis 24 Stunden erreichten. Jenseits der 24-Stunden-Grenze wurden alle mRNAs signifikant herabreguliert. Die mRNA der IL-12p35-Untereinheit wurde konstitutiv exprimiert und nach Ischämie nicht reguliert.

Insgesamt kam es bei der MCAO also ähnlich wie bei der EAE schon früh zu einer starken Expression des antiinflammatorischen Zytokins IL-10, während die IL-12p40 mRNA demgegenüber leicht verzögert hochreguliert wurde. IFN- $\gamma$  mRNA war in den ischämischen Läsionen nur mit hoher Zyklenzahl (35 Zyklen gegenüber 30 Zyklen bei der EAE) und insgesamt variabel nachweisbar, so daß im Vergleich zur EAE von einer allenfalls schwachen IFN- $\gamma$  mRNA-Induktion in den ischämischen Läsionen ausgegangen werden muß.



*Abb.23: Inflammatorische Genexpression in durch MCAO induzierten kortikalen Infarkten. Repräsentative Original-PCR-Befunde. Als Hauptbefund kommt es innerhalb der ersten 24 Stunden nach Ischämie zur Koinduktion pro- (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , iNOS) und antiinflammatorischer (IL-10) Genexpression. Innerhalb dieses Zeitfensters ist die Induktionskinetik für iNOS und IL-12p40 mRNA gegenüber den anderen Faktoren leicht verzögert. IL-12p35 mRNA wird konstitutiv exprimiert und im Verlauf nicht reguliert.*



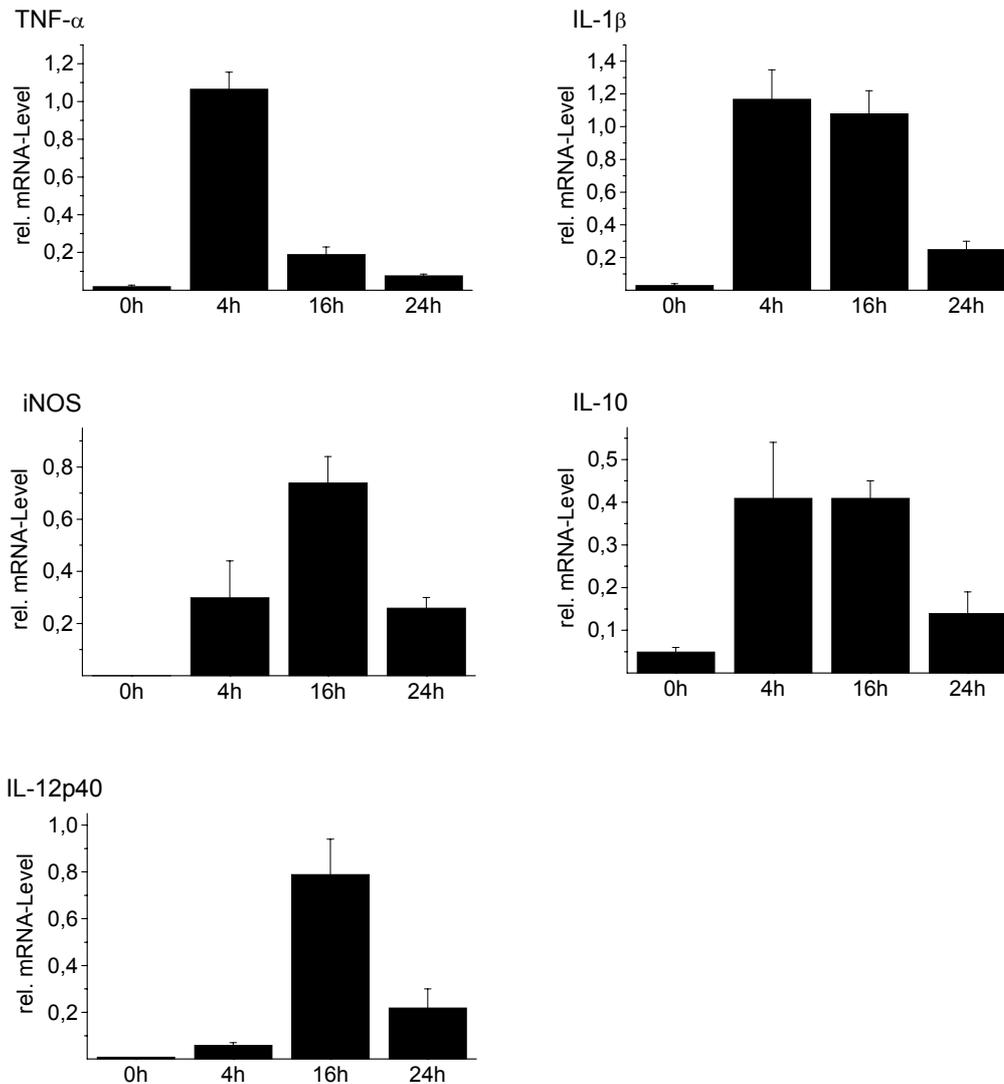
**Abb.24:** Semiquantitative Bestimmung der Zytokin- und iNOS mRNA-Level in durch MCAO induzierten kortikalen Infarkten in Relation zur Expression des „housekeeping“-Gens GAPDH. Abgebildet sind jeweils die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler von 5 Tieren pro Zeitpunkt.

#### 4.10 Läsionelle vs. läsionsferne Zytokininduktion: Untersuchungen im Photothrombosemodell

Zusätzlich zu den Veränderungen im Infarkt selbst rufen fokale kortikale Ischämien weitreichende zelluläre Reaktionen auch in primär nichtischämischen Arealen des umgebenden Kortex hervor, die mit einer signifikanten Aktivierung residenter Mikroglia und Astrozyten einhergehen (Schroeter et al., 1995; Schroeter et al., 1999) und in funktioneller Hinsicht mit einem Zustand relativer Ischämietoleranz assoziiert sind (Glazier et al., 1994). Angesichts möglicher protektiver Effekte proinflammatorischer Zytokine auf neuronale Zellen (Cheng et al., 1994) gingen wir deshalb der Frage nach, ob es nach fokaler Ischämie auch im nichtinfarzierten ipsilateralen Kortex zur Induktion inflammatorischer Genexpression kommt. Da aufgrund der unscharfen Läsionsabgrenzung im MCAO-Modell nichtinfarzierte Areale nicht mit ausreichender Zuverlässigkeit von den Infarkten differenziert werden konnten, wurde die räumliche Verteilung postischämischer Zytokin- und iNOS mRNA-Expression im Photothrombosemodell untersucht. Zur differentiellen Untersuchung der läsionsfernen Zytokinexpression (Abb.26) wurden zusätzlich zum Infarkt und seiner unmittelbaren Randzone (A in Abb.26) ca. 3 mm lateral gelegene ipsilaterale (B), homotop zur Läsion kontralaterale (C) sowie ipsilateral frontale (D) und occipitale (E) Kortexareale präpariert.

Als Hauptbefund ergab die anschließende RT-PCR-Analyse, daß die Expression sowohl pro- als auch antiinflammatorischer Zytokine nach fokaler Ischämie nicht nur auf den Infarkt und seine unmittelbare Randzone beschränkt bleibt, sondern in erheblichem Ausmaß auch in nichtinfarzierten Arealen der gesamten ipsilateralen Hemisphäre zu finden ist. Im Vergleich zur MCAO wurde dabei in den photothrombotisch induzierten Infarkten selbst ein prinzipiell identisches Muster inflammatorischer Gene exprimiert (Abb.25). Bereits nach 4 Stunden kam es zur starken Induktion von  $\text{TNF-}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$  und  $\text{IL-10}$  mRNA, während die Induktion von iNOS und  $\text{IL-12p40}$  mRNA

eine verzögerte Kinetik mit einem Maximum bei 16 Stunden aufwies. Nach 16 Stunden war eine signifikante Abnahme von TNF- $\alpha$  mRNA zu verzeichnen, während die anderen mRNAs erst nach 24 Stunden herabreguliert wurden.

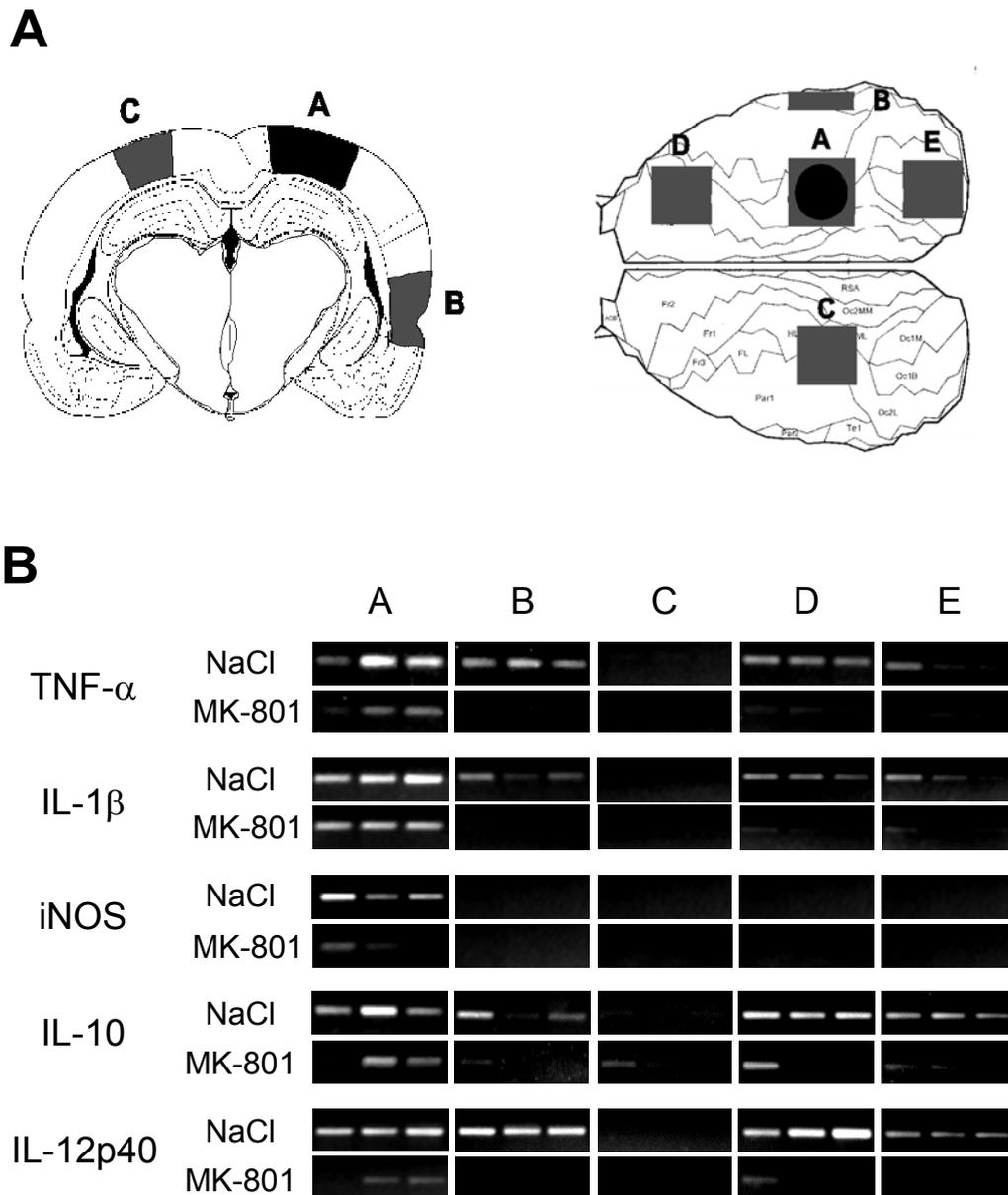


*Abb.25: Semiquantitative Bestimmung der Zytokin- und iNOS mRNA-Level in photochemisch induzierten kortikalen Infarkten in Relation zur Expression des „housekeeping“-Gens GAPDH. Abgebildet sind jeweils die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler von 4 Tieren pro Zeitpunkt.*

Im nichtinfarzierten ipsilateralen Kortex konnten wir eine starke Induktion von TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-10 und IL-12p40 mRNA nachweisen, während die Expression von iNOS mRNA zu allen Zeitpunkten streng auf das Infarktareal beschränkt blieb (Abb.26). Kontralateral kam es insgesamt zu keiner signifikanten mRNA-Induktion. Das Maximum läsionsferner ipsilateraler mRNA-Induktion wurde für TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  nach 4 Stunden, für IL-10 und IL-12p40 hingegen nach 16 Stunden erreicht. Repräsentative PCR-Befunde sind in Abb.26 für jedes Zytokin jeweils für den Zeitpunkt der Maximalexpression gezeigt.

Die ausgedehnte, insgesamt aber streng ipsilaterale Zytokinexpression auch in nichtinfarziertem Kortex legte nahe, daß infarktgetriggerte Spreading depressions (SD) eine Rolle bei der postischämischen Zytokininduktion spielen könnten. SD sind in verschiedenen Infarktmodellen durch Blockade des NMDA-Rezeptors mit dem nichtkompetitiven Rezeptorantagonisten MK-801 hemmbar (Hossmann, 1996). Bei unseren Untersuchungen im Photothrombosemodell verabreichten wir MK-801 intravenös in einer Dosierung von 2 mg/kg Körpergewicht 30 Minuten vor Ischämieinduktion. Vorangehende Studien hatten gezeigt, daß mit dieser Behandlung kortikale SD im Photothrombosemodell effektiv zu unterdrücken sind (Schroeter et al., 1995).

Insbesondere im nichtinfarzierten Kortex führte die Behandlung mit MK-801 zu einer hochsignifikanten und langanhaltenden Suppression der Zytokininduktion, wobei der MK-801-Effekt in frontal, lateral und occipital gelegenen Arealen in identischer Weise ausgeprägt war (Abb.26). Der deutlichste Effekt war im läsionsfernen Kortex für TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  nach 4 Stunden und für IL-10 und IL-12p40 nach 16 Stunden nachweisbar. Der inhibitorische Effekt von MK-801 war in den Infarkten selbst hingegen geringer ausgeprägt.



