

Aus dem Institut für Anatomie II:
Experimentelle Morphologie
(Direktor: Prof. Dr. U. Schumacher)
Zentrum für Experimentelle Medizin
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

**Mikroglia unter angeborener Immunsuppression:
Eine Studie an rag2-knockout, pfp-knockout und pfp/rag2-
doppelknockout Mäusen**

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg

vorgelegt von

Christine Zylmann

aus Mainz

Hamburg 2005

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am: 1. 2. 2007

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs
Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, die/der Vorsitzende/r: Prof. Dr. D. Lorke
Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: Prof. Dr. U. Schumacher
Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: Prof. Dr. C. Hagel

Meinen Großeltern

Frau Dr. med Ingeborg Zylmann und Herrn Dr. med Geerd Zylmann

Inhaltsverzeichnis

1	Fragestellung	1
2	Einleitung	2
2.1	Spezifische und unspezifische Abwehr	2
2.2	V(D)J-Rekombination	4
2.2.1	Immunglobuline	5
2.2.2	Der T-Zell-Rezeptor	6
2.3	Immunsystem und ZNS	7
2.4	Mikroglia	8
2.5	Mikroglia-Untersuchung an immundefizienten Mäusepopulationen	10
3	Material und Methoden	14
3.1	Tierzucht	14
3.2	Histologie	15
3.2.1	Gewebeentnahme	15
3.2.2	Vibratomschnitttechnik	16
3.2.3	NDPase-Enzymfärbung	18
3.2.4	Nissl-Färbung mit Kresyl-Violett	21
3.2.5	Paraffinschnitttechnik	22
3.2.6	Nissl-Färbung mit Kresyl-Violett	23
3.2.7	Immunhistochemische Färbungen	23
3.2.7.1	<i>Anti-CNPase</i>	23
3.2.7.2	<i>Anti-GFAP</i>	25
3.3	Elektronenmikroskopie	25
3.4	Morphometrie	26
4	Ergebnisse	29
4.1	Morphologie	29
4.1.1	Hirnstruktur	29
4.1.2	Mikroglia	31
4.1.3	Astrozyten	38
4.1.4	Oligodendrozyten	40
4.1.5	Elektronenmikroskopie	42
4.2	Morphometrie	45
5	Diskussion	53
6	Zusammenfassung	62

7	Literaturverzeichnis	63
8	Abkürzungsverzeichnis	74
9	Danksagung	76
10	Lebenslauf	78
11	Erklärung	79

1 Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit sollen Neurone, Gliazellen und von diesen insbesondere die Mikroglia-Zellen an drei verschiedenen Maus-Modellen mit angeborener Immunsuppression im Vergleich mit einer Kontrollpopulation untersucht werden.

Folgende Maus-Modelle sollen analysiert werden:

- die rag2-knockout Maus, dieser fehlt das „recombination activating gene 2“ (rag2), was zum Fehlen funktionsfähiger B- und T-Lymphozyten führt
- die pfp-knockout Maus, dieser fehlt das Perforin-Gen, wodurch die NK-Zellen und zytotoxischen T-Lymphozyten eine herabgesetzte Zytotoxizität besitzen
- die pfp/rag2-Doppelmutante, welche einen kombinierten genetischen Immundefekt mit fehlenden funktionsfähigen B- und T-Lymphozyten sowie einer herabgesetzten NK-Zell-Aktivität besitzt.

An diesen Maus-Modellen sollen folgende Fragestellungen geklärt werden:

- Welche morphologischen Strukturanomalien sind in den Gehirnen von rag2-knockout, pfp-knockout und pfp/rag2-doppelknockout Mäusen zu beobachten?
- Lassen sich Veränderungen der übrigen Gliazellen (Astrozyten und Oligodendrozyten) bei den immunsupprimierten Mäusen im Vergleich zur Kontrollpopulation erkennen?
- Unterscheidet sich die Ultrastruktur der Mikroglia der drei Maus-Modelle mit angeborener Immunsuppression von der Ultrastruktur der Mikroglia einer Kontrollpopulation?
- Gibt es Veränderungen der Mikroglia in Bezug auf ihre Dichte und Größe zwischen den verschiedenen Mäusepopulationen und verglichen mit einer Kontrollpopulation?
- Hat ein angeborener Mangel an funktionellen B- und T-Lymphozyten Auswirkungen auf die Dichte der Mikroglia?

2 Einleitung

2.1 Spezifische und unspezifische Abwehr

Das Abwehrsystem schützt den Körper vor Infektionen durch pathogene Keime und Organismen, wie Bakterien, Viren, Pilze oder Parasiten. Es lässt sich einteilen in ein spezifisches oder adaptives und ein unspezifisches oder angeborenes Abwehrsystem (Beilhack und Rockson, 2003; Chaplin, 2003; Friese *et al.*, 2004).

Das spezifische Abwehrsystem beruht auf der Fähigkeit von B- und T-Lymphozyten, welche die zellulären Komponenten darstellen, Moleküle oder Molekülaggregate, die Antigene, zu erkennen. B-Lymphozyten machen dabei eine Affinitätsreifung zu einer Antikörper-produzierenden Plasmazelle durch, die im Lymphknoten, in der Milz und anderen sekundären Lymphorganen abläuft. Die produzierten Antikörper oder Immunglobuline werden durch den Prozess der V(D)J-Rekombination (Abb. 2-1) aus einzelnen Gen-Segmenten zusammengesetzt und durch Sekretion an das Blut abgegeben. Sie stellen die humorale Komponente des spezifischen Abwehrsystems dar (Abb. 2-2).

Die Differenzierung der T-Lymphozyten als zellgebundene Komponente der spezifischen Abwehr erfolgt im Thymus. Diese Zellen besitzen einen in der Plasmamembran lokalisierten Proteinkomplex, den T-Zell-Rezeptor (Abb. 2-3), dessen Antigen-Bindungsstelle eine ähnliche Struktur wie die eines Antikörpermoleküls aufweist. Dieser T-Zell-Rezeptor ist in der Lage, Antigene zu binden, die ihm mit Hilfe von MHC-Komplexen präsentiert werden. T-Lymphozyten lassen sich unterteilen in Zytotoxische T-Lymphozyten, die den Corezeptor CD 8 besitzen und Helferzellen, die wiederum in TH₁-Zellen (inflammatorische T-Lymphozyten) und TH₂-Zellen untergliedert werden, welche beide den Corezeptor CD 4 tragen. Die maximale Bindungsfähigkeit erlangt der T-Zell-Rezeptor nur zusammen mit einem dieser Corezeptoren.