**Abb.26: Inflammatorische Genexpression in infarzierten und nicht-infarzierten Arealen nach kortikaler Photothrombose und ihre Modulation durch MK-801. A: Lokalisation der für die PCR-Analyse entnommenen Gewebeproben. B: Exemplarische Original-PCR-Befunde von je 3 Tieren 4 h (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ) bzw. 16 h (iNOS, IL-10, IL-12p40) nach Ischämie. Alle Zytokin mRNAs werden nicht nur im Infarkt (A), sondern auch in nichtischämischen Kortexarealen (B,D,E) der ipsilateralen Hemisphäre induziert. Diese läSIONSferne Zytokininduktion ist durch den NMDA-Antagonisten MK-801 weitgehend inhibierbar. Im Unterschied zu den Zytokinen bleibt die Expression von iNOS mRNA streng auf den ischämischen Fokus beschränkt. Im kontralateralen Kortex (C) kommt es zu keinem Zeitpunkt zur Induktion von Zytokin- oder iNOS-mRNA.**

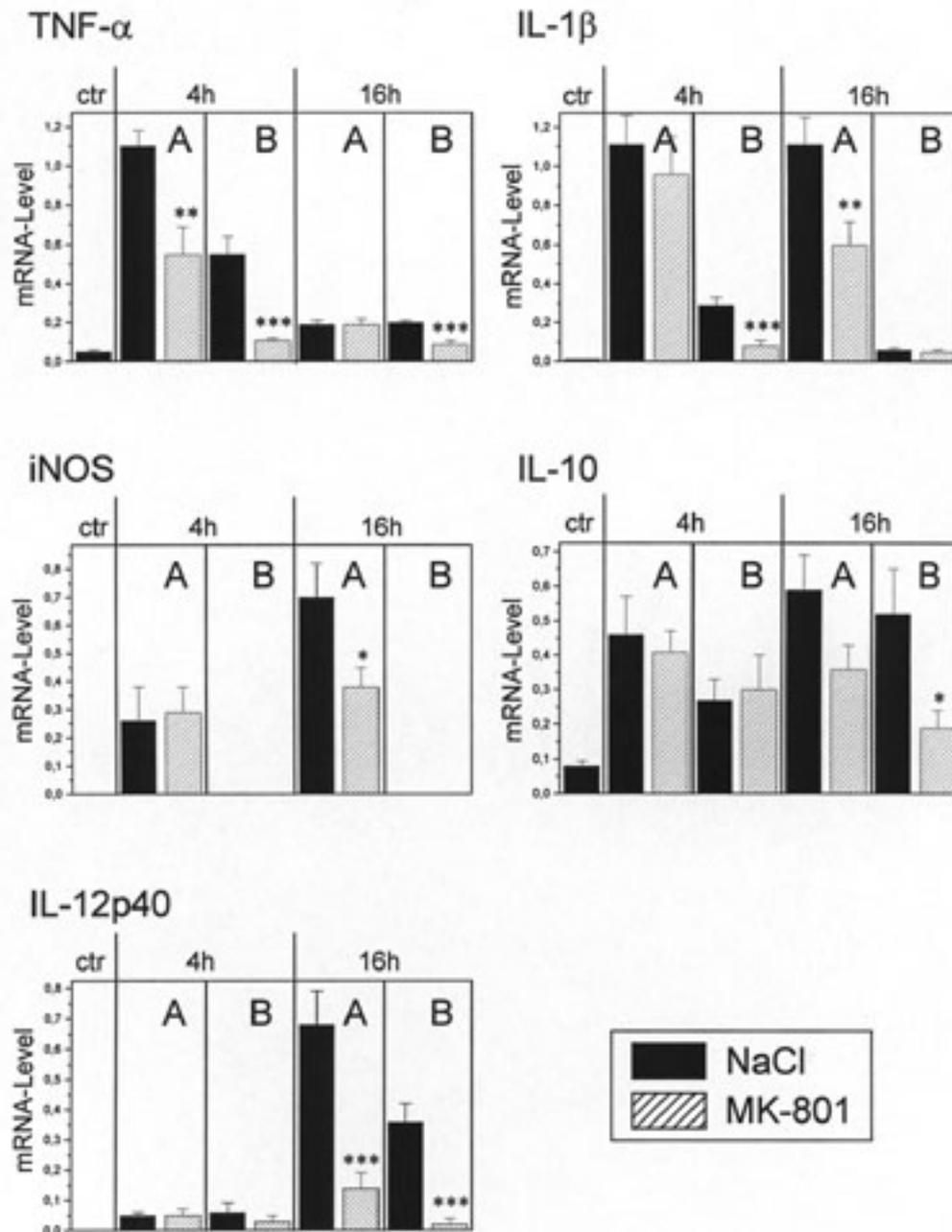


Abb.27: Semiquantitative Bestimmung der Zytokin- und iNOS mRNA-Level nach kortikaler Photothrombose in infarzierten (A) bzw. nichtinfarzierten (B) Arealen in unbehandelten Kontrollen (schwarze Säulen) bzw. MK-801-behandelten Tieren (schraffierte Säulen). Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler von jeweils 5 Tieren (4 Stunden) bzw. 10 Tieren (16 Stunden) pro Gruppe. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  (Mann-Whitney U-Test) für den Unterschied zwischen MK-801-behandelten und mit NaCl-Lösung scheinbehandelten Tieren.

Die quantitative Analyse der Daten ist in Abb.27 exemplarisch für das Infarktareal (A) und lateral gelegenen nichtinfarzierten Kortex (B) dargestellt. MK-801 bewirkte im läSIONSfernen Kortex maximal eine Reduktion um 79 % für TNF- $\alpha$  bzw. 72 % für IL-1 $\beta$  (nach 4 Stunden) sowie um 96 % für IL-12p40 bzw. 63 % für IL-10 (nach 16 Stunden). In den Läsionen selbst war insbesondere die IL-12p40 mRNA-Synthese durch MK-801 effektiv hemmbar (80 % Reduktion nach 16 Stunden). Eine partielle, statistisch signifikante Hemmung war darüberhinaus für iNOS (45 %) bzw. IL-1 $\beta$  (46 %) bei 16 Stunden und für TNF- $\alpha$  (50 %) bei 4 Stunden festzustellen.

## 5. DISKUSSION

Klinische und experimentelle Befunde legen nahe, daß es über mehrere Tage nach fokaler Hirnischämie zur Exazerbation des Gewebsschadens mit Ausdehnung der entstehenden Infarzierung in ihre zunächst noch intakte Randzone hinein kommt (Heiss et al., 1992; Garcia et al., 1993; Baird et al., 1997). Andererseits induzieren fokale Hirninfarkte auch plastische Veränderungen, zu denen neben der rein strukturellen Läsionsdemarkierung und Gliosebildung (Clark et al., 1993) auch weitreichende funktionelle Adaptationsprozesse in der Umgebung des Infarktareals gehören (Stroemer et al., 1995; Hagemann et al., 1998). In den letzten Jahren wurde zunehmend die Bedeutung inflammatorischer Prozesse für die Pathogenese akuter und chronischer Neurodegeneration erkannt (Rothwell et al., 1997). Aktivierte Entzündungszellen produzieren eine Vielzahl hochaktiver biologischer Mediatoren, die über ihre rein immunologischen Funktionen hinaus sowohl toxische (Chao et al., 1992; Hewett et al., 1994) als auch protektive Effekte (Cheng et al., 1994; Heese et al., 1998) auf Nervenzellen ausüben können. Voraussetzung für ein funktionelles Verständnis postischämischer Inflammation ist die genaue Kenntnis zellulärer und molekularer Sekundärprozesse in der ischämischen Hirnläsion *in vivo*, die bislang erst in Ansätzen bekannt sind. In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb eine detaillierte zeitlich-räumliche Analyse der zellulären Infiltration und Zytokininduktion nach fokaler Ischämie des Rattenkortex vorgenommen und die Beziehung des Entzündungsprozesses zum Auftreten apoptotischen Zelltods und zu NMDA-Rezeptor-vermittelter Signaltransduktion als wichtigen Mechanismen sekundärer Hirnschädigung untersucht. Die experimentellen Befunde wurden darüberhinaus exemplarisch an Autopsiematerial von humanen Hirninfarkten nachvollzogen.

### 5.1. Inflammation und verzögerter Zelltod in der Infarkttrandzone

In den durch Photothrombose bzw. MCAO induzierten ischämischen Läsionen fanden wir in Übereinstimmung zu Ergebnissen von Clark et al. (1993) und Garcia et al. (1994) zunächst eine Infiltration polymorphkerniger Granulozyten, die nach 12 bis 24 Stunden einsetzte und ab dem dritten Tag drastisch rückläufig war. Überraschenderweise konnten wir zusätzlich erstmals eine T-Zellinfiltration in fokal-ischämischen Läsionen nachweisen (Jander et al., 1995). In beiden untersuchten Modellen fanden sich T-Zellen bereits nach 24 Stunden und erreichten ihr Infiltrationsmaximum zum Beginn der 2. Woche nach Ischämie. Dieser Befund konnte durch den Nachweis CD3 (T-Zell-Rezeptor)-positiver Lymphozyten in exemplarisch untersuchten humanen Hirninfarkten prinzipiell bestätigt werden. Die ausgeprägte T-Zellinfiltration bei der Ischämie war überraschend, da T-Zellen bislang lediglich bei autoimmunen Erkrankungen wie der EAE (Wekerle, 1993), nicht aber bei nichtimmunologischen Läsionsparadigmen wie der Wallerschen Degeneration beschrieben worden waren (Stoll et al., 1989b; George und Griffin, 1994). Auch aus pathoanatomischen Beschreibungen humanen Autopsiematerials existierte bislang lediglich anekdotische Evidenz für eine lymphozytäre Infiltration ischämischer Hirnläsionen (Nedergaard et al., 1986).

Die Infiltration von T-Zellen ging mit der transienten Expression von MHC Klasse I und II Antigenen und dem Zelladhäsionsmolekül ICAM-1 einher (Jander et al., 1995). MHC-Antigene und ICAM-1-vermittelte Adhäsionsmechanismen spielen eine zentrale Rolle bei der Interaktion zwischen T-Zellen und Makrophagen im Initialstadium zellulärer Immunantworten (Altmann et al., 1989; Germain, 1994). ICAM-1 ist durch inflammatorische Zytokine außerdem auf Endothelzellen induzierbar, wodurch die endotheliale Adhäsion und Transmigration hämatogener Zellen in entzündlich verändertes Gewebe ermöglicht wird (Springer, 1990). In den experimentell induzierten Läsionen fand sich endotheliale ICAM-1-Expression innerhalb der ersten 12 Stunden

zunächst im Kern des Infarktes, wo sie zur parenchymalen Infiltration polymorphkerniger Granulozyten und T-Zellen korrelierte. Im weiteren Verlauf der ersten Woche blieb sowohl die T-Zellinfiltration als auch die Expression von MHC-Antigenen und dem ICAM-1 weitgehend auf die Infarkttrandzone beschränkt, während die zelluläre Infiltration des Infarktkerns zu späteren Zeitpunkten in Abwesenheit nennenswerter T-Zellinfiltration und ICAM-1-Expression verlief. Auch in humanen Hirninfarkten war die Infiltration durch T-Zellen und das Ausmaß zellulärer Aktivierung in der Randzone am stärksten ausgeprägt. Insgesamt ist die Infarkttrandzone somit als Prädilektionsstelle des postischämischen Entzündungsprozesses anzusehen.

Bereits Garcia et al. (1993) zeigten in einem Modell permanenter Mediaokklusion bei der Ratte, daß Neurone im Infarkttrandbereich nach histopathologischen Kriterien zunächst lediglich reversible Schädigungszeichen aufweisen und erst sekundär dem irreversiblen Zelltod anheimfallen. Korrespondierend hierzu nimmt das Läsionsvolumen bis zu 72 Stunden nach Läsionsinduktion noch an Größe zu. Neuere Analysen unter Verwendung der TUNEL-Technik zeigten, daß ein wesentlicher Anteil postischämischen Zelltods über den aktiven, d.h. Proteinneusynthese erfordernden Vorgang der Apoptose vonstatten geht (Linnik et al., 1993; Li et al., 1995). In der vorliegenden Arbeit konnten wir im Photothrombosemodell noch bis zum 6. Tag nach Läsionsinduktion TUNEL-positive Zellen nachweisen (Braun, Jander et al., 1996). Obwohl photothrombotisch induzierte Läsionen keine ausgedehntere ischämische Penumbra aufweisen, zeigten die apoptotischen Zellen ab dem 2. Tag eine eindeutige Konzentration in der Randzone der Infarkte. Dort wiesen sie oft eine unmittelbare räumliche Beziehung zu infiltrierenden T-Zellen und Makrophagen auf. Da die Zeitspanne von der Induktion apoptotischen Zelltods bis zum Nachweis typischer Kernveränderungen wenige Stunden beträgt (Bursch et al., 1990), erscheint postischämischer Zelltod als ein dynamischer Prozess, der sich wesentlich über das frühe Stadium ischämisch bedingter neuronaler Nekrose hinaus ausdehnt und durch

den sekundär ablaufenden lokalen Entzündungsprozess kritisch beeinflusst werden könnte.

Neurotoxische Auswirkungen postischämischer Inflammation können sowohl durch direkte Zytokineffekte als auch durch die Aktivierung nachgeschalteter Effektor-Kaskaden vermittelt werden. So induzieren die proinflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  zumindest in einigen *in vitro*-Paradigmen einerseits direkt apoptotischen Zelltod von Neuronen und Gliazellen (D'Souza et al., 1995; Talley et al., 1995; Friedlander et al., 1996) und können andererseits durch die Induktion reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffverbindungen auch indirekt zur Exazerbation exzitotoxischer und hypoxischer Zellschädigung beitragen (Chao et al., 1992; Hewett et al., 1994; Skaper et al., 1995). Die Ausschaltung der zytokin-induzierbaren NO-Synthase (iNOS) durch pharmakologische Inhibition oder genetische Manipulation (iNOS-'knock-out'-Mäuse) führte in Modellen permanenter Mediaokklusion zur signifikanten Abnahme des Infarktolumens (Zhang et al., 1995; Iadecola et al., 1997; Nagayama et al., 1998). Korrelierend zum zeitlichen und räumlichen Muster postischämischer Immunaktivierung wirken sich iNOS-gerichtete Therapiestrategien mit signifikanter Verzögerung von bis zu 4 Tagen aus und betreffen überwiegend die sekundäre Ausdehnung der Läsionen in ihre Randzone (Iadecola et al., 1997; Zhang und Iadecola, 1998). Auch durch die Blockade ICAM-1-vermittelter Adhäsionsmechanismen kam es nach transienter Mediaokklusion zur Abnahme des Infarktolumens und verzögerten apoptotischen Zelltods (Chen et al., 1994; Connolly, Jr. et al., 1996; Chopp et al., 1996).

Die spezifische funktionelle Bedeutung der T-Zellinfiltration in ischämischen Läsionen ist bislang unklar. In Autoimmunmodellen wie der EAE werden pathogene, autoantigen-spezifische T-Zellen durch einen peripheren Immunisierungsvorgang aktiviert und infiltrieren mit einer Latenz von 10 - 12 Tagen das ZNS (Wekerle et al., 1986). Demgegenüber erscheint die Zeitspanne zwischen Läsionsinduktion und T-

Zellinfiltration bei der Ischämie zu kurz für die Generierung einer antigenspezifischen T-Zellantwort. Interessanterweise zeigten jedoch Hirschberg et al. (1998), daß aktivierte T-Zellen auch ungeachtet ihrer Antigenpezifität in großer Zahl in das traumatisierte ZNS rekrutiert werden können. Mehrere kürzlich publizierte Studien legen nahe, daß ZNS-infiltrierende T-Zellen neurodegenerative Prozesse beeinflussen können. So untersuchten Becker et al. (1997) den Effekt einer oralen Toleranzinduktion gegen ZNS-Autoantigene auf die Infarktgröße nach experimenteller Mediaokklusion bei der Ratte. Durch orale Verabreichung von ZNS-Autoantigenen wie dem Myelin-basischen Protein (MBP) werden T-Zellen generiert, die die immunsuppressiven Zytokine IL-4 und TGF- $\beta$  produzieren und im EAE-Modell die Induktion der pathogenen Th1-vermittelten Autoimmunreaktion inhibieren (Miller et al., 1992). In der Studie von Becker et al. (1997) entwickelten MBP-tolerante Tiere signifikant kleinere Infarkte als nichttolerante Kontrollen und wiesen vermehrt TGF- $\beta$ -positive T-Zellen in den Infarkten auf. Moalem et al. (1999) zeigten, daß der Transfer enzephalitogener T-Zellen das Ausmaß sekundärer Degeneration retinaler Ganglienzellen nach partieller Optikus-'Crush'-Läsion *in vivo* paradoxerweise signifikant mindert. Im Einklang hiermit sind aktivierte T-Zellen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zur Produktion neurotropher Faktoren wie dem BDNF in der Lage (Kerschensteiner et al., 1999). Ob infiltrierende T-Zellen bei der zerebralen Ischämie überwiegend schädliche oder protektive Funktionen ausüben, muß durch weitergehende funktionelle Studien geklärt werden.

## 5.2 Die Rolle residenter Mikroglia

Makrophagen stellten ab dem 2. - 3. Tag nach Ischämie den zahlenmäßig überwiegenden Anteil aktivierter Entzündungszellen in den ischämischen Hirnläsionen dar. In unterschiedlichsten Läsionsparadigmen tragen sowohl phagozytisch transformierte Mikroglia als auch hämatogen infiltrierende monozytäre Zellen zur Population aktivierter ZNS-Makrophagen bei (Perry et al., 1993; Kreutzberg, 1996; Stoll und

Jander, 1999). Residente Mikroglia ist in Schnitten normaler Gehirne durch Anfärbung des CD11b-Antigens identifizierbar und weist eine charakteristische verzweigte Morphologie auf. Phagozytisch transformierte Mikrogliazellen nehmen demgegenüber eine amoeboid-rundliche Form an und exprimieren zahlreiche Aktivierungsmarker, zu denen das phagolysosomale ED1-Antigen und die MHC Klasse I- und II-Antigene zählen. Da hämatogene Makrophagen weitgehend identische Markerantigene exprimieren, ist die Unterscheidung beider Zelltypen in ischämischen Hirnläsionen *in situ* anhand immunhistochemischer Kriterien nicht möglich (Flaris et al., 1993).

Zur differentiellen Analyse residenter Mikroglia und infiltrierender Makrophagen verwendeten wir in der vorliegenden Arbeit deshalb Dichlormethylendiphosphonat-gefüllte Liposomen, deren systemische Applikation reproduzierbar zur völligen Depletion peripherer Monozyten und Makrophagen führt (Van Rooijen et al., 1990), Mikrogliazellen im ZNS aber unbeeinflusst läßt (Bauer et al., 1995). Unsere Befunde zeigen, daß die initiale Phagozytenantwort zumindest bei der Photothrombose überwiegend durch Transformation residenter Mikroglia erfolgt, während eine signifikante Infiltration peripherer Makrophagen erst ab dem 3. Tag einsetzt (Schroeter, Jander et al., 1997). Das Stadium früher Mikrogliaaktivierung korreliert in zeitlicher Hinsicht somit zur Induktion proinflammatorischer Zytokine wie dem TNF- $\alpha$  und dem IL-1 $\beta$ , die bereits innerhalb der ersten 4 - 12 Stunden erfolgt (Liu et al., 1993; Liu et al., 1994) und die Produktion neurotoxischer Substanzen wie dem Stickstoffmonoxid und reaktiven Sauerstoffradikalen nach sich zieht (Boje und Arora, 1992; Chao et al., 1995a). Demgegenüber dominiert zum Zeitpunkt der sekundären Makrophagenrekrutierung das antiinflammatorische Zytokin TGF- $\beta$  (Wang et al., 1995), das in verschiedenen Modellen exzitotoxischer und ischämischer Zellschädigung protektive Effekte vermittelt (Gross et al., 1993; Prehn et al., 1993; Mattson et al., 1997a). Im Hinblick auf die postulierte sekundäre Neurotoxizität durch Sekretion proinflammato-

rischer Zytokine könnte somit der frühen Aktivierung residenter Mikroglia eine entscheidende Bedeutung beikommen.

### 5.3 Eine neue Subpopulation CD8-positiver Makrophagen

Sowohl in immunvermittelten als auch degenerativen Läsionsparadigmen exprimieren aktivierte ZNS-Makrophagen ein relativ uniformes Muster zellulärer Aktivierungsmarker, von denen bislang die MHC Klasse II- und CD4-Antigene am besten untersucht sind (Matsumoto et al., 1986; Perry und Gordon, 1987; Stoll et al., 1989b; Streit et al., 1989; Matsushima et al., 1994). Bislang existierten keine phänotypischen Marker, die *in vivo* auf eine funktionelle Heterogenität aktivierter ZNS-Makrophagen hinweisen könnten.

In der vorliegenden Arbeit konnten wir eine bislang nicht beschriebene Subpopulation CD8-positiver Makrophagen identifizieren, die in erheblichem Ausmaß in ischämische Läsionen des Rattenkortex infiltrieren (Jander et al., 1998b). CD8 ist ein dimeres Membranmolekül, das als  $\alpha\beta$ -Heterodimer bislang ausschließlich auf zytotoxischen/Suppressor-T-Zellen lokalisiert wurde, wohingegen natürliche Killer (NK)-Zellen, aktivierte T-Helferzellen und intestinale intraepitheliale Lymphozyten das CD8 $\alpha\alpha$ -Homodimer exprimieren (Lawetzky et al., 1990; Torres-Nagel et al., 1992). Makrophagen in den ischämischen Läsionen exprimierten sowohl die  $\alpha$ - als auch  $\beta$ -Kette, so daß Makrophagen-CD8 wahrscheinlich in Form des  $\alpha\beta$ -Heterodimers vorliegt. Interessanterweise wurde das CD4-Antigen auf einer distinkten Makrophagen-subpopulation exprimiert, die sich sowohl in ihrer Infiltrationskinetik, räumlichen Verteilung in den Läsionen und dem Vorkommen in anderen Läsionsparadigmen des ZNS deutlich von CD8-positiven Makrophagen unterschied. Während CD4-positive Makrophagen bis zum 3. Tag lediglich spärlich vorhanden waren und danach eine kontinuierliche Zunahme bis zum Ende der 2. Woche nach Ischämie zeigten, traten CD8-positive Makrophagen relativ schlagartig nach ca. 48 Stunden auf, persistierten

in großer Zahl bis Tag 6 und nahmen danach drastisch in ihrer Häufigkeit ab. CD8-positive Makrophagen blieben außerdem weitgehend auf den Randbereich der Läsionen beschränkt, während CD4-positive Zellen nach dem 6. Tag auch das Infarktzentrum massiv infiltrierten.

In Übereinstimmung mit publizierten Daten fanden wir zahlreiche CD4-positive Makrophagen bei der Wallerschen Degeneration des N. opticus (Perry und Gordon, 1987) und bei der EAE. CD8-positive Makrophagen waren hingegen in degenerierenden Nn. optici nicht und nur vereinzelt bei der EAE zu finden (Jander et al., 1998b). In Erweiterung dieser Befunde konnten wir kürzlich zeigen, daß auch absteigende Fasertrakte, die nach kortikaler Ischämie sekundärer Wallerscher Degeneration anheimfallen, lediglich von CD4-positiven, nicht aber CD8-positiven Makrophagen infiltriert werden (Schroeter et al., 1999). Insgesamt kommt es also zu einer läsions- und stadienspezifischen Rekrutierung CD8-positiver Makrophagen in ischämische Läsionen, die eine unerwartete phänotypische Heterogenität aktivierter ZNS-Makrophagen nahelegt. Scriba et al. (1997; 1998) zeigten kürzlich, daß es auch auf zirkulierenden Monozyten unter bestimmten *in vivo*-Stimulationsbedingungen zur Induktion des CD8-Antigens und Herunterregulation des CD4-Antigens kommt. Hierdurch wird die Annahme gestützt, daß die Expression von CD4- und CD8-Antigenen tatsächlich unterschiedliche funktionelle Aktivierungszustände von Monozyten/Makrophagen anzeigen könnte.

In funktioneller Hinsicht wurden sowohl CD4- als auch CD8-Moleküle bislang ausschließlich in ihrer Rolle als Antigenkorezeptoren auf T-Zellen untersucht (Janeway, Jr. 1992). Obwohl die Expression von CD4 auf humanen und Rattenmakrophagen bereits seit langem bekannt ist (Wood et al., 1983; Jeffries et al., 1985), konnte erst kürzlich gezeigt werden, daß die transgene Expression des humanen CD4-Gens in normalerweise CD4-negativen Makrophagen/Mikroglia der Maus zum Auftreten vermehrter Neurodegeneration *in vivo* führt (Buttini et al., 1998). Ob das CD8-Antigen

ähnliche pathogene Effektorfunktionen von Makrophagen/Mikroglia induzieren kann, ist derzeit offen. MHC-Klasse I-Antigene als die natürlichen Liganden des CD8-Moleküls werden in starkem Ausmaß in der Randzone ischämischer Hirnläsionen exprimiert. *In vitro* sind elektrisch inaktivierte, nicht jedoch funktionell intakte Neurone durch Behandlung mit inflammatorischen Zytokinen zur Oberflächenexpression von MHC Klasse I-Antigenen induzierbar (Neumann et al., 1995). Interessanterweise fanden wir insgesamt eine Häufung CD8-positiver Makrophagen in der Grenzzone der Infarkte, in der sich nach dem Konzept der ischämischen Penumbra elektrisch inaktive, prinzipiell jedoch überlebensfähige Neurone befinden. Es erscheint somit denkbar, daß es in der ischämischen Grenzzone zur Interaktion zwischen neuronal exprimierten MHC-Klasse I-Molekülen und CD8-Molekülen auf Makrophagen kommen könnte. Hirji et al. (1997; 1998) beschrieben *in vitro* unabhängig von der vorliegenden Arbeit kürzlich CD8-positiv Alveolar- und Peritonealmakrophagen und zeigten, daß CD8-vermittelte Signaltransduktion *in vitro* zur Freisetzung von NO führt. Über die Produktion von NO könnten CD8-positiv Makrophagen somit zur Exazerbation der neuronalen Zellschädigung nach fokaler Ischämie beitragen.

Neben toxischen Effekten rückten insbesondere durch Befunde bei traumatischen Nerven- und Rückenmarksläsionen (Perry et al., 1987; David et al., 1990; Brown et al., 1991; Rapalino et al., 1998) zuletzt auch protektive und regenerationsfördernde Effekte von Entzündungsprozessen im Nervensystem in den Mittelpunkt des Interesses. Reparaturmechanismen nach fokalen Hirnläsionen umfassen u.a. die Entfernung nekrotischen Gewebsdebris (David et al., 1990), die Reorganisation der Extrazellulärmatrix (La Fleur et al., 1996; DiProspero et al., 1997) und die Proliferation reaktiver Astrozyten (Ridet et al., 1997). Makrophagen sind zur Produktion hierfür essentieller Moleküle wie den Matrixmetalloproteasen (Basbaum und Werb, 1996; La Fleur et al., 1996) und verschiedener Wachstumsfaktoren (Rappolee et al., 1988; Rappolee und Werb, 1992; Elkabes et al., 1996) in der Lage. Inflammatorische Mediatoren beeinflussen die Proliferation und biosynthetische Aktivität reaktiver Astro-

zyten (Yong et al., 1991; Balasingam et al., 1994; Balasingam und Yong, 1996; Smith und Hale, 1997), die im traumatisierten ZNS einerseits wachstumsinhibierende Barrieren ausbilden (Fitch und Silver, 1997), andererseits aber auch trophische Funktionen ausüben können (Ridet et al., 1997). Das Auftreten CD8-positiver Makrophagen ist in zeitlicher Hinsicht koinzident zur Induktion periläsioneller Astrozytenaktivierung nach fokaler Ischämie und in anderen Formen fokaler Hirnläsionen (Schroeter et al., 1995; Balasingam et al., 1996). In kortikalen Infarkten nach permanenter Mediaokklusion wurde kürzlich das Molekül Osteopontin nachgewiesen (Wang et al., 1998), das in verschiedenen Modellen experimenteller Gewebsnekrose eine Rolle bei postläsionellen Umbauvorgängen spielt (Murry et al., 1994; Weber und Cantor, 1996; Giachelli et al., 1998) und in vitro die Chemotaxis von Astrozyten auslöst (Wang et al., 1998). Interessanterweise wird Osteopontin in ischämischen Infarkten spezifisch von einer verzögert infiltrierenden Makrophagensubpopulation exprimiert, die ähnlich den CD8-positiven Makrophagen ihr Maximum gegen Ende der ersten Woche nach Ischämie erreicht (Wang et al., 1998). Ob beide Populationen identisch sind, muß durch weitere Doppelmarkierungsstudien geklärt werden.

Eine kritische Bedeutung für erfolgreiche Regeneration haben inflammatorische Mechanismen bei der Wallerschen Degeneration. Im Unterschied zum ZNS findet man im PNS nach Axotomie eine rasche und extensive Infiltration hämatogener Makrophagen in den degenerierenden Nervenabschnitt (Perry et al., 1987; Stoll et al., 1989a; George und Griffin, 1994). Die infiltrierenden Makrophagen werden als eine wichtige Voraussetzung für die erfolgreiche Nervenregeneration angesehen, da sie wachstumsinhibierenden Myelindebris entfernen (Stoll et al., 1989a; Savio und Schwab, 1989; David et al., 1990; Griffin et al., 1992) und über die Sekretion von IL-1 die Produktion des Nervenwachstumsfaktors anregen (Lindholm et al., 1987). Der Transfer von Makrophagen, die zuvor in Kokultur mit peripheren Nervensegmenten aktiviert wurden, erhöhte dementsprechend signifikant das Ausmaß axonaler Regeneration nach traumatischer Rückenmarksschädigung (Rapalino et al., 1998). Über-

raschenderweise fanden wir in eigenen neuesten Untersuchungen nach 'Crush'-Läsion des N. ischiadicus im Unterschied zum N. opticus eine massive Infiltration CD8-positiver Makrophagen, die am Ort der primären Axotomie bereits nach 24-48 Stunden, im distalen Nervenabschnitt jedoch erst in der zweiten Woche nach Läsion nachweisbar waren (Jander und Stoll, Manuskript in Vorbereitung). Angesichts dieser protrahierten Infiltrationskinetik liegt die Vermutung nahe, daß CD8-positive Makrophagen eine Rolle bei regenerationsfördernden Umbauvorgängen nach Nervenläsionen spielen könnten. Ob diese Befunde Rückschlüsse auf die Funktion CD8-positiver Makrophagen in ischämischen Hirnläsionen zulassen, ist derzeit offen und muß durch weitergehende funktionelle Analysen dieser Zellen geklärt werden.

#### 5.4 Zytokine als Regulatoren lokaler Entzündungsprozesse im ZNS: Vergleich zwischen autoimmuner Enzephalomyelitis und Ischämie

Die hochdifferentiellen zellulären Aktivierungsprozesse in ischämischen Läsionen legen effiziente regulatorische Mechanismen nahe, die einerseits die rasche Aktivierung inflammatorischer Effektor-Kaskaden bewirken, andererseits aber auch die zeitliche und räumliche Limitierung des postischämischen Entzündungsprozesses sicherstellen. Immunologische Regulationsvorgänge werden maßgeblich durch Zytokine vermittelt. Mechanismen der Induktion und spontanen Remission inflammatorischer ZNS-Prozesse lassen sich modellhaft bei der experimentell-autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) untersuchen, die bei der Lewisratte einen monophasischen Verlauf mit aktiver Krankheitsprogression zwischen dem 11. und 15. Tag nach Immunisierung und dann einsetzender Spontanremission bis zum 21. Tag aufweist. Aufgrund der somit klar definierten Verhältnisse verwendeten wir die EAE in der vorliegenden Arbeit als Bezugspunkt für die mittels RT-PCR vorgenommenen Zytokin mRNA-Bestimmungen bei der Ischämie.

Unsere Befunde zeigen, daß es sowohl bei der EAE als auch in den ischämischen Läsionen in einem relativ engen Zeitfenster zur massiven Induktion zahlreicher Zytokine und der induzierbaren Isoform der NO-Synthase (iNOS) kommt (Jander et al. 1998a; Jander und Stoll, 1998). Bei der EAE korrespondierte dieses Zeitfenster zum Stadium aktiver Krankheitsprogression zwischen dem 11. und 15. Tag nach Immunisierung und deckte sich weitgehend mit der histologisch zu beobachtenden zellulären Infiltration des Rückenmarkes durch aktivierte T-Zellen und Makrophagen. Kontrastierend hierzu erreichte die Zytokin- und iNOS-Induktion bei der Ischämie bereits innerhalb der ersten 24 Stunden ihr Maximum. Diesem Zeitraum entsprach auf zellulärer Ebene weitgehend die Aktivierung residenter Mikroglia (Schroeter, Jander et al., 1997), während die maximale Infiltration hämatogener Makrophagen ab dem dritten Tag mit einer Suppression aktiver Zytokin mRNA-Synthese assoziiert war. Diese Befunde legen nahe, daß der lokale Entzündungsprozeß bei der Ischämie im Unterschied zur EAE maßgeblich durch residente Zellen des ZNS induziert wird.