Das unspezifische Abwehrsystem schützt unseren Organismus in der frühen Phase einer Infektion, solange, bis das spezifische Immunsystem aktiv geworden ist. Im Mittelpunkt dieses Systems stehen das über den alternativen Weg aktivierte Komplementsystem und phagozytierende Makrophagen, deren Aktivierung zur Freisetzung von Interleukin 1 und 6 führt. Die Makrophagen gehören zum so genannten Monozyten-Phagozytose-System (MPS), welches u.a. Mikroglia, Perizyten und perivaskuläre Makrophagen umfasst. Ebenso werden zur unspezifischen Abwehr natürliche Killerzellen (NK-Zellen) gerechnet. Die NK-Zellen

entwickeln sich aus hämatopoetischen Stammzellen (*haematopoietic stem cells* [HSCs]). Mittlerweile ist man sich einig, dass das Knochenmark den Hauptort der NK-Zellreifung darstellt (Colucci *et al.*, 2003). Bei den NK-Zellen handelt es sich um lymphoide Zellen, die nicht von anderen Zellen aktiviert werden müssen. Sie können direkt anomale Zellen mit einer verminderten Präsentation zelleigener Proteine erkennen und vernichten und sehr schnell Botenstoffe wie Chemokine und Cytokine bilden, die antimikrobielle Effekte besitzen oder andere Zellen des Immunsystems zum Angriff vorbereiten (Colucci *et al.*, 2003).

NK-Zellen können auf zwei Wegen durch direkten Kontakt zwischen Effektor- und Zielzelle zum Zelltod führen. Der erste Weg ist die Zytolyse durch Perforin und Granzym. Perforin (ursprünglich bekannt für seine *pore-forming properties* und als *pore-forming protein* [pfp] beschrieben) ist ein membran-zerstörendes Protein und Granzym gehört zur Familie der strukturell verwandten Serinproteasen und besitzt verschiedene Substratspezifitäten. Beide werden durch Exocytose sezerniert und führen gemeinsam zur Zytolyse der Zielzelle (Trapani und Smyth, 2002).

Den zweiten Weg stellt die Apoptose dar. Dabei spielen Transmembran-Rezeptoren (Fas, DR4 und DR5), die zur Familie der so genannten *death receptors* gehören und auch Tumornekrosefaktor-Rezeptoren (TNF-R) genannt werden, eine zentrale Rolle (Rossi und Gaidano, 2003). Sie besitzen eine extrazelluläre, eine transmembrane sowie eine intrazelluläre Domäne und werden von *death ligands* (FasL für Fas und TRAIL für DR4 und DR5), die sich auf den NK-Zellen befinden, erkannt und aktiviert. Der intrazelluläre Rezeptor-Anteil rekrutiert so genannte Adapter-Proteine wie FADD, deren *death effector domain* (DED) mit der DED eines Procaspase-8-Enzyms interagiert und einen aktivierten Komplex (DISC) bildet. Dieser Komplex aktiviert eine weitere Caspase (Procaspase-3), welche dann durch Proteolyse zum programmierten Zelltod der Zielzelle führt. (Rossi und Gaidano, 2003).

Während NK-Zellen wie erwähnt zur unspezifischen Abwehr gerechnet werden, zählen zytotoxische T-Lymphozyten zu den zellulären Komponenten der spezifischen Immunabwehr von pathogenen Mikroorganismen sowie malignen Zellen. Allerdings wirken beide Zelltypen über Perforin und führen zu Zytolyse der virus-infizierten oder transformierten Zielzelle.

2.2 V(D)J-Rekombination

Die enorme Vielfalt an Immunglobulinen und T-Zell-Rezeptoren unseres Abwehrsystems übersteigt die Anzahl der Gene um ein Vielfaches. Die V(D)J-Rekombination ermöglicht es, durch unterschiedliche Kombinationsmöglichkeiten einzelner Gen-Sequenzen miteinander eine Vielzahl von Antigenen zu erkennen (Gellert, 2002). So lassen sich zum einen Antikörper (Immunglobuline) und zum anderen T-Zell-Rezeptoren (TCR) zusammensetzen, deren Antigenbindungsstellen immer aus verschiedenen kombinierten Segmenten bestehen.

Die V(D)J-Rekombination setzt sich aus „variable“- (V), „diversity“- (D) und „joining“- (J) Gen-Segmenten zusammen (Akamatsu *et al.*, 2002; Corneo *et al.*, 2000, 2001; Oettinger *et al.*, 1990).

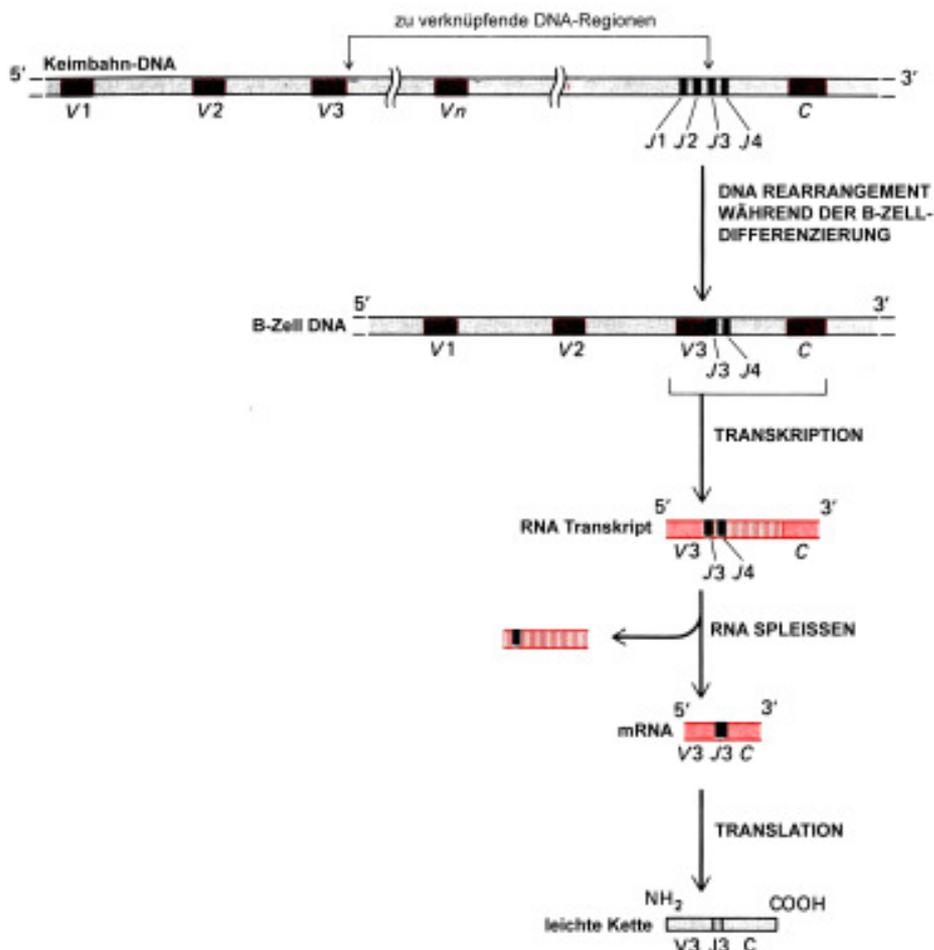


Abb. 2-1: Schematische Darstellung des V-J-Joining Prozesses zur Neuordnung der einzelnen V- und J-Segmente eines DNA-Strangs. Durch Transkription und RNA-Splicing werden hier die Segmente V3 und J3 aneinandergesetzt. Anschließend Translation übersetzt diese mRNA in eine leichte Kette eines Ig-Moleküls (nach Alberts *et al.*, 2002).