Die genauere Analyse des Zytokinmusters bei der EAE und Ischämie zeigte überraschenderweise, daß es in beiden Paradigmen zur frühen Koinduktion von IL-10 mRNA mit proinflammatorischen Zytokinen wie dem TNF- $\alpha$  und dem IL-1 $\beta$  kommt. IL-10 wurde im immunologischen Kontext als sog. 'cytokine synthesis inhibitor factor' entdeckt, der die Expression proinflammatorischer Zytokine und von MHC Klasse II-Antigenen inhibiert und hierüber potente antiinflammatorische Effekte ausübt (Moore et al., 1993). Bei der EAE könnte die frühe Induktion von IL-10 somit zur raschen Selbstlimitierung des monophasischen Entzündungsprozesses beitragen (Jander et al., 1998a). Diese Annahme wird auch durch neuere Befunde in IL-10 'knock-out'-Mäusen gestützt, bei denen die EAE durchweg schwerer als im korrespondierenden Wildtyp verläuft und insbesondere nicht spontan remittiert (Bettelli et al., 1998; Samoilova et al., 1998). Über seine primär immunologisch definierten Eigenschaften hinaus hemmt IL-10 die Produktion von NO und Superoxidradikalen in aktivierten Mikrogliazellen (Chao et al., 1995b; Lodge und Sriram, 1996), begrenzt *in vivo* das

Ausmaß posttraumatischer Gliosebildung (Balasingam und Yong, 1996) und fördert die Produktion neurotropher Faktoren wie dem NGF durch Astrozyten (Brodie, 1996). Bei der Ischämie könnte IL-10 deshalb zusätzlich auch die potentiell neurotoxischen Effekte postischämischer Inflammation begrenzen und strukturelle Reparaturprozesse begünstigen.

Im Unterschied zu allen anderen Zytokinen erfolgte die maximale Induktion der IL-12p40 mRNA bei der EAE signifikant verzögert zwischen dem 15. bis 18. Tag nach Immunisierung (Jander und Stoll, 1998). In diesem Stadium setzte klinisch bereits die Spontanremission der Erkrankung ein. IL-12 ist ein aus 2 kovalent verbundenen Untereinheiten bestehendes Dimer, das entweder als p35/40 Heterodimer oder als (p40)<sub>2</sub> Homodimer vorliegt (Gately et al., 1998). Während das p35/p40 Heterodimer proinflammatorische Eigenschaften aufweist und eine Schlüsselrolle bei der Induktion IFN- $\gamma$ -produzierender Th1-Zellen spielt (Trinchieri, 1993), übt das (p40)<sub>2</sub> Homodimer als kompetitiver IL-12-Antagonist immunsuppressive Funktionen aus (Ling et al., 1995). Die Regulation der IL-12-Bioaktivität erfolgt in erster Linie über die Modulation der p40-Untereinheit, da die p35-Kette in einer Vielzahl unterschiedlicher Zelltypen konstitutiv exprimiert wird (Gately et al., 1998). Bei der EAE etablierten Untersuchungen in IL-12-defizienten Mäusen eine kritische Rolle des p35/p40 Heterodimers für die periphere Aktivierung enzephalitogener Th1-Zellen (Segal et al. 1998). Im Gegensatz hierzu zeigten unsere Untersuchungen, daß die Induktion von IL-12p40 mRNA im ZNS bereits erkrankter Tiere mit der Herunterregulation des Th1-Zytokins IFN- $\gamma$  einherging. Es ist somit zu postulieren, daß die verzögerte Induktion von IL-12p40 mRNA zur Bildung eines Überschusses an (p40)<sub>2</sub> Homodimeren führt und damit zur Spontanremission des Entzündungsprozesses und Herunterregulation der IFN- $\gamma$  mRNA beiträgt. Bei der Ischämie erreichte die Expression der IL-12p40 mRNA ihr Maximum ebenfalls verzögert nach 16 bis 24 Stunden, so daß auch hier antiinflammatorische Effekte durch Bildung des (p40)<sub>2</sub> Homodimers möglich sind. Hierfür spricht auch die trotz signifikanter T-Zellinfiltration geringe Expression von

IFN- $\gamma$  mRNA in den ischämischen Läsionen. Direkte Hinweise für eine immunsuppressive Wirkung von IL-12p40-Homodimeren *in vivo* ergaben sich kürzlich im NOD-Mausmodell des Diabetes mellitus, in dem eine durch adenoviralen Gentransfer induzierte Überexpression von IL-12p40 in syngenem Inselzelltransplantat zur lokalen Herunterregulation von IFN- $\gamma$ , Induktion des immunsuppressiven Zytokins TGF- $\beta$  und Verhinderung der autoimmunen Transplantatzerstörung führte (Yasuda et al., 1998). Auch in ischämischen Läsionen kommt es im weiteren Verlauf der ersten Woche zur Expression von TGF- $\beta$  (Wang et al., 1995). Insgesamt ist somit von vielfältigen antiinflammatorischen Kontrollmechanismen auszugehen, die eine zeitliche und räumliche Limitierung des postischämischen Entzündungsprozesses sicherstellen.

#### 5.5 Differentielle Zytokin- und iNOS-Induktion im infarzierten und nichtinfarzierten Kortex: Die Rolle NMDA-Rezeptor-vermittelter Signaltransduktion

Funktionelle Studien beschrieben bislang sowohl neurotoxische als auch protektive Effekte inflammatorischer Zytokine bei der zerebralen Ischämie (Bruce et al., 1996; Ohtsuki et al., 1996; Barone et al., 1997; Nawashiro et al., 1997a; Nawashiro et al., 1997b). Die molekularen Grundlagen dieser paradoxen Zytokineffekte sind bislang weitgehend unverstanden. Bisherige Untersuchungen proinflammatorischer Zytokine wie dem IL-1 $\beta$  und dem TNF- $\alpha$  in Modellen fokaler Hirnischämie charakterisierten zwar den Zeitgang postischämischer Zytokininduktion, ließen das räumliche Verteilungsmuster der Faktoren jedoch unberücksichtigt. Fokale Hirnischämien führen bekanntermaßen nicht nur im Infarktareal selbst, sondern auch in nichtischämischen Arealen der ipsilateralen Hemisphäre zu weitreichenden zellulären und molekularen Veränderungen, zu denen die Aktivierung residenter Gliazellen und die Expression sog. 'immediate early genes' gehört (Gass et al., 1992; Schroeter et al., 1995; Schroeter et al., 1999). Diese läsionsfernen Aktivierungsvorgänge werden durch sog. 'Spreading depressions' (SD) vermittelt, die sich als repetitive Wellen spontaner De-

polarisation vom Infarktareal über die gesamte ipsilaterale Hemisphäre ausbreiten und durch den nichtkompetitiven NMDA-Antagonisten MK-801 effektiv unterdrückt werden können (Hossmann, 1996). Während SD in der Infarkttrandzone wahrscheinlich zur sekundären Exazerbation des ischämischen Gewebsschadens beitragen (Hossmann, 1994b), lösen sie im intakten Kortex paradoxerweise einen Zustand relativer Ischämietoleranz aus (Glazier et al., 1994; Kobayashi et al., 1995). Inwieweit die postischämische Zytokininduktion eine Rolle bei der Vermittlung dieser entgegengesetzten Effekte NMDA-vermittelter Signaltransduktion spielt, ist bislang unklar.

In der vorliegenden Arbeit stellten wir uns die Frage, ob es nach fokaler Ischämie als Grundlage möglicher protektiver Zytokineffekte auch in primär nichtischämischen Arealen zur Induktion inflammatorischer Genexpression kommt. Durch Untersuchungen im Photothrombosemodell konnten wir erstmals zeigen, daß im nichtinfarzierten ipsilateralen, nicht aber kontralateralen Kortex sowohl pro- ( $\text{TNF-}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$ ) als auch antiinflammatorische ( $\text{IL-10}$ ,  $\text{IL-12p40}$ ) Zytokine signifikant induziert werden. Interessanterweise blieb jedoch die Expression der iNOS mRNA zu allen Zeitpunkten streng auf die Läsion beschränkt, so daß zwischen infarziertem und nichtinfarziertem Kortex offensichtlich erhebliche Unterschiede in den nachgeschalteten inflammatorischen Effektor-kaskaden bestehen. Durch Vorbehandlung der Tiere mit dem nichtkompetitiven NMDA-Antagonisten MK-801 kam es insbesondere im läsionsfernen Kortex zur signifikanten Hemmung der Zytokinexpression. Hierdurch konnte erstmals eine Rolle NMDA-Rezeptor-vermittelter Signaltransduktion bei der Induktion inflammatorischer Genexpression nahegelegt werden.

In verschiedenen *in vitro*-Paradigmen wird das Ausmaß exzitotoxischer neuronaler Zellschädigung durch proinflammatorische Zytokine signifikant potenziert. Diese additive Neurotoxizität inflammatorischer Zytokine hängt in kritischer Weise von der Induktion der iNOS in aktivierten Gliazellen ab (Chao et al., 1992; Hewett et al., 1994; Chao et al., 1995a). In unseren Untersuchungen fanden wir in den Infarkten eine

frühe Koinduktion von IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  mRNA, die von einer leicht verzögerten iNOS-Induktion nach 16 Stunden gefolgt wurde. Im Unterschied zu den Infarkten ging die Zytokinexpression im nichtinfarzierten Kortex jedoch nicht mit einer Induktion der iNOS einher. Interessanterweise zeigen neuere *in vitro*-Befunde, daß die proinflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  in Abwesenheit von iNOS-Expression eher protektive als toxische Effekte ausüben können. So löst z.B. TNF- $\alpha$  einerseits zwar apoptotischen Zelltod aus (D'Souza et al., 1995; Talley et al., 1995), induziert andererseits aber auch protektive Gene, die die eigenen proapoptotischen Effekte antagonisieren (Van Antwerp et al., 1998). In neuronalen Zellkulturen verringert TNF- $\alpha$  das Ausmaß glutamatvermittelter und oxidativer Zellschädigung durch Stabilisierung der neuronalen Kalziumhomöostase und Induktion der radikalabbauenden Superoxiddismutase (Cheng et al., 1994; Mattson et al., 1997b). Auch für IL-1 $\beta$  wurden differentielle Effekte auf die Entwicklung neuronalen Zelltods *in vitro* beschrieben. Strijbos und Rothwell (1995) zeigten, daß eine 24-stündige Vorbehandlung intakter kortikaler Neurone mit IL-1 $\beta$  deren Schädigung durch nachfolgende Glutamat- oder NMDA-Exposition signifikant reduziert. Bei simultaner Gabe des IL-1 $\beta$  und des jeweiligen Neurotoxins blieb dieser protektive Effekt hingegen aus (Strijbos und Rothwell, 1995). In einer Studie von Friedlander et al. (1996) wurden bereits hypoxisch vorgeschädigte Neurone durch IL-1 $\beta$  beschleunigt in den apoptotischen Zelltod getrieben, intakte Neurone hiervor jedoch geschützt. Abhängig vom Ausmaß subletaler Vorschädigung erscheint IL-1 $\beta$  somit als positiver bzw. negativer Regulator neuronaler Apoptose.

Bei der zerebralen Ischämie könnte der Effekt proinflammatorischer Mediatoren wie dem TNF- $\alpha$  und dem IL-1 $\beta$  demzufolge in kritischer Weise von ihrer differentiellen Koexpression mit iNOS im ischämischen Fokus bzw. umgebenden nichtischämischen Arealen abhängen. In den Läsionen könnte die Koinduktion von IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  und iNOS zur sekundären Exazerbation ischämischer Zellschädigung führen. Hierfür sprechen auch Befunde in iNOS-defizienten Mäusen, die nach Mediaokklusion signi-

fikant kleinere Infarkte als der entsprechende Wildtyp ausbilden (Iadecola et al., 1997). Im nichtinfarzierten Kortex könnte die Induktion von TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  (und der antiinflammatorischen Zytokine IL-10 und IL-12p40) hingegen bei gleichzeitigem Fehlen signifikanter iNOS-Expression zur Toleranzentwicklung gegenüber erneuten ischämischen Episoden beitragen. Darüberhinaus könnten intakte Neurone in der primär nichtischämischen Umgebung der Infarkte durch Zytokine vor verzögertem Zelltod geschützt und so die Läsionsausdehnung in der postischämischen Periode begrenzt werden. Protektive Effekte endogener Zytokinexpression wurden bislang insbesondere durch Untersuchungen an TNF-Rezeptor-defizienten Mäusen nachgewiesen, die nach Mediaokklusion signifikant größere Läsionen als normale Wildtypmäuse entwickeln (Bruce et al., 1996; Gary et al., 1998).

Unser Befund einer Inhibition postischämischer Zytokininduktion durch den NMDA-Antagonisten MK-801 steht in prinzipieller Übereinstimmung mit den Ergebnissen anderer Autoren, die nach Injektion exzitotoxischer Substanzen im ZNS eine Hochregulation proinflammatorischer Zytokine nachweisen konnten (Minami et al., 1990; Minami et al., 1991; Yabuuchi et al., 1993; Hagan et al., 1996). In topographischer und zeitlicher Hinsicht fand sich in diesen früheren Studien jedoch durchweg eine enge Beziehung zwischen lokal auftretender Neurodegeneration und Zytokinexpression (Yabuuchi et al., 1993; Hagan et al., 1996). Somit blieb offen, ob die Zytokininduktion in diesen Paradigmen tatsächlich durch exzitotoxische Signalübertragung vermittelt wurde oder eine eher 'unspezifische' Folge neuronalen Zelluntergangs darstellte. Unsere Befunde zeigen demgegenüber, daß die Zytokinexpression gerade im nichtinfarzierten Kortex - der im Photothrombosemodell keinerlei neuronale Pathologie aufweist - durch MK-801 weitgehend inhibiert wird. Inflammatorische Genexpression ist durch NMDA-Rezeptor-vermittelte Signaltransduktion somit auch in Abwesenheit neuronalen Zelluntergangs aktivierbar. Im Unterschied zum läsionsfernen Kortex wurde die mRNA-Induktion in den Infarkten selbst durch MK-801 nur partiell

gehemmt, so daß hier offensichtlich zusätzliche läsionsspezifische Faktoren zur Induktion des lokalen Entzündungsprozesses beitragen.

Der genaue Mechanismus NMDA-Rezeptor-vermittelter Zytokininduktion ist derzeit unklar. Da mit der verwendeten RT-PCR-Technik eine Zytokinlokalisierung auf Einzelzellebene nicht möglich war, ist die zelluläre Quelle der Zytokine im nichtinfarzierten Kortex bislang noch unbekannt. *In vitro* können Mikroglia und Astrozyten (Chung und Benveniste, 1990; Lee et al., 1993) aber auch Neurone selbst (Freidin et al., 1992) inflammatorische Mediatoren wie TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  aktiv synthetisieren. Bisherige Untersuchungen zur Lokalisation von Zytokinen nach zerebraler Ischämie konzentrierten sich in erster Linie auf die läsionellen Expressionsmuster und erbrachten insgesamt widersprüchliche Ergebnisse, die vermutlich größtenteils durch unspezifische Bindung der jeweils verwendeten Antikörper bzw. Hybridisierungsproben zu erklären sind. So fanden Liu et al. (1994) im Falle des TNF- $\alpha$  eine überwiegend neuronale Lokalisation nach MCAO, während Buttini et al. (1996) TNF- $\alpha$  mRNA ausschließlich in Mikroglia nachwiesen und andere Autoren eine TNF- $\alpha$ -Expression in Neuronen und Astroglia (Gong et al., 1998) bzw. Neuronen, Mikroglia, Astrozyten, Endothelzellen und Granulozyten beschrieben (Botchkina et al., 1997). Die zelluläre Lokalisation von Glutamatrezeptoren des NMDA-Typs ist bislang ebenfalls nicht eindeutig geklärt. Mehrere Autoren sahen diesen Rezeptortyp als neuronenspezifisch an (Teichberg, 1991; Meldrum, 1995). Eine neuere Studie im Modell transienter Vorderhirnischämie wies verschiedene NMDA-Rezeptoruntereinheiten jedoch auch auf reaktiven Mikrogliazellen und Astrozyten nach (Gottlieb und Matute, 1997). Insgesamt ist somit derzeit offen, ob die von uns beobachtete NMDA-Rezeptor-abhängige Induktion von Zytokinen durch direkte intrazelluläre Signaltransduktion oder durch Interaktion zwischen Neuronen und umgebenden Gliazellen vermittelt wird.