2.2.1 Immunglobuline

Die Gesamtheit der von B-Lymphozyten produzierten Antikörper wird als Immunglobuline (Ig) bezeichnet. Immunglobuline setzen sich aus H-Ketten („heavy“) und L-Ketten („light“) zusammen, wobei L-Ketten eine variable (V_L) und eine konstante Region (C_L) besitzen, während H-Ketten eine variable (V_H), aber drei oder vier konstante Regionen (C_H) aufweisen. Ein Antikörper-Molekül besteht immer aus identischen L-Ketten und identischen H-Ketten.

Jede V-Region einer H-Kette wird durch drei Gen-Segmente codiert, einem V-Segment („variability“) bestehend aus etwa 1000 Einzelsegmenten, einem D-Segment („diversity“) mit mindestens 12 zusammengesetzten Einzelsegmenten und einem J-Segment („joining“) bestehend aus 4 Einzelsegmenten. Eine ähnliche Vielfalt zeigt auch die Zusammensetzung der L-Ketten. Somit lassen sich durch Kombinationen innerhalb der H- und L-Ketten sowie bei der Kombination beider Ketten untereinander etwa 10^8 unterschiedliche Antikörper-Spezifitäten erreichen, mit jeweils unterschiedlichen Aminosäuresequenzen und unterschiedlichen Antigen-Bindungsstellen (Alberts *et al.*, 2002).

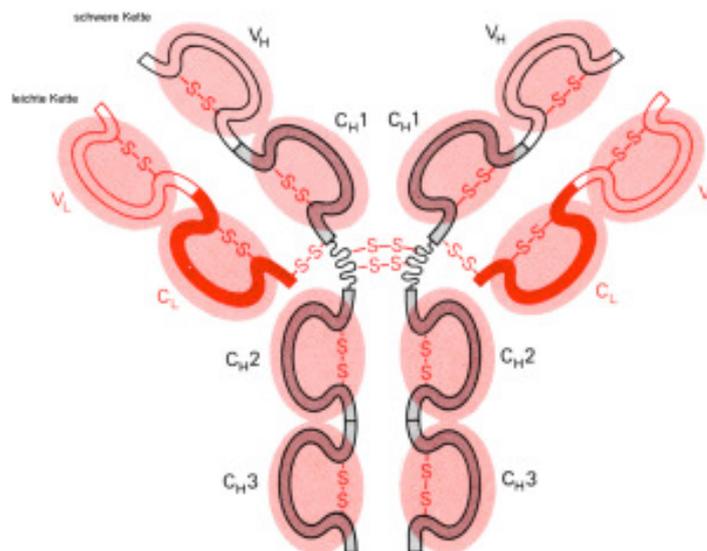


Abb. 2-2: Schema eines Ig-Moleküls mit leichten (L) und schweren (H) Ketten. Die Antigenbindungsstelle wird von der variablen Region der leichten und schweren Ketten (V_L und V_H) gebildet (nach Alberts *et al.*, 2002).

2.2.2 Der T-Zell-Rezeptor

Die Vielfalt der T-Zell-Rezeptor-Proteine lässt sich ebenfalls auf eine Neuordnung der DNA während der T-Zell-Entwicklung zurückführen. T-Lymphozyten können nur durch engen Kontakt mit anderen Zellen aktiviert werden. Ihr Antigen-Rezeptor existiert lediglich in membrangebundener Form. Er setzt sich aus einer α - und einer β -Polypeptid-Kette (α/β -Heterodimer) zusammen, die beide jeweils aus 280 Aminosäuren (AS) bestehen und über Disulfid-Bindungen miteinander verknüpft sind. Der extrazelluläre Anteil jeder einzelnen Kette besteht aus einer konstanten (C), carboxyl-terminalen und einer variablen (V), amino-terminalen Region. Die Antigen-Bindungsstelle des T-Zell-Rezeptors wird von V_α , der variablen Region der α -Kette, und V_β gebildet, also dem amino-terminalen Ende. In seinem gesamten Aufbau gleicht diese Antigen-Bindungsstelle der eines Antikörper-Moleküls. Im Gegensatz zu Antikörpern, die jeweils zwei Antigen-Bindungsstellen besitzen, verfügen T-Zell-Rezeptoren jedoch nur über eine einzelne Bindungsstelle. Ebenso wie der Antikörper-Genpool setzt sich der T-Zell-Rezeptor aus einzelnen V-, D-, J- und C-Gen-Segmenten zusammen, welche bei der T-Zell-Reifung im Thymus mittels ortspezifischer Rekombination (*site-specific recombination*) kombiniert werden. Neben dem α/β -Heterodimer ist eine weiterer T-Zell-Rezeptor, welcher sich aus γ - und δ -Ketten zusammensetzt, entdeckt worden. Er wird von einem Zelltyp des Thymus, der Epidermis und des Darmepithels gebildet. Seine Funktion ist bisher jedoch noch ungeklärt (Alberts *et al.*, 2002).

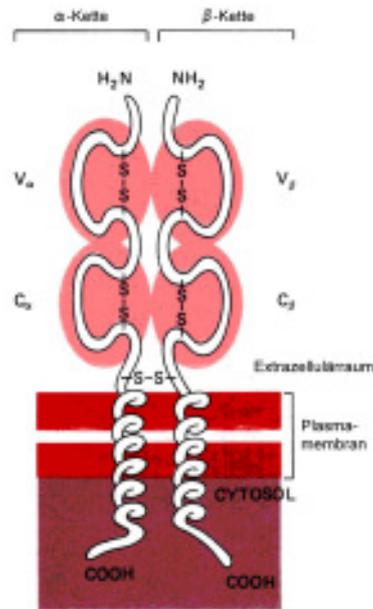


Abb. 2-3: Struktur eines T-Zell-Rezeptors bestehend aus einer α - und einer β -Polypeptidkette. Der extrazelluläre Anteil setzt sich aus einer variablen (V) und einer konstanten (C) Region zusammen, wobei die Antigenbindungsstelle von der variablen Region der α - und der β -Kette (V_α und V_β) gebildet wird (nach Alberts *et al.*, 2002).

2.3 Immunsystem und ZNS

Unser zentrales Nervensystem (ZNS) ist über einen langen Zeitraum als ein *immunprivilegiertes Organ* angesehen worden (Streit *et al.*, 1999; Streit, 2002). Argumentiert wurde dabei mit der Existenz der Blut-Hirn-Schranke (BHS), die Lymphozyten aus der Peripherie das Einwandern ins ZNS und dadurch eine Interaktion zwischen Lymphozyten und Makrophagen im ZNS erschwert. Das scheinbare Fehlen einer Lymphdrainage, eine ausbleibende MHC II Expression und eine eingeschränkte Transplantatabstoßung im ZNS stellen weitere Argumentationspunkte dar. Die mittlerweile bekannten Tatsachen, dass eine Lymphdrainage über die Robin-Virchow-Räume stattfindet, dass sich MHC II positive Zellen im ZNS finden lassen und dass es auch im ZNS zu einer Transplantatabstoßung kommen kann, zeigen, dass das Immunprivileg des ZNS keinesfalls absolut ist (Streit *et al.*, 1999). Somit scheint es mittlerweile präziser, von einem immunologisch spezialisierten Organ zu sprechen (Friese *et al.*, 2004). Hickey (2001) hat in seinen Arbeiten gezeigt, dass nur wenige aktivierte T-Lymphozyten, die peripher durch ein spezifisches Antigen stimuliert werden, ins ZNS eindringen können. Dieses eingeschränkte Eindringen von Lymphozyten erklärt sich einerseits durch die Existenz der BHS als mechanische Barriere und andererseits durch die

geringere Anzahl von Adhäsionsmolekülen, die für eine Interaktion von Lymphozyten mit dem Endothel des ZNS nötig sind (Hickey, 2001). Auch das Eindringen von Immunglobulinen ist erschwert und nur in geringerem Ausmaß möglich (Hickey, 2001).

2.4 Mikroglia

Eine entscheidende Funktion bei Abwehrprozessen im ZNS besitzen zur Phagozytose befähigte, residente Makrophagen des ZNS, die Mikroglia (Rezaie und Male, 2002; Streit, 1999, 2002). Sie können zusammen mit Perizyten und perivaskulären Makrophagen zu Hirn-Makrophagen zusammengefasst werden (Guillemin und Brew, 2004). Insgesamt existieren etwa 3,5 Millionen Mikroglia-Zellen, die 5-12% aller Hirnzellen ausmachen (Lawson *et al.*, 1990).

Unterschiedliche Erklärungsansätze über den Ursprung dieser Zellen gehörten lange Zeit zu den am meisten kontrovers diskutierten Streitfragen innerhalb der ‚Glia-Forschung‘ (Kaur *et al.*, 2001; Cuadros *et al.*, 1998). Nachdem zunächst die Herkunft der Mikroglia aus dem Neuroektoderm diskutiert worden ist (Richardson *et al.*, 1993; Fedoroff *et al.*, 1997), hat sich inzwischen etabliert, dass Mikroglia mesodermalen Ursprungs mit hämatopoetischen Vorläufern ist (Ling und Wong, 1993; Murabe und Sano, 1984; Perry und Gordon, 1991; Thomas, 1992). Schon del Rio Hortega hat im Zeitraum von 1919 bis 1921 Mikroglia beschrieben. In seinen Arbeiten (del Rio Hortega, 1919, 1932) postuliert er, dass ein undifferenziertes, mesodermales Element ins Hirnparenchym eindringt und aus der zuvor runden und amöboiden Zelle in eine typische, ramifizierte Mikroglia-Zelle transformiert (Murabe und Sano, 1984).

Während der frühen Neurogenese wandern monozytäre Vorläufer in das ZNS ein (Eglitis und Mezey, 1997; Cuadros und Navascues, 1998; Navascues *et al.*, 2000). Aus den Vorläuferzellen, die vor und während der Entwicklung der BHS über den Blutweg, die Meningen oder die Ventrikel ins ZNS wandern, entstehen zunächst die amöboiden Mikroglia. Aus dieser amöboiden Form entwickelt sich im Verlauf der Reifung des Nervensystems die ramifizierte, ruhende Mikroglia (Rezaie und Male, 2002). Sie besitzt lange Fortsätze, die einem kleinen Perikaryon entspringen. In der grauen Hirnsubstanz verzweigen sie sich radiär, in der weißen Substanz verlaufen sie parallel zu den Nervenfasern (Lawson *et al.*, 1990).

Im Falle einer Schädigung des ZNS erfolgt eine Aktivierung der bis dahin ruhenden Mikroglia. Dabei kommt es einerseits zu einer morphologischen Veränderung der Zellen und ihrer Zellgröße und zu einer Mikroglia-Proliferation mit Zunahme der Zelldichte (Guillemin und Brew, 2004). Auf molekularer Ebene zeigen sich diese Änderungen beispielsweise in Form verstärkter Expression von Zelloberflächen-Molekülen, die als Aktivitätsmarker fungieren (Raivich *et al.*, 1999; Streit *et al.*, 1999; Aloisi 2001). Im Vergleich zu der ruhenden Mikroglia lässt sich bei der aktivierten Form ein vergrößerter Zelleib mit stärkeren proximalen Ausläufern und einer abnehmenden distalen Ramifizierung erkennen (Raivich *et al.*, 1999). Die aktivierte Mikroglia legt sich an bzw. um die beschädigten Strukturen, wie beispielsweise Neurone. Nun erfolgt je nach Schweregrad der ZNS-Schädigung eine abgestufte Antwort („graded response“) der Mikroglia-Zellen (Raivich *et al.*, 1999). Falls es zu keiner Degeneration von Neuronen kommt, bilden sich die aktivierten Zellen in ruhende, ramifizierte Mikroglia zurück, ihre Zelldichte nimmt wieder ab und es findet eine ‚Down-Regulation‘ der Aktivitätsmarker statt. Wenn es jedoch zu einer Degeneration, also einem Zelltod der Neuronen kommt, werden die aktivierten Gliazellen weiter in phagozytierende Mikroglia transformiert. Diese rundlichen Zellen ähneln Makrophagen, die als immunkompetente Abwehrzellen die neuronalen Zelltrümmer beseitigen (Raivich *et al.* 1999; Streit *et al.*, 1999).

Die wichtigste Aufgabe der Mikroglia im ruhenden sowie im aktivierten Zustand besteht somit in der immunologischen Überwachung des ZNS (immune-surveillance). Auf die geringste pathologische Veränderung können sie mit einer sofortigen Aktivierung reagieren, Antigene präsentieren und mittels Antigen- und Pathogen-Degradation sowie Phagozytose Zelltrümmer oder Mikroorganismen beseitigen (Kreutzberg 1996; Raivich *et al.*, 1999). Streit und seine Mitarbeiter (1999) verwenden für das Phänomen, dass Mikroglia in Abhängigkeit ihrer jeweiligen Funktion verschiedene morphologische Erscheinungsformen annehmen kann, den Begriff der „funktionellen Plastizität“.

Neben der Mikroglia existieren weitere bereits erwähnte Makrophagen im ZNS wie zum Beispiel perivaskuläre Zellen, auch perivaskuläre Makrophagen genannt. Diese Zellen gehören zu einer speziellen Population mit monozytärem Ursprung und werden ständig durch Monozyten ersetzt (Williams *et al.*, 2001). Sie befinden sich auf der Oberfläche der Basalmembran von Blutgefäßen des Gehirns. Ihr Zellkörper besitzt eine kleine und ovale Form mit einzelnen Fortsätzen, welche zur Gefäßachse

parallel verlaufen und dabei das Gefäß umschlingende Sekundärausläufer abgeben (Thomas, 1999). Wie auch die Mikroglia beteiligen sich die perivaskulären Zellen an der Antigen-Präsentation und Phagozytose (Williams *et al.*, 2001).