## 5.6 Ausblick: Eine Rolle von Zytokinen für neuronale Dysfunktion und postläsionelle Plastizität?

Neuere Befunde von Neumann et al. (1995, 1997) und Corriveau et al. (1998) legen komplexe wechselseitige Beziehungen zwischen neuronaler Aktivität und immunologischen Regulationsmechanismen nahe. In der Umgebung fokal-ischämischer Hirnläsionen kommt es zu tiefgreifenden Änderungen des neuronalen Erregungszustandes, die wahrscheinlich weitreichende Konsequenzen für das funktionelle Gesamtergebnis nach zerebraler Ischämie haben (Witte und Stoll, 1997). Im Photothrombomodell findet man in läsionsfernen Arealen der ipsilateralen Hemisphäre eine Abnahme der Doppelpulsinhibition (Domann et al., 1993), eine verminderte Ausprägung inhibitorischer postsynaptischer Potentiale (Neumann-Haefelin et al., 1995) und eine Zunahme neuronaler Spontanaktivität (Schiene et al., 1996), die zusammengenommen für eine deutlich gesteigerte neuronale Erregbarkeit sprechen und auf der Ebene der Neurotransmittersysteme mit einer Dysregulation GABAerger Hemmung einhergehen (Neumann-Haefelin et al., 1998; Qü et al., 1998). Funktionell könnten derartige Veränderungen einerseits der Entstehung pathogener epileptiformer Aktivität Vorschub leisten. Interessanterweise führt *in vivo* die intrazerebrale Injektion von IL-1 $\beta$  zu einer signifikanten Zunahme kainatinduzierter epileptiformer EEG-Aktivität (Vezzani et al., 1999). Andererseits ist im periläsionellen nichtinfarzierten Kortex aber auch die Langzeitpotenzierung (LTP) synaptischer Transmission als ein grundlegender Mechanismus postläsioneller Plastizität verstärkt auslösbar (Hagemann et al., 1998). Schneider et al. (1998) zeigten kürzlich, daß die Expression von IL-1 $\beta$  mRNA in hippokampalen Schnittpräparaten *in vitro* durch die Erzeugung einer LTP NMDA-Rezeptor-abhängig verstärkt wurde. Umgekehrt interferierte die spezifische Inhibition des IL-1 $\beta$  mit der Aufrechterhaltung der LTP. Proinflammatorische Zytokine können somit prinzipiell auch komplexe Interaktionen in neuronalen Zellverbänden modulieren. Hieraus könnten sich neue Perspektiven für das pathogenetische Ver-

ständnis und die therapeutische Beeinflussung neuronaler Dysfunktion und funktio-  
neller Plastizität bei der fokal-ischämischen Hirnschädigung ergeben.

## 6. ZUSAMMENFASSUNG

Nach einer fokalen Ischämie des Gehirns kommt es zur verzögerten Exazerbation neuronalen Zelltods und zur Ausdehnung der Infarkte in ihre Randzone. Andererseits werden aber auch weitreichende strukturelle und funktionelle Adaptationsvorgänge induziert, die zu einer zumindest partiellen klinischen Erholung führen können. Die zugrundeliegenden Pathomechanismen sind auf zellulärer und molekularer Ebene weitgehend unbekannt.

In den letzten Jahren wurde zunehmend die Bedeutung inflammatorischer Prozesse für die Pathogenese neurodegenerativer Erkrankungen erkannt. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zum Verständnis entzündlicher Pathomechanismen im Sekundärstadium nach fokaler Hirnischämie beizutragen. Hierzu wurde eine eingehende Untersuchung der zellulären Reaktion und Zytokininduktion in experimentell induzierten Infarkten des Rattenkortex vorgenommen. Die fokale Ischämie wurde dabei einerseits invasiv durch direkte mikrochirurgische Okklusion der A. cerebri media ('middle cerebral artery occlusion' = MCAO), andererseits nichtinvasiv durch Photothrombose kortikaler Mikrogefäße ausgelöst. Da im Photothrombosemodell lokal scharf umgrenzte, gut reproduzierbare Läsionen entstehen, konnten hier Veränderungen im ischämischen Fokus selbst, seiner unmittelbaren Randzone und in weiter entfernt liegenden Regionen der gleichen Hemisphäre differentiell erfaßt werden. Die spezifischen Merkmale der postischämischen Entzündungsreaktion wurden durch die vergleichende Untersuchung autoimmuner und degenerativer Läsionsparadigmen definiert und in wesentlichen Aspekten an Autopsiepräparaten humaner Hirninfarkte nachvollzogen.

Unsere Ergebnisse zeigen, daß es in ischämischen Läsionen bereits nach 12 Stunden zu einer Infiltration polymorphkerniger Granulozyten kommt. Überraschenderweise fanden wir in beiden experimentellen Modellen erstmals eine signifikante T-

Zellinfiltration ischämischer Läsionen, die wir durch den Nachweis CD3 (T-Zell-Rezeptor)-positiver Lymphozyten in humanen Hirninfarkten bestätigen konnten. T-Zellen waren in den Infarkten erstmals nach 24 Stunden nachweisbar und erreichten ihr Maximum zum Beginn der zweiten Woche nach Ischämie. Hierbei wurden die Läsionen insbesondere im Bereich ihrer Randzone infiltriert, wo es parallel zur massiven Expression zahlreicher Immunaktivierungsmarker wie den MHC Klasse I- und II-Antigenen und dem Zelladhäsionsmolekül ICAM-1 kam. Verzögerter apoptotischer Zelltod war im Photothrombosemodell bis zum 6. Tag nach Ischämie nachweisbar und zeigte ab dem 2. Tag ebenfalls eine Konzentration in der Randzone der Infarkte. Postischämischer Zelltod erscheint somit als ein protrahierter Prozeß, der sich deutlich über das Stadium früher neuronaler Nekrose hinaus ausdehnt und durch den lokalen Entzündungsprozeß in der Infarkttrandzone kritisch beeinflusst werden könnte.

Im Vergleich zur Granulozyten- und T-Zellinfiltration verlief die Makrophagenantwort leicht verzögert und wurde sowohl durch phagozytische Transformation residenter Mikroglia als auch durch Infiltration hämatogener Makrophagen getragen. Da beide Zellpopulationen anhand immunhistochemischer Kriterien nicht unterschieden werden können, benutzten wir zur Klärung ihres differentiellen Beitrags eine liposomenvermittelte Makrophagendepletionstechnik, die reproduzierbar zur völligen Depletion peripherer Makrophagen führt, residente Mikroglia im ZNS jedoch unbeeinflusst läßt. Hiermit konnten wir im Photothrombosemodell zeigen, daß die initiale Phagozytenantwort nach fokaler Ischämie nahezu ausschließlich durch die Aktivierung residenter Mikroglia vonstatten geht, während hämatogene Makrophagen erst mit ca. 3-tägiger Verzögerung in die Läsionen rekrutiert werden.

Mittels konfokaler Lasermikroskopie konnten wir eine bislang nicht beschriebene Subpopulation CD8-positiver Makrophagen identifizieren, die in erheblichem Ausmaß ab dem 3. Tag in der Randzone der ischämischen Läsionen nachweisbar waren. Das CD8-Molekül wird in Makrophagen wahrscheinlich in Form des  $\alpha\beta$ -Heterodimers

exprimiert, das bislang ausschließlich auf zytotoxischen T-Zellen nachgewiesen wurde. CD4 wurde in den Läsionen auf einer distinkten Makrophagensubpopulation exprimiert, die erst gegen Ende der ersten Woche signifikant zunahm und im Unterschied zu den CD8-positiven Makrophagen auch das nekrotische Läsionszentrum infiltrierte. Im Unterschied zur Ischämie exprimierten Makrophagen in der normalen Milz und im Verlauf der autoimmunen Enzephalomyelitis und in degenerierenden Fasertrakten kein CD8. Insgesamt kommt es nach fokaler Ischämie also zu einer spezifischen Rekrutierung CD8-positiver Makrophagen, die eine unerwartete funktionelle Heterogenität aktivierter ZNS-Makrophagen nahelegt.

Um weitergehenden Aufschluß über die Regulation und funktionellen Auswirkungen postischämischer Inflammation zu erhalten, nahmen wir eine Analyse inflammatorischer Genexpression in den ischämischen Läsionen und ihrer Umgebung vor. Zur semiquantitativen Erfassung relativer mRNA-Level verwendeten wir eine reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)-Methode, die zunächst am Autoimmunmodell der experimentell-autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) etabliert wurde. Sowohl bei der EAE als auch in den ischämischen Läsionen fand sich eine Koinduktion verschiedener proinflammatorischer Zytokine mit dem antiinflammatorischen Zytokin IL-10. Leicht verzögert wurde die mRNA für die p40-Untereinheit des IL-12 induziert, das in Form des (p40)<sub>2</sub> Homodimers ebenfalls antiinflammatorische Eigenschaften hat. Die postischämische Zytokinexpression erfolgte insgesamt in einem engen Zeitfenster der ersten 24 Stunden nach Läsionsinduktion, d.h. lange bevor hämatogene Makrophagen das ZNS infiltrierten. Diese Befunde legen nahe, daß das ZNS offenbar intrinsisch zur Induktion postischämischer Inflammation in der Lage ist und darüberhinaus durch die frühe Induktion antiinflammatorischer Zytokine auch ihre autoregulatorische Begrenzung sicherstellt.

Im Photothrombosemodell konnten wir zeigen, daß sowohl pro- als auch antiinflammatorische Zytokine nicht nur im Infarkt und seiner unmittelbaren Randzone, sondern

in signifikantem Ausmaß auch in nichtinfarzierten Arealen der gesamten ipsilateralen Hemisphäre induziert werden. Kontralateral kam es hingegen zu keiner signifikanten Zytokininduktion. Die läsionsferne Zytokininduktion war durch Vorbehandlung mit dem NMDA-Antagonisten MK-801 nahezu vollständig inhibierbar, so daß sie maßgeblich durch sog. 'Spreading depressions' (SD) vermittelt wird. SD breiten sich vom Infarktareal als Wellen spontaner Depolarisation über die ipsilaterale Hemisphäre aus und induzieren in primär nichtischämischen Kortexarealen einen Zustand relativer Ischämietoleranz. Interessanterweise war lediglich die Zytokininduktion im Infarktareal von einer Expression der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) begleitet, während im nichtinfarzierten Kortex zu keinem Zeitpunkt iNOS mRNA detektierbar war. Es ist somit zu postulieren, daß inflammatorische Genexpression im Infarktareal zu NO-vermittelter sekundärer Neurotoxizität führt, während sie im intakten Kortex eher mit protektiven Effekten assoziiert ist.

Insgesamt zeigt die vorliegende Arbeit, daß fokale kortikale Ischämie ein komplexes Netzwerk inflammatorischer Effektormechanismen aktiviert. Die Regulation dieses Netzwerks erfolgt unter dem Einfluß NMDA-Rezeptor-vermittelter Signaltransduktion maßgeblich durch intrinsisch im ZNS gebildete Zytokine. Der Nettoeffekt postischämischer Inflammation wird wahrscheinlich durch die zeitlich und räumlich differenzierte Aktivierung zytotoxischer bzw. protektiver Sekundärkaskaden bestimmt, deren Identifizierung und gezielte Modulation neue Perspektiven für Behandlung des ischämischen Insultes beim Menschen eröffnen könnte.

## 7. LITERATUR

- Abbas, A.K., Murphy, K.M., Sher, A. (1996) Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 383, 787-793.
- Altmann, D.M., Hogg, N., Trowsdale, J., Wilkinson, D. (1989) Cotransfection of ICAM-1 and HLA-DR reconstitutes human antigen-presenting cell function in mouse L cells. *Nature* 338, 512-514.
- Baird, A.E., Benfield, A., Schlaug, G., Siewert, B., Lövblad, K.-O., Edelman, R.R., Warach, S. (1997) Enlargement of human cerebral ischemic lesion volumes measured by diffusion-weighted magnetic resonance imaging. *Ann. Neurol.* 41, 581-589.
- Balasingam, V., Tejada-Berges, T., Wright, E., Bouckova, R., Yong, V.W. (1994) Reactive astrogliosis in the neonatal mouse brain and its modulation by cytokines. *J. Neurosci.* 14, 846-856.
- Balasingam, V., Dickson, K., Brade, A., Yong, V.W. (1996) Astrocyte reactivity in neonatal mice: apparent dependence on the presence of reactive microglia/macrophages. *Glia* 18, 11-26.
- Balasingam, V., Yong, V.W. (1996) Attenuation of astroglial reactivity by interleukin-10. *J. Neurosci.* 16, 2945-2955.
- Banati, R.B., Gehrmann, J., Schubert, P., Kreutzberg, G.W. (1993) Cytotoxicity of microglia. *Glia* 7, 111-118.
- Barclay, A.N. (1981) The localization of populations of lymphocytes by monoclonal antibodies in rat lymphoid tissues. *Immunology* 42, 593-600.
- Barone, F.C., Arvin, B., White, R.F., Miller, A., Webb, C.L., Willette, R.N., Lysko, P.G., Feuerstein, G.Z. (1997) Tumor necrosis factor- $\alpha$ : a mediator of focal ischemic brain injury. *Stroke* 28, 1233-1244.
- Basbaum, C.B., Werb, Z. (1996) Focalized proteolysis: spatial and temporal regulation of extracellular matrix degradation at the cell surface. *Curr. Opin. Cell Biol.* 8, 731-738.
- Bauer, J., Huitinga, I., Zhao, W., Lassmann, H., Hickey, W.F., Dijkstra, C.D. (1995) The role of macrophages, perivascular cells, and microglial cells in the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Glia* 15, 437-446.
- Becker, K.J., McCarron, R.M., Ruetzler, C., Laban, O., Sternberg, E., Flanders, K.C., Hallenbeck, J.M. (1997) Immunologic tolerance to myelin basic protein decreases stroke size after transient focal cerebral ischemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 10873-10878.
- Bederson, J.B., Pitts, L.H., Tsuji, M., Nishimura, M.C., Davis, R.L., Bartkowski, H. (1986) Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination. *Stroke* 17, 472-476.
- Bettelli, E., Das, M.P., Howard, E.D., Weiner, H.L., Sobel, R.A., Kuchroo, V.K. (1998) IL-10 is crucial in the regulation of autoimmune encephalomyelitis as demonstrated by studies of IL-10- and IL-4-deficient and transgenic mice. *J. Immunol.* 161, 3299-3306.