Perizyten zählen zu den weiteren Makrophagen mit wahrscheinlich demselben Ursprung und ähnlicher Aufgabe wie Phagozytose. Zusätzlich beteiligen sie sich an der Vasokonstriktion, Koagulation und Säuberung von extrazellulärer Flüssigkeit (Thomas, 1999). Perizyten befinden sich in den Wänden zerebraler Blutgefäße, umhüllt von der Basalmembran, und besitzen möglicherweise die Fähigkeit, aus der Basalmembran auszubrechen und sich in perivaskuläre Zellen umzuwandeln. Auch die Fähigkeit, sich in Mikroglia transformieren zu können, wird ihnen zugesprochen (Monteiro *et al.*, 1996; Thomas, 1999).

2.5 Mikroglia-Untersuchung an immundefizienten Mäusepopulationen

Obwohl über die Entwicklung und Morphologie von Mikroglia schon ausführlich untersucht worden ist, ist über die Beziehung zwischen dem Immunsystem, speziell B- bzw. T-Lymphozyten, und den Mikroglia-Zellen noch vieles unbekannt. Eine Möglichkeit, mehr über diese Beziehung in Erfahrung zu bringen, bieten Untersuchungen an immundefizienten Maus-Modellen.

Ip (2002) hat in seiner Arbeit die Wirkung von Immunsuppression auf die Mikroglia untersucht. Er hat dabei zwei unterschiedliche Modelle eingesetzt: (1) die scid-Maus (severe combined immunodeficiency), als eine Form der angeborenen Immunsuppression in Form eines genetischen Defektes der Lymphozyten und (2) ein Modell der induzierten Immunsuppression. Bei letzterem Modell wird eine Immunsuppression an BHS-defekten Mäusen durch Cyclosporin A (CsA)-Gabe erzeugt (mdr 1a/1b (-/-) double-knockout Maus).

Ips Untersuchungen (2002) zeigen keine grob-morphologischen Unterschiede im ZNS beim Vergleich der scid-Mäuse mit BALB/c-Wildtyp Mäusen. Er ermittelt aber eine signifikante Erhöhung der Zellzahl in fünf von sechs untersuchten Hirnregionen. Sonstige Anzeichen, wie eine Zunahme des Zelldurchmessers oder intensivere NDPase-Färbung, die auf eine Mikroglia-Aktivierung schließen lassen, hat er nicht gefunden. Ip (2002) schloss daraus, dass die Dichteerhöhung der Mikroglia aufgrund eines Mangels an B- und T-Lymphozyten entstehen könnte.

Um seine Hypothese überprüfen zu können, haben wir in der vorliegenden Arbeit ein Maus-Modell untersucht, das einen Defekt in der frühen Entwicklung von B- und T-Lymphozyten aufweist. Der rag2-knockout-Maus (rag2-Maus) fehlt das „recombination activating gene 2“ (rag2), welches zusammen mit rag1 essentiell für die V(D)J-Rekombination der Immunglobulinketten ist.

Die recombination-activating-Gene rag2 und rag1 sind im Immunsystem von allen höher-entwickelten Vertebraten exprimiert und mitverantwortlich für seine enorme Vielfalt (Gellert, 2002). In ihrer vollen Länge bestehen rag1 aus 1040 AS und rag2 aus 527 AS.

Die rag1- und rag2-Proteine stellen die Initiatoren der V(D)J-Rekombination (s. o.) dar und führen gemeinsam zu Doppelstrang-Brüchen an spezifischen von ihnen erkannten Sequenzen der DNA, den so genannten „recombination signal sequences“, RSSs, die unmittelbar an jedes V-, D- und J-Einzelsegment grenzen (Gellert, 2002; Chatterji *et al.*, 2004; Oettinger *et al.*, 1990). Jede RSS besteht aus einer heptamer- (CACAGTG) und einer nonamer-Sequenz (ACAAAACC) (Gomez *et al.*, 2000). Getrennt sind diese Sequenzen durch einen spacer, welcher entweder aus 12 Basenpaaren (12-bp) oder aus 23 Basenpaaren (23-bp) besteht (Chatterji, 2004). Bei der B-Zell-Reifung findet sich eine sehr starke Ausprägung von rag-Proteinen innerhalb der unreifen, frühen Stadien des Reifungsprozesses, während ausgereifte B-Lymphozyten eine geringe Expression von rag-Proteinen aufweisen (Jankovic *et al.*, 2004).

Durch diesen genetischen Defekt der rag2-Maus sind die frühen Phasen der Entwicklung der B- und T-Lymphozyten komplett blockiert, was ebenfalls wie bei der scid-Maus zu einem Defekt des B- und T-Zellsystems führt. Durch den Vergleich von scid- und rag2-Mäusen können direkt genbedingte Einflüsse auf die Mikroglia von indirekten, aus dem Gendefekt resultierenden Einflüssen, hier dem Defekt im B- und T-Zellsystem, unterschieden werden.

Im Vergleich zur rag2-Maus, deren einziger Defekt innerhalb der V(D)J-Rekombinase liegt und somit nur die B- und T-Zellreifung betrifft, sind bei der scid-Maus zusätzlich geringfügig auch die NK-Zellen betroffen. So besitzen beispielsweise C57BL/6 scid-Mäuse eine höhere NK-Zellaktivität als der Wildtyp (Christianson *et al.*, 1996). Es wäre somit auch denkbar, dass die vermehrte Mikroglia-Anzahl bei scid-Mäusen mit einer erhöhten Aktivität von NK-Zellen in Zusammenhang steht. Um diese Hypothese

zu testen, haben wir als weitere immundefiziente Mäusepopulation die pfp-knockout Maus, bei der NK-Zellen sowie zytotoxische T-Lymphozyten eine herabgesetzte Zelltoxizität besitzen, und die pfp/rag2-doppelknockout Maus untersucht. Letztere weist den kombinierten Defekt der rag2- sowie der pfp-knockout Maus auf.

Der pore-forming protein (pfp)-knockout-Maus fehlt das Perforin-Gen, welches eine wichtige Rolle bei der Bildung der zytotoxischen T-Lymphozyten sowie der NK-Zellen spielt. Das Perforin-Gen der Maus ist mittlerweile entschlüsselt worden (Youn *et al.*, 1991). Es besteht aus drei Exons, wobei sich die Codesequenz in den Exons 2 und 3 befindet (Katano und Cohen, 2004). Es setzt sich aus insgesamt 555 AS zusammen. Die körnige Membran, welche das Protein umgibt, kann vom Perforin nicht zerstört werden. Der innere pH der Körnchen ist extrem sauer ($\text{pH} < 6,0$), was wahrscheinlich Perforin in einem inaktiven Zustand lässt. Kommt es jetzt zur Exocytose und zur Freigabe von Perforin, wird der pH-Wert neutralisiert und Perforin so in seine aktive Form überführt. Nun kann es an der Zellmembran der Zielzelle binden (Katano und Cohen, 2004).

Bei homozygoten *Perforin-defizienten* Mäusen ist das Perforin-Protein nicht exprimiert. Die Zellen dieser Mäuse sind in ihrer Fähigkeit, virusinfizierte Zellen oder Ziele von NK-Zellen *in vitro* zu zerstören, stark eingeschränkt. So führt beispielsweise die Infizierung dieser homozygoten Tiere mit dem *lymphocytic choriomeningitis virus* (LCMV) zu einer persistierenden Infektion des Gewebes und schließlich zum Tode, während Wildtypen und heterozygote Mäuse das Virus vernichten können (Kagi *et al.*, 1994; Walsh *et al.*, 1994). Weitere Virusinfektionen (Herpes simplex, Ectromelia [mousepox] Virus) können von diesen *Perforin-deficient* Mäusen nicht kontrolliert werden (Ghiasi *et al.*, 1999; Mullbacher *et al.*, 1999; Rossi *et al.*, 1998). Im Gegensatz dazu bleibt die Abwehrfunktion dieser Tiere bei anderen viralen Infektionen, wie *murine cytomegalovirus*, *rotavirus coxsackie B virus* oder *murine herpesvirus-68*, analog zum Epstein-Bar-Virus (EBV) beim Menschen, unbeeinflusst (Kagi *et al.*, 1995; Gebhard *et al.*, 1998; Usherwood *et al.*, 1997). Die gleiche Paradoxität findet sich auch bei verschiedenen bakteriellen Infektionen. Mit *syngeneic fibrosarcoma cells* infizierte Perforin-defiziente Mäuse sind unfähig, diese Tumorzellen abzustößeln (Kagi *et al.*, 1994). Insgesamt neigen diese Tiere vermehrt zu spontanen T-, B- und NK-Zell-Neoplasien (Smyth *et al.*, 2000; Trapani und Smyth,

2002). Sie sind *in vitro* empfänglicher für transplantierte Tumoren und ihre Metastasen. Des Weiteren spielt Perforin eine wichtige Rolle bei Klasse I begrenzten *graft-versus-host-diseases* (GvHD) in Mäusen (Graubert *et al.*, 1997).

Perforin-defiziente Mäuse besitzen eine normale Anzahl an NK-Zellen und zytotoxischen CD8⁺ T-Lymphozyten und scheinen in der Abwesenheit von Infektionen gesund zu sein (Kagi *et al.*, 1994). Werden diese Tiere jedoch infiziert, kommt es zu einer unkontrollierten Immunantwort. Der Tod der Tiere ist dabei weniger das Resultat der direkten Zerstörung der eigenen Zellen durch den pathogenen Keim, sondern vielmehr durch eine inflammatorische Zellantwort zu erklären. Eine Infektion mit LCMV resultiert in einer Panzytopenie mit erhöhtem Tumornekrose-Faktor α (TNF- α), erhöhtem Interferon γ (IFN- γ) und vermehrten aktivierten virusspezifischen CD8⁺ T-Zellen (Binder *et al.*, 1998). Zahlreiche weitere experimentell induzierte Infektionen dieser defizienten Mäuse führen zu unkontrollierter Proliferation von CD8⁺ T-Lymphozyten und Makrophagen, Stimulation verschiedener proinflammatorischer Cytokine, Interferone und anderer Faktoren. Am Ende zeigen sich typische histologische sowie klinische Merkmale einer hämophagocytischen Lymphohistiocytose (FHL).

Obwohl Perforin folglich eine wichtige Rolle bei der körpereigenen Abwehr spielt, ist das Enzym gleichzeitig in der Pathogenese bestimmter Autoimmunerkrankungen von Bedeutung (Trapani und Smyth, 2002). So spielt es beim insulin-abhängigen Diabetes mellitus bei normalgewichtigen Mäusen (NOD) eine entscheidende Rolle. Bei Perforin-defizienten NOD-Mäusen entwickelt sich der Diabetes tatsächlich seltener als bei Wildtyp-NOD-Mäusen (Trapani und Smyth, 2002).

3 Material und Methoden

3.1 Tierzucht

In der Tierhaltung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf wurden folgende Mäuse gezüchtet und unter Standardbedingungen (21 °C; relative Luftfeuchtigkeit 50%; 12 Stunden Tag-Nacht-Rhythmus) gehalten:

- 10 rag2-knockout-Mäuse, denen das „recombination activating gene 2“ (rag2) fehlt, welches zusammen mit rag1 essentiell für die V(D)J-Rekombinase der Immunglobulinketten ist. Bei dieser rag2-Maus handelt es sich um das Taconic Modell RAG2-M, welches durch Kreuzung homozygoter Eltern entstand und den genetischen Hintergrund 129S6/SvEv besitzt. Der Inzuchtstamm 129S6/SvEv entspricht einem Unterstamm („substrain“) von 129S6, welcher für die Züchtung embryonaler Stammzellen bei Knock-out-Mäusen verwendet wird.
- 10 „pore-forming protein perforin“ (pfp)-knockout Mäuse, denen das Perforin-Gen (pfp-Gen) fehlt, welches eine wichtige Rolle bei der Bildung der zytotoxischen T-Lymphozyten sowie der NK-Zellen spielt. Hierbei handelt es sich um das Taconic Modell PFPN12-M mit dem genetischen Hintergrund C57BL/6N12.
- 10 pfp/rag2-doppelknockout Mäuse, die einen kombinierten genetischen Immundefekt aufweisen, also sowohl an funktionsfähigen B- und T-Lymphozyten, als auch an NK-Zellen. Das Taconic Modell hierbei ist PFPRAG-MM und besitzt den genetischen Hintergrund C57BL/6;129S6, welcher einem gemischten Hintergrund entspricht.
- 10 Wildtyp C57BL/6-Mäuse, die als Kontrollgruppe dienen. Diese Kontrolltiere entsprechen der Linie der Jackson Laboratories, also C57BL/6J.

Sowohl die rag2-, die pfp-, als auch die pfp/rag2-Mäuse stammen ursprünglich vom Taconic-Institut (Quality Laboratory Animals and Services for Research, DK8680 Ry, Taconic Europe, Denmark), die Kontrollgruppe C57BL/6 aus den Jackson Laboratories (Maine, USA).

Bei den obengenannten Tieren handelt es sich um Tiere beider Geschlechter. Das Alter lag im Durchschnitt bei 3 Monaten \pm 10 Tagen und das Gewicht jeder einzelnen Maus lag im Bereich von 17,5 g bis 29,4 g.

Gehalten wurden die Tiere pathogenfrei in einzeln gelüfteten Käfigen und mit sterilem Wasser und Standard Futter (ssniff M-Z, extrudiert, ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest) versorgt.

Nach Mitteilung der Ethikkommission der Behörde für Umwelt und Gesundheit Hamburg am 29. April 2003 konnten 40 Mäusen zur Bestimmung der Mikroglia-Differenzierung Organe entnommen und die Tieruntersuchungen entsprechend den Richtlinien für angemessene Laborverfahren durchgeführt werden.