- Boje, K.M., Arora, P.K. (1992) Microglial-produced nitric oxide and reactive nitrogen oxides mediate neuronal cell death. *Brain Res.* 587, 250-256.
- Botchkina, G.I., Meistrell, M.E., III, Botchkina, I.L., Tracey, K.J. (1997) Expression of TNF and TNF receptors (p55 and p75) in the rat brain after focal cerebral ischemia. *Mol. Med.* 3, 765-781.
- Braun, J.S., Jander, S., Schroeter, M., Witte, O.W., Stoll, G. (1996) Spatiotemporal relationship of apoptotic cell death to lymphomonocytic infiltration in photochemically induced focal ischemia of the rat cerebral cortex. *Acta Neuropathol.* 92, 255-263.
- Brodie, C. (1996) Differential effects of Th1 and Th2 derived cytokines on NGF synthesis by mouse astrocytes. *FEBS Lett.* 394, 117-120.
- Brown, M.C., Perry, V.H., Lunn, E.R., Gordon, S., Heumann, R. (1991) Macrophage dependence of peripheral sensory nerve regeneration: possible involvement of nerve growth factor. *Neuron* 6, 359-370.
- Bruce, A.J., Boling, W., Kindy, M.S., Peschon, J., Kraemer, P.J., Carpenter, M.K., Holtsberg, F.W., Mattson, M.P. (1996) Altered neuronal and microglial responses to excitotoxic and ischemic brain injury in mice lacking TNF receptors. *Nat. Med.* 2, 788-794.
- Bursch, W., Paffe, S., Putz, B., Barthel, G., Schulte-Hermann, R. (1990) Determination of the length of the histological stages of apoptosis in normal liver and in altered hepatic foci of rats. *Carcinogenesis* 11, 847-853.
- Butcher, E.C. (1991) Leucocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell* 67, 1033-1036.
- Buttini, M., Appel, K., Sauter, A., Gebicke-Haerter, P.J., Boddeke, H.W. (1996) Expression of tumor necrosis factor  $\alpha$  after focal cerebral ischaemia in the rat. *Neuroscience* 71, 1-16.
- Buttini, M., Westland, C.E., Masliah, E., Yafeh, A.M., Wyss-Coray, T., Mucke, L. (1998) Novel role of human CD4 molecule identified in neurodegeneration. *Nat. Med.* 4, 441-446.
- Cannella, B., Cross, A.H., Raine, C.S. (1990) Upregulation and coexpression of adhesion molecules correlate with relapsing autoimmune demyelination in the central nervous system. *J. Exp. Med.* 172, 1521-1524.
- Cattoretti, G., Pileri, S., Parravicini, C., Becker, M.H.G., Poggi, S., Bifulco, C., Key, G., D'Amato, L., Sabattini, E., Feudale, E., Reynolds, F., Gerdes, J., Rilke, F. (1993) Antigen unmasking on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections. *J. Pathol.* 171, 83-98.
- Chambers, W.H., Vujanovic, N.L., DeLeo, A.B., Olszowy, M.W., Herberman, R.B., Hiserodt, J.C. (1989) Monoclonal antibody to a triggering structure expressed on rat natural killer cells and adherent lymphokine-activated killer cells. *J. Exp. Med.* 169, 1373-1389.
- Chao, C.C., Hu, S., Molitor, T.W., Shaskan, E.G., Peterson, P.K. (1992) Activated microglia mediate neuronal cell injury via a nitric oxide mechanism. *J. Immunol.* 149, 2736-2741.

- Chao, C.C., Hu, S., Ehrlich, L., Peterson, P.K. (1995a) Interleukin-1 and tumor necrosis factor- $\alpha$  synergistically mediate neurotoxicity: involvement of nitric oxide and of N-methyl-D-aspartate receptors. *Brain Behav. Immun.* 9, 355-365.
- Chao, C.C., Hu, S., Peterson, P.K. (1995b) Modulation of human microglial cell superoxide production by cytokines. *J. Leukocyte Biol.* 58, 65-70.
- Charriaut-Marlangue, C., Margaille, I., Plotkine, M., Ben-Ari, Y. (1995) Early endonuclease activation following reversible focal ischemia in the rat brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 15, 385-388.
- Chen, H., Chopp, M., Zhang, R.L., Bodzin, G., Chen, Q., Rusche, J.R., Todd, R.F., III. (1994) Anti-CD11b monoclonal antibody reduces ischemic cell damage after transient focal cerebral ischemia in rat. *Ann. Neurol.* 35, 458-463.
- Cheng, B., Christakos, S., Mattson, M.P. (1994) Tumor necrosis factors protect neurons against metabolic-excitotoxic insults and promote maintenance of calcium homeostasis. *Neuron* 12, 139-153.
- Choi, D.W., Rothman, S.M. (1990) The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death. *Annu. Rev. Neurosci.* 13:171-82, 171-182.
- Chopp, M., Li, Y., Jiang, N., Zhang, R.L., Probstak, J. (1996) Antibodies against adhesion molecules reduce apoptosis after transient middle cerebral artery occlusion in rat brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 16, 578-584.
- Chung, I.Y., Benveniste, E.N. (1990) Tumor necrosis factor- $\alpha$  production by astrocytes: induction by lipopolysaccharide, IFN- $\gamma$ , and IL-1 $\beta$ . *J. Immunol.* 144, 2999-3007.
- Clark, R.K., Lee, E.V., Fish, C.J., White, R.F., Price, W.J., Jonak, Z.L., Feuerstein, G.Z., Barone, F.C. (1993) Development of tissue damage, inflammation and resolution following stroke: an immunohistochemical and quantitative planimetric study. *Brain Res. Bull.* 31, 565-572.
- Connolly, E.S., Jr., Winfree, C.J., Springer, T.A., Naka, Y., Liao, H., Yan, S.D., Stern, D.M., Solomon, R.A., Gutierrez-Ramos, J.-C., Pinsky, D.J. (1996) Cerebral protection in homozygous null ICAM-1 mice after middle cerebral artery occlusion: role of neutrophil adhesion in the pathogenesis of stroke. *J. Clin. Invest.* 97, 209-216.
- Corriveau, R.A., Huh, G.S., Shatz, C.J. (1998) Regulation of class I MHC gene expression in the developing and mature CNS by neural activity. *Neuron* 21, 505-520.
- D'Souza, S., Alinauskas, K., McCrea, E., Goodyer, C., Antel, J.P. (1995) Differential susceptibility of human CNS-derived cell populations to TNF-dependent and independent immune-mediated injury. *J. Neurosci.* 15, 7293-7300.
- David, S., Bouchard, C., Tsatas, O., Giftochristos, N. (1990) Macrophages can modify the nonpermissive nature of the adult mammalian central nervous system. *Neuron* 5, 463-469.
- Dietrich, W.D., Ginsberg, M.D., Busto, R., Watson, B.D. (1986a) Photochemically induced cortical infarction in the rat. 1. Time course of hemodynamic consequences. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 6, 184-194.

- Dietrich, W.D., Ginsberg, M.D., Busto, R., Watson, B.D. (1986b) Photochemically induced cortical infarction in the rat. 2. Acute and subacute alterations in local glucose utilization. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 6, 195-202.
- Dijkstra, C.D., Döpp, E.A., Joling, P., Kraal, G. (1985) The heterogeneity of mononuclear phagocytes in lymphoid organs: distinct macrophage subpopulations in the rat recognized by monoclonal antibodies ED1, ED2 and ED3. *Immunology* 54, 589-599.
- DiProspero, N.A., Meiners, S., Geller, H.M. (1997) Inflammatory cytokines interact to modulate extracellular matrix and astrocytic support of neurite outgrowth. *Exp. Neurol.* 148, 628-639.
- Domann, R., Hagemann, G., Kraemer, M., Freund, H.-J., Witte, O.W. (1993) Electrophysiological changes in the surrounding brain tissue of photochemically induced cortical infarcts in the rat. *Neurosci.Lett.* 155, 69-72.
- Elkabes, S., DiCicco-Bloom, E.M., Black, I.B. (1996) Brain microglia/macrophages express neurotrophins that selectively regulate microglial proliferation and function. *J. Neurosci.* 16, 2508-2521.
- Fitch, M.T., Silver, J. (1997) Glial cell extracellular matrix: boundaries for axon growth in development and regeneration. *Cell Tissue Res.* 290, 379-384.
- Flaris, N.A., Densmore, T.L., Molleston, M.C., Hickey, W.F. (1993) Characterization of microglia and macrophages in the central nervous system of rats: definition of the differential expression of molecules using standard and novel monoclonal antibodies in normal CNS and in four models of parenchymal reaction. *Glia* 7, 34-40.
- Freidin, M., Bennett, M.V.L., Kessler, J.A. (1992) Cultured sympathetic neurons synthesize and release the cytokine interleukin 1 $\beta$ . *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 10440-10443.
- Friedlander, R.M., Gagliardini, V., Rotello, R.J., Yuan, J. (1996) Functional role of interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) in IL-1 $\beta$ -converting enzyme-mediated apoptosis. *J. Exp. Med.* 184, 717-724.
- Fritz, R.B., McFarlin, D.E. (1989) Encephalitogenic epitopes of myelin basic protein. *Chem. Immunol.* 46, 101-125.
- Furlan, M., Marchal, G., Viader, F., Derlon, J.M., Baron, J.C. (1996) Spontaneous neurological recovery after stroke and the fate of the ischemic penumbra. *Ann. Neurol.* 40, 216-226.
- Garcia, J.H., Yoshida, Y., Chen, H., Li, Y., Zhang, Z.G., Lian, J., Chen, S., Chopp, M. (1993) Progression from ischemic injury to infarct following middle cerebral artery occlusion in the rat. *Am. J. Pathol.* 142, 623-635.
- Garcia, J.H., Liu, K.F., Yoshida, Y., Lian, J., Chen, S., Del Zoppo, G.J. (1994) Influx of leucocytes and platelets in an evolving brain infarct (Wistar rat). *Am. J. Pathol.* 144, 188-199.
- Gary, D.S., Bruce-Keller, A.J., Kindy, M.S., Mattson, M.P. (1998) Ischemic and excitotoxic brain injury is enhanced in mice lacking the p55 tumor necrosis factor receptor. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 18, 1283-1287.
- Gass, P., Spranger, M., Herdegen, T., Bravo, R., Kock, P., Hacke, W., Kiessling, M. (1992) Induction of FOS and JUN proteins after focal ischemia in the rat: diffe-

- rential effect of the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist MK- 801. *Acta Neuropathol.* 84, 545-553.
- Gately, M.K., Renzetti, L.M., Magram, J., Stern, A.S., Adorini, L., Gubler, U., Presky, D.H. (1998) The interleukin-12/interleukin-12-receptor system: role in normal and pathologic immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 16:495-521, 495-521.
- Gavrieli, Y., Sherman, Y., Ben-Sasson, S.A. (1992) Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell Biol.* 119, 493-501.
- George, R., Griffin, J.W. (1994) Delayed macrophage responses and myelin clearance during wallerian degeneration in the central nervous system: the dorsal radiculotomy model. *Exp. Neurol.* 129, 225-236.
- Germain, R.N. (1994) MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation. *Cell* 76, 287-299.
- Giachelli, C.M., Lombardi, D., Johnson, R.J., Murry, C.E., Almeida, M. (1998) Evidence for a role of osteopontin in macrophage infiltration in response to pathological stimuli in vivo. *Am. J. Pathol.* 152, 353-358.
- Ginsberg, M.D., Pulsinelli, W.A. (1994) The ischemic penumbra, injury thresholds, and the therapeutic window for acute stroke. *Ann. Neurol.* 36, 553-554.
- Giulian, D., Corpuz, M., Chapman, S., Mansouri, M., Robertson, C. (1993) Reactive mononuclear phagocytes release neurotoxins after ischemic and traumatic injury to the central nervous system. *J. Neurosci. Res.* 36, 681-693.
- Giulian, D., Robertson, C. (1990) Inhibition of mononuclear phagocytes reduces ischemic injury in the spinal cord. *Ann. Neurol.* 27, 33-42.
- Glazier, S.S., O'Rourke, D.M., Graham, D.I., Welsh, F.A. (1994) Induction of ischemic tolerance following brief focal ischemia in rat brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 14, 545-553.
- Gong, C., Qin, Z., Betz, A.L., Liu, X.H., Yang, G.Y. (1998) Cellular localization of tumor necrosis factor  $\alpha$  following focal cerebral ischemia in mice. *Brain Res.* 801, 1-8.
- Gottlieb, M., Matute, C. (1997) Expression of ionotropic glutamate receptor subunits in glial cells of the hippocampal CA1 area following transient forebrain ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 17, 290-300.
- Griffin, J.W., George, R., Lobato, C., Tyor, W.R., Yan, L.C., Glass, J.D. (1992) Macrophage responses and myelin clearance during Wallerian degeneration: relevance to immune-mediated demyelination. *J. Neuroimmunol.* 40, 153-166.
- Gross, C.E., Bednar, M.M., Howard, D.B., Sporn, M.B. (1993) Transforming growth factor- $\beta$ 1 reduces infarct size after experimental cerebral ischemia in a rabbit model. *Stroke* 24, 558-562.
- Hagan, P., Poole, S., Bristow, A.F., Tilders, F., Silverstein, F.S. (1996) Intracerebral NMDA injection stimulates production of interleukin-1  $\beta$  in perinatal rat brain. *J. Neurochem.* 67, 2215-2218.
- Hagemann, G., Redecker, C., Neumann-Haefelin, T., Freund, H.J., Witte, O.W. (1998) Increased long-term potentiation in the surround of experimentally induced focal cortical infarction. *Ann. Neurol.* 44, 255-258.

- Heese, K., Hock, C., Otten, U. (1998) Inflammatory signals induce neurotrophin expression in human microglial cells. *J. Neurochem.* 70, 699-707.
- Heiss, W.D., Huber, M., Fink, G.R., Herholz, K., Pietrzyk, U., Wagner, R., Wienhard, K. (1992) Progressive derangement of periinfarct viable tissue in ischemic stroke. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 12, 193-203.
- Hewett, S.J., Csernansky, C.A., Choi, D.W. (1994) Selective potentiation of NMDA-induced neuronal injury following induction of astrocytic iNOS. *Neuron* 13, 487-494.
- Hickey, W.F., Gonatas, N.K., Kimura, H., Wilson, D.B. (1983) Identification and quantitation of T lymphocyte subsets found in the spinal cord of the Lewis rat during acute experimental allergic encephalomyelitis. *J. Immunol.* 131, 2805-2809.
- Hickey, W.F., Hsu, B.L., Kimura, H. (1991) T-lymphocyte entry into the central nervous system. *J. Neurosci. Res.* 28, 154-160.
- Hirji, N., Lin, T.-J., Befus, A.D. (1997) A novel CD8 molecule expressed by alveolar and peritoneal macrophages stimulates nitric oxide production. *J. Immunol.* 158, 1833-1840.
- Hirji, N., Lin, T.-J., Bissonnette, E., Belosevic, M., Befus, A.D. (1998) Mechanisms of macrophage stimulation through CD8: macrophage CD8 $\alpha$  and CD8 $\beta$  induce nitric oxide production and associated killing of the parasite *Leishmania major*. *J. Immunol.* 160, 6004-6011.
- Hirschberg, D.L., Moalem, G., He, J., Mor, F., Cohen, I.R., Schwartz, M. (1998) Accumulation of passively transferred primed T cells independently of their antigen specificity following central nervous system trauma. *J. Neuroimmunol.* 89, 88-96.
- Hossmann, K.A. (1994a) Viability thresholds and the penumbra of focal ischemia. *Ann. Neurol.* 36, 557-565.
- Hossmann, K.A. (1994b) Glutamate-mediated injury in focal cerebral ischemia: the excitotoxin hypothesis revised. *Brain Pathol.* 4, 23-36.
- Hossmann, K.A. (1996) Periinfarct depolarizations. *Cerebrovasc. Brain Metab. Rev.* 8, 195-208.
- Huitinga, I., Van Rooijen, N., De Groot, C.J.A., Uitdehaag, B.M.J., Dijkstra, C.D. (1990) Suppression of experimental allergic encephalomyelitis in lewis rats after elimination of macrophages. *J. Exp. Med.* 172, 1025-1033.
- Iadecola, C., Zhang, F., Casey, R., Nagayama, M., Ross, M.E. (1997) Delayed reduction of ischemic brain injury and neurological deficits in mice lacking the inducible nitric oxide synthase gene. *J. Neurosci.* 17, 9157-9164.
- Issazadeh, S., Ljungdahl, A., Höjeberg, B., Mustafa, M., Olsson, T. (1995) Cytokine production in the central nervous system of Lewis rats with experimental autoimmune encephalomyelitis: dynamics of mRNA expression for interleukin-10, interleukin-12, cytolytic, tumor necrosis factor  $\alpha$  and tumor necrosis factor  $\beta$ . *J. Neuroimmunol.* 61, 205-212.
- Jander, S., Kraemer, M., Schroeter, M., Witte, O.W., Stoll, G. (1995) Lymphocytic infiltration and expression of intercellular adhesion molecule-1 in photochemically induced ischemia of the rat cortex. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 15, 42-51.