3.2 Histologie

3.2.1 Gewebeentnahme

Die adulten Mäuse wurden durch eine i. p. Injektion mit einem Gemisch aus Ketamin-Rompun-NaCl (12%; 8%; 80%) anästhesiert (je Maus 1% des Körpergewichtes). An der Maus wurde in Rückenlage im Abdominalbereich mit einer Schere ein Schnitt ins Fell vorgenommen, anschließend wurden Fell und Haut mit einem Längsschnitt entlang der Medianlinie nach lateral weggeklappt. Nach Freipräparation des Brustkorbes und der Jugularvenen ermöglichte ein Schnitt unterhalb des Processus xiphoideus sowie die Zwerchfelldurchtrennung eine Eröffnung des gesamten Thorax. Die vordere Thoraxwand wurde mit der Schere entfernt.

Mit Hilfe einer Pinzette ließ sich nun das Herz ruhig halten, um dann, nach Einschneiden des rechten Herzvorhofes und der linken Jugularvene, eine Braunüle in die linke Herzkammer einführen zu können. Danach wurde das Gefäßsystem zunächst für 30 Sekunden mit einem 0,1 M Natrium-Phosphat-Puffer (28,42g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ + 5,52 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ pro 1 Liter 1:1 mit A. dest. verdünnt) bei Raumtemperatur mit einem pH von 7,4 und bei einem Druck von 75 mm Hg gespült. Dann ließ sich das Gewebe durch Perfusion von 4%igem Paraformaldehyd (PFA) in 0,1 M Natrium-Phosphat-Puffer (0,2 M Natrium-Phosphat-Puffer 1:1 mit A. dest. verdünnt) bei Raumtemperatur mit einem pH von 7,4 und einem Druck von 75 mm Hg für insgesamt 12 Minuten fixieren. Anschließend wurde die Haut vom Schädel entfernt, der Schädel geöffnet und das Gehirn weitgehend freigelegt. Danach lagerte der Kopf des Tieres für ca. 2 Stunden in dem 4%igen Paraformaldehyd-Phosphat-Puffer-Gemisch.

Im Anschluss an diese Fixation erfolgte die vollständige Freipräparation des Mäusegehirns: Nach einem horizontalen Schnitt durch den Schädelknochen im Bereich unterhalb der Medulla oblongata durch das Rückenmark wurde ein Schnitt entlang der Sutura sagitalis von caudal nach rostral angelegt. Lateral davon konnten einige koronare Einschnitte vorgenommen werden, um anschließend mit Hilfe einer Pinzette die Schädelkalotte vorsichtig abzuschälen und das Hirn freizulegen. Nach vorsichtigem Durchtrennen der Hirnnerven an der Schädelbasis mittels der stumpfen Seite eines Skalpells konnte das gesamte Gehirn asserviert werden.

Jetzt konnte das Gehirn in einer kleinen Einbettkassette (Tissue-Tek, Sakura, Mega-Cassetten, USA) für weitere 24 Stunden über Nacht in dem 4%igen PFA-Phosphat-Puffer nachfixiert werden.

Am folgenden Tag wurde das Gewebe für weitere 24 Stunden in 0,1 M salinem Phosphat-Puffer (17,8 g Na_2HPO_4 und 16,0 g NaCl pro 1 Liter) bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

Am dritten Tag fand eine weitere Umlagerung in 0,1 M Kalium-Phosphat-Puffer (4,03 g KH_2PO_4 und 17,80 g Na_2HPO_4 pro 1 Liter) mit einem pH von 7,4 statt. Um einem eventuellen Pilz- oder Bakterienwachstum vorzubeugen, gab man Timerosal (5 g Timerosal ad 50 ml A. dest.) zum Puffer dazu (1 ml Timerosal auf 99 ml 0,1 M Kalium-Phosphat-Puffer). Im Kühlschrank bei 4°C konnte man so das Gehirn bis zur weiteren Verarbeitung maximal 6 Wochen aufbewahren. Voruntersuchungen ergaben, dass bei den Gehirnen, denen kein Timerosal zugesetzt wurde, Pilz- und Bakterienwachstum vereinzelt schon nach drei Wochen einsetzte.

3.2.2 Vibratomschnitttechnik

Die Gehirne von 8 Tieren je Genotyp (8 rag2-, 8 pfp-, 8 pfprag2- und 8 C57BL/6-Mäuse) wurden mit dem Vibratom geschnitten. Dafür mussten sie in kleinere Anteile zerkleinert werden: Das Cerebellum wurde als Ganzes vom restlichen Großhirn abgetrennt und einzeln von caudal nach rostral geschnitten. Das Großhirn ließ sich entlang der Sutura sagitalis in zwei gleich große Hälften teilen, wobei man diesmal von rostral nach caudal einzelne Vibratomschnitte herstellen konnte.

Beide Hirnanteile wurden dann mit Sofortklebstoff (Loctite 401, Henkel Loctite Corporation, München) auf ein quadratisches Korkplättchen fixiert: der Cerebellum-Anteil mit seiner rostralen Schnittfläche nach unten, die Hälfte des Cerebrums

hingegen mit der occipitalen Schnittfläche nach unten. So ließen sich beim Kleinhirn-Präparat Schnitte von caudal nach rostral, beim Großhirn-Präparat hingegen Schnitte von frontal nach occipital anfertigen.

Anschließend wurde 6%iger Agar hergestellt, dafür wurde 3 g Agar reinst in 50 ml A. dest. aufgelöst und dreimal hintereinander in der Mikrowelle bei 1000 Watt bis zum Siedepunkt aufgekocht. Danach ließ man den Agar auf etwa 60°C abkühlen.

Mit Hilfe eines Plastikwürfels, den man sonst zur Herstellung von Paraffinblöcken verwendet, ließ sich nun das aufs Korkplättchen geklebte Gewebe ummanteln. So konnte man den flüssigen Agar darüber gießen und anschließend im Kühlschrank bei 4°C für etwa 10 Minuten abkühlen lassen. Nach vorsichtiger Entfernung der Ummantelung wurde nun der hartgewordene Agar zu einer kubischen Form mittels einer Skalpellschneideklinge (Bayha-Skappellschneideklinge STERIL, Bayha GmbH, Tuttlingen) zurechtgeschnitten. Dabei musste darauf geachtet werden, dass ein Abstand vom Gewebe zu Rand des Agars von etwa 3 mm eingehalten wurde.

Jetzt konnte man das im Agar fixierte Gewebe auf dem Korkplättchen in die Einspannvorrichtung des Vibratoms (LEICA VT 1000E Y2K, Leica Instruments GmbH, Nussloch) wiederum mit Hilfe des Sofortklebstoffes festkleben und das gesamte Fach mit 0,1 M Phosphat-Puffer (pH 7,4) bis zum Rand aufgießen. In die Schneidevorrichtung des Gerätes wurde eine zuvor in Aceton eingelegte Rasierklinge (Schick injector, Warner-Lambert Company, USA) eingespannt.

Als optimale Einstellungen am Vibratom ergaben sich eine Schneidegeschwindigkeit bei Stufe 6, eine Schneidefrequenz von 3 und eine am Gerät eingestellte Schnittdicke von 20 µm, wobei sich nach mikroskopischer Kontrolle mit Hilfe der Mikrometerschraube herausstellte, dass die tatsächliche Schnittdicke 18 µm betrug.