- Jander, S., Pohl, J., D'Urso, D., Gillen, C., Stoll, G. (1998a) Time course and cellular localization of interleukin-10 mRNA and protein expression in autoimmune inflammation of the rat central nervous system. *Am. J. Pathol.* 152, 975-982.
- Jander, S., Schroeter, M., D'Urso, D., Gillen, C., Witte, O.W., Stoll, G. (1998b) Focal ischaemia of the rat brain elicits an unusual inflammatory response: early appearance of CD8+ macrophages/microglia. *Eur. J. Neurosci.* 10, 680-688.
- Jander, S., Stoll, G. (1996) Downregulation of microglial keratan sulfate proteoglycans coincident with lymphomonocytic infiltration of the rat central nervous system. *Am. J. Pathol.* 148, 71-78.
- Jander, S., Stoll, G. (1998) Differential induction of interleukin-12, interleukin-18, and interleukin-1 $\beta$  converting enzyme mRNA in experimental autoimmune encephalomyelitis of the Lewis rat. *J. Neuroimmunol.*, 91, 93-99.
- Janeway, C.A., Jr. (1992) The T cell receptor as a multicomponent signalling machine: CD4/CD8 coreceptors and CD45 in T cell activation. *Annu. Rev. Immunol.* 10, 645-674.
- Jeffries, W.A., Green, J.R., Williams, A.F. (1985) Authentic T helper CD4 (W3/25) antigen on rat peritoneal macrophages. *J. Exp. Med.* 162, 117-127.
- Johnson, P., Gagnon, J., Barclay, A.N., Williams, A.F. (1985) Purification, chain separation and sequence of the MRC OX-8 antigen, a marker of rat cytotoxic T lymphocytes. *EMBO J.* 4, 2539-2545.
- Kennedy, M.K., Torrance, D.S., Picha, K.S., Mohler, K.M. (1992) Analysis of cytokine mRNA expression in the central nervous system of mice with experimental autoimmune encephalomyelitis reveals that IL-10 mRNA expression correlates with recovery. *J. Immunol.* 149, 2496-2505.
- Kerschensteiner, M., Gallmeier, E., Behrens, L., Leal, V.V., Misgeld, T., Klinkert, W.E., Kolbeck, R., Hoppe, E., Oropeza-Wekerle, R.L., Bartke, I., Stadelmann, C., Lassmann, H., Wekerle, H., Hohlfeld, R. (1999) Activated human T cells, B cells, and monocytes produce brain-derived neurotrophic factor in vitro and in inflammatory brain lesions: a neuroprotective role of inflammation? *J. Exp. Med.* 189, 865-870.
- Kobayashi, S., Harris, V.A., Welsh, F.A. (1995) Spreading depression induces tolerance of cortical neurons to ischemia in rat brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 15, 721-727.
- Kreutzberg, G.W. (1996) Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci.* 19, 312-318.
- La Fleur, M., Underwood, J.L., Rappolee, D.A., Werb, Z. (1996) Basement membrane and repair of injury to peripheral nerve: defining a potential role for macrophages, matrix metalloproteinases, and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1. *J. Exp. Med.* 184, 2311-2326.
- Lawetzky, A., Tiefenthaler, G., Kubo, R., Hünig, T. (1990) Identification and characterization of rat T cell subpopulations expressing T cell receptors  $\alpha/\beta$  and  $\gamma/\delta$ . *Eur. J. Immunol.* 20, 343-349.
- Lee, S.C., Liu, W., Dickson, D.W., Brosnan, C.F., Berman, J.W. (1993) Cytokine production by human fetal microglia and astrocytes: differential induction by lipopolysaccharide and IL-1 $\beta$ . *J. Immunol.* 150, 2659-2667.

- Lees, G.J. (1993) The possible contribution of microglia and macrophages to delayed neuronal death after ischemia. *J. Neurol. Sci.* 114, 119-122.
- Li, Y., Sharov, V.G., Jiang, N., Zalao, C., Sabbah, H.N., Chopp, M. (1995) Ultrastructural and light microscopic evidence of apoptosis after middle cerebral artery occlusion in the rat. *Am. J. Pathol.* 146, 1045-1051.
- Linda, H., Hammarberg, H., Cullheim, S., Levinovitz, A., Khademi, M., Olsson, T. (1998) Expression of MHC class I and  $\beta$ 2-microglobulin in rat spinal motoneurons: regulatory influences by IFN- $\gamma$  and axotomy. *Exp. Neurol.* 150, 282-295.
- Lindholm, D., Heumann, R., Meyer, M., Thoenen, H. (1987) Interleukin-1 regulates synthesis of nerve growth factor in non-neuronal cells of rat sciatic nerve. *Nature* 330, 658-659.
- Ling, P., Gately, M.K., Gubler, U., Stern, A.S., Lin, P., Hollfelder, K., Su, C., Pan, Y.-C.E., Hakimi, J. (1995) Human IL-12 p40 homodimer binds to the IL-12 receptor but does not mediate biologic activity. *J. Immunol.* 154, 116-127.
- Linnik, M.D., Zobrist, R.H., Hatfield, M.D. (1993) Evidence supporting a role for programmed cell death in focal cerebral ischemia in rats. *Stroke* 24, 2002-2009.
- Liu, T., McDonnell, P.C., Young, P.R., White, R.F., Siren, A.L., Hallenbeck, J.M., Barone, F.C., Feuerstein, G.Z. (1993) Interleukin-1 $\beta$  mRNA expression in ischemic rat cortex. *Stroke* 24, 1746-1751.
- Liu, T., Clark, R.K., McDonnell, P.C., Young, P.R., White, R.F., Barone, F.C., Feuerstein, G.Z. (1994) Tumor necrosis factor- $\alpha$  expression in ischemic neurons. *Stroke* 25, 1481-1488.
- Lodge, P.A., Sriram, S. (1996) Regulation of microglial activation by TGF- $\beta$ , IL-10, and CSF-1. *J. Leukoc. Biol.* 60, 502-508.
- London, J.A., Biegel, D., Pachter, J.S. (1996) Neurocytopathic effects of  $\beta$ -amyloid-stimulated monocytes: a potential mechanism for central nervous system damage in Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 4147-4152.
- Matsumoto, Y., Hara, N., Tanaka, R., Fujiwara, M. (1986) Immunohistochemical analysis of the rat central nervous system during experimental allergic encephalomyelitis, with special reference to Ia-positive cells with dendritic morphology. *J. Immunol.* 136, 3668-3676.
- Matsumoto, Y., Fujiwara, M. (1986) In situ detection of class I and II major histocompatibility complex antigens in the rat central nervous system during experimental allergic encephalomyelitis: an immunohistochemical study. *J. Neuroimmunol.* 12, 265-277.
- Matsushima, G.K., Taniike, M., Glimcher, L.H., Grusby, M.J., Frelinger, J.A., Suzuki, K., Ting, J.P.-Y. (1994) Absence of MHC class II molecules reduces CNS demyelination, microglial/macrophage infiltration, and twitching in murine globoid cell leukodystrophy. *Cell* 78, 645-656.
- Matsuura, A., Murakami, T., Kozutsumi, D., Kinebuchi, M., Onodera, K., Kon, S., Kikuchi, K. (1993) Molecular cloning of cDNA encoding rat homologue of CD5 and CD8 $\alpha$ : evidence that R1-3B3 and R1-10B5 monoclonal antibodies detect rat CD5 and CD8 antigens, respectively. *Transplantation Proc.* 25, 2793-2794.

- Mattson, M.P., Barger, S.W., Furukawa, K., Bruce, A.J., Wyss-Coray, T., Mark, R.J., Mucke, L. (1997a) Cellular signaling roles of TGF $\beta$ , TNF $\alpha$  and  $\beta$ APP in brain injury responses and Alzheimer's disease. *Brain Res. Rev.* 23, 47-61.
- Mattson, M.P., Goodman, Y., Luo, H., Fu, W., Furukawa, K. (1997b) Activation of NF- $\kappa$ B protects hippocampal neurons against oxidative stress-induced apoptosis: evidence for induction of manganese superoxide dismutase and suppression of peroxynitrite production and protein tyrosine nitration. *J. Neurosci. Res.* 49, 681-697.
- Mattson, M.P., Cheng, B. (1993) Growth factors protect neurons against excitotoxic/ischemic damage by stabilizing calcium homeostasis. *Stroke* 24 suppl, I-136-I-140.
- Meda, L., Cassatella, M.A., Szendrei, G.I., Otvos, L., Jr., Baron, P., Villalba, M., Ferrari, D., Rossi, F. (1995) Activation of microglial cells by  $\beta$ -amyloid protein and interferon- $\gamma$ . *Nature* 374, 647-650.
- Mehler, M., Kessler, J.A. (1997) Hematolymphopoietic and inflammatory cytokines in neural development. *Trends Neurosci.* 20, 357-365.
- Meldrum, B.S. (1995) Excitatory amino acid receptors and their role in epilepsy and cerebral ischemia. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 757:492-505, 492-505.
- Merrill, J.E., Benveniste, E.N. (1996) Cytokines in inflammatory brain lesions: helpful and harmful. *Trends Neurosci.* 19, 331-338.
- Miller, A., Lider, O., Roberts, A.B., Sporn, M.B., Weiner, H.L. (1992) Suppressor T cells generated by oral tolerization to myelin basic protein suppress both in vitro and in vivo immune responses by the release of transforming growth factor  $\beta$  after antigen-specific triggering. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 421-425.
- Minami, M., Kuraishi, Y., Yamaguchi, T., Nakai, S., Hirai, Y., Satoh, M. (1990) Convulsants induce interleukin-1  $\beta$  messenger RNA in rat brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 171, 832-837.
- Minami, M., Kuraishi, Y., Satoh, M. (1991) Effects of kainic acid on messenger RNA levels of IL-1  $\beta$ , IL-6, TNF  $\alpha$  and LIF in the rat brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 176, 593-598.
- Moalem, G., Leibowitz-Amit, R., Yoles, E., Mor, F., Cohen, I.R., Schwartz, M. (1999) Autoimmune T cells protect neurons from secondary degeneration after central nervous system axotomy. *Nat. Med.* 5, 49-55.
- Moore, K.W., O'Garra, A., De Waal Malefyt, R., Vieira, P., Mosmann, T.R. (1993) Interleukin-10. *Annu. Rev. Immunol.* 11, 165-190.
- Murry, C.E., Giachelli, C.M., Schwartz, S.M., Vracko, R. (1994) Macrophages express osteopontin during repair of myocardial necrosis. *Am. J. Pathol.* 145, 1450-1462.
- Nagayama, M., Zhang, F., Iadecola, C. (1998) Delayed treatment with aminoguanidine decreases focal cerebral ischemic damage and enhances neurologic recovery in rats. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 18, 1107-1113.
- Nawashiro, H., Martin, D., Hallenbeck, J.M. (1997a) Inhibition of tumor necrosis factor and amelioration of brain infarction in mice. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 17, 229-232.

- Nawashiro, H., Tasaki, K., Ruetzler, C.A., Hallenbeck, J.M. (1997b) TNF- $\alpha$  pretreatment induces protective effects against focal cerebral ischemia in mice. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 17, 483-490.
- Nedergaard, M., Vorstrup, S., Astrup, J. (1986) Cell density in the border zone around old small human brain infarcts. *Stroke* 17, 1129-1137.
- Neumann, H., Cavalié, A., Jenne, D.E., Wekerle, H. (1995) Induction of MHC class I genes in neurons. *Science* 269, 549-552.
- Neumann, H., Schmidt, H., Cavalié, A., Jenne, D., Wekerle, H. (1997) Major histocompatibility complex (MHC) class I gene expression in single neurons of the central nervous system: differential regulation by interferon (IFN)- $\gamma$  and tumor necrosis factor- $\alpha$ . *J. Exp. Med.* 185, 305-316.
- Neumann-Haefelin, T., Hagemann, G., Witte, O.W. (1995) Cellular correlates of neuronal hyperexcitability in the vicinity of photochemically induced cortical infarcts in rats in vivo. *Neurosci.Lett.* 193, 101-104.
- Neumann-Haefelin, T., Staiger, J.F., Redecker, C., Zilles, K., Fritschy, J.M., Mohler, H., Witte, O.W. (1998) Immunohistochemical evidence for dysregulation of the GABAergic system ipsilateral to photochemically induced cortical infarcts in rats. *Neuroscience* 87, 871-879.
- Ohtsuki, T., Ruetzler, C.A., Tasaki, K., Hallenbeck, J.M. (1996) Interleukin-1 mediates induction of tolerance to global ischemia in gerbil hippocampal CA1 neurons. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 16, 1137-1142.
- Pan, W., Zadina, J.E., Harlan, R.E., Weber, J.T., Banks, W.A., Kastin, A.J. (1997) Tumor necrosis factor- $\alpha$ : a neuromodulator in the CNS. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 21, 603-613.
- Panek, R.B., Benveniste, E.N. (1995) Class II MHC gene expression in microglia: regulation by the cytokines IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , and TGF- $\beta$ . *J. Immunol.* 154, 2846-2854.
- Park, J.-H., Shin, S.-H. (1996) Induction of IL-12 gene expression in the brain in septic shock. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 224, 391-396.
- Perry, V.H., Brown, M.C., Gordon, S. (1987) The macrophage response to central and peripheral nerve injury: a possible role for macrophages in regeneration. *J. Exp. Med.* 165, 1218-1223.
- Perry, V.H., Andersson, P.-B., Gordon, S. (1993) Macrophages and inflammation in the central nervous system. *Trends Neurosci.* 16, 268-273.
- Perry, V.H., Gordon, S. (1987) Modulation of CD4 antigen on macrophages and microglia in rat brain. *J. Exp. Med.* 166, 1138-1143.
- Piani, D., Frei, K., Do, K.Q., Cuénod, M., Fontana, A. (1991) Murine brain macrophages induce NMDA receptor mediated neurotoxicity in vitro by secreting glutamate. *Neurosci. Lett.* 133, 159-162.
- Prehn, J.H.M., Backhaus, C., Kriegstein, J. (1993) Transforming growth factor- $\beta$ 1 prevents glutamate neurotoxicity in rat neocortical cultures and protects mouse neocortex from ischemic injury in vivo. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 13, 521-525.

- Qü, M., Mittmann, T., Luhmann, H.J., Schleicher, A., Zilles, K. (1998) Long-term changes of ionotropic glutamate and GABA receptors after unilateral permanent focal cerebral ischemia in the mouse brain. *Neuroscience* 85, 29-43.
- Raine, C.S. (1984) Analysis of autoimmune demyelination: its impact upon multiple sclerosis. *Lab. Invest.* 50, 608-635.
- Rapalino, O., Lazarov-Spiegler, O., Agranov, E., Velan, G.J., Yoles, E., Fraidakis, M., Solomon, A., Gepstein, R., Katz, A., Belkin, M., Hadani, M., Schwartz, M. (1998) Implantation of stimulated homologous macrophages results in partial recovery of paraplegic rats. *Nat. Med.* 4, 814-821.
- Rappolee, D.A., Mark, D., Banda, M.J., Werb, Z. (1988) Wound macrophages express TGF- $\alpha$  and other growth factors in vivo: analysis by mRNA phenotyping. *Science* 241, 708-712.
- Rappolee, D.A., Werb, Z. (1992) Macrophage-derived growth factors. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 181, 87-140.
- Rice, G.E., Munro, J.M., Corless, C., Bevilacqua, M.P. (1991) Vascular and nonvascular expression of INCAM-110: a target for mononuclear leukocyte adhesion in normal and inflamed human tissues. *Am. J. Pathol.* 138, 385-393.
- Ridet, J.L., Malhotra, S.K., Privat, A., Gage, F.H. (1997) Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function. *Trends. Neurosci.* 20, 570-577.
- Robinson, A.P., White, T.M., Mason, D.W. (1986) Macrophage heterogeneity in the rat as delineated by two monoclonal antibodies MRC OX-41 and MRC OX-42, the latter recognizing complement receptor type-3. *Immunology* 57, 239-247.
- Rothwell, N., Allan, S., Toulmond, S. (1997) The role of interleukin 1 in acute neurodegeneration and stroke: pathophysiological and therapeutic implications. *J. Clin. Invest.* 100, 2648-2652.
- Samoilova, E.B., Horton, J.L., Chen, Y. (1998) Acceleration of experimental autoimmune encephalomyelitis in interleukin-10-deficient mice: roles of interleukin-10 in disease progression and recovery. *Cell Immunol.* 188, 118-124.
- Savio, T., Schwab, M.E. (1989) Rat CNS white matter, but not gray matter, is non-permissive for neuronal cell adhesion and fibre outgrowth. *J. Neurosci.* 9, 1126-1133.
- Schiene, K., Bruehl, C., Zilles, K., Qu, M., Hagemann, G., Kraemer, M., Witte, O.W. (1996) Neuronal hyperexcitability and reduction of GABA<sub>A</sub>-receptor expression in the surround of cerebral photothrombosis. *J.Cereb.Blood Flow Metab.* 16, 906-914.
- Schmied, M., Breitschopf, H., Gold, R., Zischler, H., Rothe, G., Wekerle, H., Lassmann, H. (1993) Apoptosis of T lymphocytes in experimental autoimmune encephalomyelitis: evidence for programmed cell death as a mechanism to control inflammation in the brain. *Am. J. Pathol.* 143, 446-452.
- Schneider, H., Pitossi, F., Balschun, D., Wagner, A., del Rey, A., Besedovsky, H.O. (1998) A neuromodulatory role of interleukin-1 $\beta$  in the hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 7778-7783.
- Schroeter, M., Schiene, K., Kraemer, M., Hagemann, G., Weigel, H., Eysel, U.T., Witte, O.W., Stoll, G. (1995) Astroglial responses in photochemically induced focal ischemia of the rat cortex. *Exp. Brain Res.* 106, 1-6.

- Schroeter, M., Jander, S., Huitinga, I., Witte, O.W., Stoll, G. (1997) Phagocytic response in photochemically induced infarction of the rat cerebral cortex: the role of resident microglia. *Stroke* 28, 382-386.
- Schroeter, M., Jander, S., Witte, O.W., Stoll, G. (1999) Heterogeneity of the microglial response in photochemically induced focal ischemia of the rat cerebral cortex. *Neuroscience* 89, 1367-1377.
- Scriba, A., Schneider, M., Grau, V., Van der Meide, P.H., Steiniger, B. (1997) Rat monocytes up-regulate NKR-P1A and down-modulate CD4 and CD43 during activation in vivo: monocyte subpopulations in normal and IFN- $\gamma$ -treated rats. *J. Leukoc. Biol.* 62, 741-752.
- Scriba, A., Grau, V., Steiniger, B. (1998) Phenotype of rat monocytes during acute kidney allograft rejection: increased expression of NKR-P1 and reduction of CD43. *Scand. J. Immunol.* 47, 332-342.
- Segal, B.M., Dwyer, B.K., Shevach, E.M. (1998) An interleukin (IL)-10/IL-12 immunoregulatory circuit controls susceptibility to autoimmune disease. *J. Exp. Med.* 187, 537-546.
- Siesjö, B.K. (1992) Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia. Part I: Pathophysiology. *J. Neurosurg.* 77, 169-184.
- Skaper, S.D., Facci, L., Leon, A. (1995) Inflammatory mediator stimulation of astrocytes and meningeal fibroblasts induces neuronal degeneration via the nitri-dergic pathway. *J. Neurochem.* 64, 266-276.
- Smith, G.M., Hale, J.H. (1997) Macrophage/microglia regulation of astrocytic tenascin: synergistic action of transforming growth factor- $\beta$  and basic fibroblast growth factor. *J. Neurosci.* 17, 9624-9633.
- Springer, T.A. (1990) Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 346, 425-434.
- Springer, T.A. (1994) Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 76, 301-314.
- Stoll, G., Griffin, J.W., Li, C.Y., Trapp, B.D. (1989a) Wallerian degeneration in the peripheral nervous system: participation of both schwann cells and macrophages in myelin degradation. *J. Neurocytol.* 18, 671-683.
- Stoll, G., Trapp, B.D., Griffin, J.W. (1989b) Macrophage function during wallerian degeneration of rat optic nerve: clearance of degenerating myelin and Ia expression. *J. Neurosci.* 9, 2327-2335.
- Stoll, G., Jander, S., Schroeter, M. (1998) Inflammation and glial responses in ischemic brain lesions. *Prog. Neurobiol.* 56, 149-171.
- Stoll, G., Müller, S., Schmidt, B., Van der Meide, P.H., Jung, S., Toyka, K.V., Hartung, H.-P. (1993) Localization of interferon- $\gamma$  and Ia-antigen in T cell line-mediated experimental autoimmune encephalomyelitis. *Am. J. Pathol.* 142, 1866-1875.
- Stoll, G. und Jander, S. (1999) The role of microglia and macrophages in the pathophysiology of the CNS. *Prog. Neurobiol.* 58, 233-247.
- Streit, W.J., Graeber, M.B., Kreutzberg, G.W. (1989) Expression of Ia antigen on perivascular and microglial cells after sublethal and lethal motor neuron injury. *Exp. Neurol.* 105, 115-126.

- Srijbos, P.J., Rothwell, N.J. (1995) Interleukin-1  $\beta$  attenuates excitatory amino acid-induced neurodegeneration in vitro: involvement of nerve growth factor. *J. Neurosci.* 15, 3468-3474.
- Stroemer, R.P., Kent, T.A., Hulsebosch, C.E. (1995) Neocortical neural sprouting, synaptogenesis, and behavioral recovery after neocortical infarction in rats. *Stroke* 26, 2135-2144.
- Talley, A.K., Dewhurst, S., Perry, S.W., Dollard, S.C., Gummuru, S., Fine, S.M., New, D., Epstein, L.G., Gendelman, H.E., Gelbard, H.A. (1995) Tumor necrosis factor  $\alpha$ -induced apoptosis in human neuronal cells: protection by the antioxidant N-acetylcysteine and the genes bcl-2 and crmA. *Mol. Cell Biol.* 15, 2359-2366.
- Teichberg, V.I. (1991) Glial glutamate receptors: likely actors in brain signaling. *FASEB J.* 5, 3086-3091.
- The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group. (1995) Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. *N. Engl. J. Med.* 333, 1581-1587.
- Torres-Nagel, N., Kraus, E., Brown, M.H., Tiefenthaler, G., Mitnacht, R., Williams, A.F., Hünig, T. (1992) Differential thymus dependence of rat CD8 isoform expression. *Eur. J. Immunol.* 22, 2841-2848.
- Trinchieri, G. (1993) Interleukin-12 and its role in the generation of Th1 cells. *Immunol. Today* 14, 335-338.
- Van Antwerp, D.J., Martin, S.J., Verma, I.M., Green, D.R. (1998) Inhibition of TNF-induced apoptosis by NF- $\kappa$  B. *Trends Cell Biol.* 8, 107-111.
- Van Rooijen, N., Kors, N., Van der Ende, M., Dijkstra, C.D. (1990) Depletion and repopulation of macrophages in spleen and liver of rat after intravenous treatment with liposome-encapsulated dichloromethylene diphosphonate. *Cell Tissue Res.* 260, 215-222.
- Van Rooijen, N., Van Nieuwmegen, R. (1984) Elimination of phagocytic cells in the spleen after intravenous injection of liposome-encapsulated dichloromethylene diphosphonate. *Cell Tissue Res.* 238, 355-358.
- Vezzani, A., Conti, M., De, L.A., Ravizza, T., Moneta, D., Marchesi, F., De, S.M. (1999) Interleukin-1 $\beta$  immunoreactivity and microglia are enhanced in the rat hippocampus by focal kainate application: functional evidence for enhancement of electrographic seizures. *J. Neurosci.* 19, 5054-5065.
- Vidovic, M., Sparacio, S.M., Elovitz, M., Benveniste, E.N. (1990) Induction and regulation of class II major histocompatibility complex mRNA expression in astrocytes by interferon- $\gamma$  and tumor necrosis factor- $\alpha$ . *J. Neuroimmunol.* 30, 189-200.
- Wang, X., Yue, T.L., White, R.F., Barone, F.C., Feuerstein, G.Z. (1995) Transforming growth factor- $\beta$  1 exhibits delayed gene expression following focal cerebral ischemia. *Brain Res. Bull.* 36, 607-609.
- Wang, X., Loudon, C., Yue, T.L., Ellison, J.A., Barone, F.C., Solleveld, H.A., Feuerstein, G.Z. (1998) Delayed expression of osteopontin after focal stroke in the rat. *J. Neurosci.* 18, 2075-2083.
- Watson, B.D., Dietrich, W.D., Busto, R., Wachtel, M.S., Ginsberg, M.D. (1985) Induction of reproducible brain infarction by photochemically initiated thrombosis. *Ann. Neurol.* 17, 497-504.

- Weber, G.F., Cantor, H. (1996) The immunology of Eta-1/osteopontin. *Cytokine Growth Factor Rev.* 7, 241-248.
- Weinberg, A.D., Wyrick, G., Celnick, B., Vainiene, M., Bakke, A., Offner, H., Vandenbark, A.A. (1993) Lymphokine mRNA expression in the spinal cord of Lewis rats with experimental autoimmune encephalomyelitis is associated with a host recruited CD45R hi/CD4+ population during recovery. *J. Neuroimmunol.* 48, 105-118.
- Wekerle, H., Linington, C., Lassmann, H., Meyermann, R. (1986) Cellular immune reactivity within the CNS. *Trends Neurosci.* 9, 271-277.
- Wekerle, H. (1993) Experimental autoimmune encephalomyelitis as a model of immune-mediated CNS disease. *Curr. Opin. Neurobiol.* 3, 779-784.
- Witte, O.W., Stoll, G. (1997) Delayed and remote effects of focal cortical infarctions: secondary damage and reactive plasticity. *Adv. Neurol.* 73, 207-227.
- Wood, G.S., Warner, N.L., Warnke, R.A. (1983) Anti -Leu-3/T4 antibodies react with cells of monocyte/macrophage and Langerhans lineage. *J. Immunol.* 131, 212-216.
- Yabuuchi, K., Minami, M., Katsumata, S., Satoh, M. (1993) In situ hybridization study of interleukin-1 $\beta$  mRNA induced by kainic acid in the rat brain. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 20, 153-161.
- Yasuda, H., Nagata, M., Arisawa, K., Yoshida, R., Fujihira, K., Okamoto, N., Moriyama, H., Miki, M., Saito, I., Hamada, H., Yokono, K., Kasuga, M. (1998) Local expression of immunoregulatory IL-12p40 gene prolonged syngeneic islet graft survival in diabetic NOD mice. *J. Clin. Invest.* 102, 1807-1814.
- Yednock, T.A., Cannon, C., Fritz, L.C., Sánchez-Madrid, F., Steinman, L., Karin, N. (1992) Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against  $\alpha_4\beta_1$  integrin. *Nature* 356, 63-66.
- Yong, V.W., Moumdjian, R., Yong, F.P., Ruijs, T.C., Freedman, M.S., Cashman, N., Antel, J.P. (1991)  $\gamma$ -interferon promotes proliferation of adult human astrocytes in vitro and reactive gliosis in the adult mouse brain in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 7016-7020.
- Zhang, F., Xu, S., Iadecola, C. (1995) Time dependence of effect of nitric oxide synthase inhibition on cerebral ischemic damage. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 15, 595-601.
- Zhang, F., Iadecola, C. (1998) Temporal characteristics of the protective effect of aminoguanidine on cerebral ischemic damage. *Brain Res.* 802, 104-110.

## 8. ABBILDUNGSNACHWEIS

Folgende Abbildungen wurden aus Originalarbeiten des Autors entnommen:

- Abb. 1 Jander, S., Stoll, G. (1998) Differential induction of interleukin-12, interleukin-18, and interleukin-1 $\beta$  converting enzyme mRNA in experimental autoimmune encephalomyelitis of the Lewis rat. *J. Neuroimmunol.*, 91, 93-99.
- Abb. 2 Stoll, G., Jander, S., Schroeter, M. (1998) Inflammation and glial responses in ischemic brain lesions. *Prog. Neurobiol.* 56, 149-171.
- Abb. 4, 12 Jander, S., Kraemer, M., Schroeter, M., Witte, O.W., Stoll, G. (1995) Lymphocytic infiltration and expression of intercellular adhesion molecule-1 in photochemically induced ischemia of the rat cortex. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 15, 42-51.
- Abb. 5, 6 Braun, J.S., Jander, S., Schroeter, M., Witte, O.W., Stoll, G. (1996) Spatiotemporal relationship of apoptotic cell death to lymphomonocytic infiltration in photochemically induced focal ischemia of the rat cerebral cortex. *Acta Neuropathol.* 92, 255-263.
- Abb. 7, 8 Schroeter, M., Jander, S., Huitinga, I., Witte, O.W., Stoll, G. (1997) Phagocytic response in photochemically induced infarction of the rat cerebral cortex: the role of resident microglia. *Stroke* 28, 382-386.
- Abb. 9, 10, 13-15 Jander, S., Schroeter, M., D'Urso, D., Gillen, C., Witte, O.W., Stoll, G. (1998) Focal ischaemia of the rat brain elicits an unusual inflammatory response: early appearance of CD8<sup>+</sup> macrophages/microglia. *Eur. J. Neurosci.* 10, 680-688.
- Abb.20 Jander, S., Stoll, G. (1996) Downregulation of microglial keratan sulfate proteoglycans coincident with lymphomonocytic infiltration of the rat central nervous system. *Am. J. Pathol.* 148, 71-78.

## 9. DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. H.-J. Freund danke ich für die stets gewährte großzügige Unterstützung meiner Arbeit und für die Bereitstellung ausgezeichneter wissenschaftlicher Arbeitsbedingungen an der Neurologischen Klinik.

Herrn Prof. Dr. G. Stoll danke ich dafür, daß er mich an die Thematik der Inflammation in ischämischen Hirnläsionen herangeführt und meine Arbeit in steter Diskussionsbereitschaft begleitet hat.

Herrn Prof. Dr. O.W. Witte und Herrn Dr. M. Schroeter danke ich für die langjährige Kooperation bei der Durchführung der tierexperimentellen Arbeiten zur zerebralen Ischämie.

Frau B. Blumenkamp (BTA) und Frau A. Tries (MTA) danke ich für die hervorragende technische Assistenz bei den molekularbiologischen und immunhistochemischen Arbeiten.

Frau Dr. D. D'Urso danke ich für die Kooperation bei der konfokalen Lasermikroskopie.

Frau Dr. I. Huitinga, Amsterdam, danke ich für die Kooperation bei den Experimenten zur Makrophagendepletion bei der zerebralen Ischämie.

Herrn PD Dr. W. Brück, Göttingen, danke ich für die Bereitstellung von Autopsiepräparaten humaner Hirninfarkte.