Dickere Schnitte von beispielsweise 40 µm, die durch ihre festere Struktur zwar leichter zu schneiden waren, zeigten in der anschließenden NDPase-Färbung jedoch eine zu starke Anfärbung, wodurch sich einzelne Strukturen schlechter voneinander abgrenzen ließen. Bei dünneren Schnitten von beispielsweise 10 µm war das Ergebnis beim Schneiden mit dem Vibratom unbefriedigend: Das Gewebe riss gehäuft an einigen Stellen ein, und das spätere Aufziehen auf einen Objektträger wurde erheblich erschwert, da sich der Schnitt faltete. Es kam vermehrt zu Überlappungen einzelner für die Auswertungen relevanter Strukturen.

Folgende Areale aus dem Cerebrum wurden ausgewertet:

(1) Der motorische Cortex entsprechend Area 6 (Caviness, 1975) und etwa in der gleichen Ebene (2) das Striatum, dargestellt in Figur 23-26 (Atlas von Franklin und Paxinos, 2001), wobei als Orientierungspunkte der Beginn des Corpus callosum und die Commissura anterior dienten (Ip, 2002). Aus demselben Gewebestück konnten weiter occipital gelegene Koronarschnitte der Hippocampus-Formation CA1/3 und der Fimbria hippocampi (4) gewonnen werden. Diese Ebene entsprach der Area 2/3 (Caviness, 1975) bzw. Figur 43-47 (Atlas von Franklin und Paxinos, 2001). Dabei war es möglich, sich am Tractus opticus und am Seitenventrikel zu orientieren, bis dieser beginnt, sich nach unten auszuziehen (Ip, 2002).

Aus dem zweiten Gewebestück, welches das Cerebellum und anteilig den Hirnstamm enthält, konnten Schnitte gewonnen werden vom medialen Anteil des cerebellären Wurms (5) und vom Ncl. nervi facialis (6), wobei der laterale Kleinhirnkern als Orientierungspunkt diente (Ip, 2002); entsprechend Figur 79-80 (Atlas von Franklin und Paxinos, 2001). Als Übersichtsdarstellung ließen sich mittels einer Kresyl-Violett-Färbung die Kerne des Ncl. nervi facialis in jedem 10. Schnitt des zweiten Cerebellum-Gewebestückes sichtbar anfärben, um sicher zu gehen, die richtige Ebene getroffen zu haben.

Die einzelnen Schnitte wurden nach dem Schneiden und sofortigen Entfernen der Agar-Ummantelung in eine mit 0,2 M Tris-Maleat-Puffer (pH 7,2) gefüllte 24-Mikrotiterplatte (MULTIWELL 24WELL, Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NY) überführt und darin über Nacht (12 h) bei 4 °C im Kühlschrank gelagert, so dass sie am folgenden Tag für eine freiflottierende Färbung direkt in der Mikrotiterplatte vorbereitet waren.

3.2.3 NDPase-Enzymfärbung

Die Nucleosid-Diphosphatase spaltet hydrolytisch die terminale Phosphatgruppe vom Inosin-5-Diphosphat (IDP), vom Uridin-Diphosphat (UDP), vom Guanin-Diphosphat (GDP), nicht aber die des Adenosin-Diphosphates (ADP) ab. Da bei Reaktionen meist das IDP als Substrat dient, wird als Synonym für das Enzym NDPase auch der Begriff Inosin-Diphosphatase gebraucht. Die abgespaltene Phosphatgruppe wird von Pb^{2+} eingefangen, und es entsteht als Produkt Bleiphosphat. Nach dem Zusatz von

Mn^{2+} als Katalysator reagiert das Bleiphosphat mit Ammoniumsulfid zu Bleisulfid, welches schwarz ausfällt. So lassen sich spezielle Strukturen braunschwarz anfärben.

Das Reaktionsmedium für die NDPase-Färbung setzte sich zusammen aus 2 ml 0,2 M Tris-Maleat-Puffer (pH 7,2), 0,35 ml Aqua dest., 1 ml 25 mM Manganchlorid (247 mg Mangan(II)-chlorid pro analysi $MnCl_2 \times 4H_2O$ ad 50 ml Aqua dest., E. Merck, Darmstadt), 0,05 ml 1% Dimethylsulfoxid (DMSO, Lot 19052, SERVA GmbH, Heidelberg) und 1 ml 10 mM Inosine-5'-Diphosphat (IDP, I-4375, Lot 081K7009, SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim).

Die genannten Mengenangaben galten für die Färbung von 10 Vibratomschnitten, wobei zwei davon als Negativkontrollen beim Färbevorgang mitgeführt wurden.

Die Vibratomschnitte, welche über Nacht in Tris-Maleat-Puffer bei 4°C in einer Mikrotiterplatte lagerten, wurden zunächst für etwa 5 Minuten in der Mikrotiterplatte im Wasserbad bei 37°C erwärmt, da auch die gesamte Färbung der freiflottierenden Schnitte später im Wasserbad stattfand. Pro Loch wurde jeweils ein Vibratomschnitt allein gefärbt.

Nach Absaugen des Tris-Maleat-Puffers mittels einer Pipette wurden pro Loch 500 µl Reaktionsmedium zum Schnitt hinzugegeben. Eine Negativkontrolle erhielt kein Reaktionsmedium und verblieb im Puffer. Jetzt konnten die Vibratomschnitte im Wasserbad für 30 Minuten inkubieren. Im Gegensatz zu den Versuchen von Ip (2002), bei denen eine Inkubationszeit von 20 Minuten gewählt wurde, stellte sich bei unseren Versuchen heraus, dass eine längere Inkubationszeit bessere Ergebnisse erbrachte. Wurde jedoch die Zeit von 30 Minuten überschritten und beispielsweise 40 Minuten inkubiert, erhielt man zu stark angefärbte Präparate, welche mikroskopisch schlechter auszuwerten waren. Weiterhin ließ bei höheren Temperaturen die Qualität der Färbung auch deshalb zu wünschen übrig, weil sich starke Niederschläge auf den Präparaten ablagerten.

Anschließend wurden mit Hilfe einer Pipette pro Loch 67,5 µl 1% Bleinitrat (0,5 g Blei(II)-nitrat pro analysi $Pb(NO_3)_2$ ad 50 ml Aqua dest., E. Merck, Darmstadt) hinzugegeben, welches zuvor filtriert wurde, um eventuelle Niederschläge zu vermeiden. Wiederum verblieb die Negativkontrolle im Tris-Maleat-Puffer ohne Zusatz von Bleinitrat. Eine weitere Negativkontrolle verblieb ohne Zugabe von Bleinitrat im Reaktionsmedium. Die Mikrotiterplatte wurde nach mehrmaligem vorsichtigem Hinundherschwenken für weitere 40 Minuten ins Wasserbad gestellt,

wobei die Lösung in regelmäßigen Abständen durch Schwenken erneut gut gemischt werden sollte. Auch hierbei ließen sich durch eine längere Inkubationszeit entgegen der durch Ip (2002) etablierten Zeit von 30 Minuten stärker ausgeprägte Färbeergebnisse erzielen.

Nach der zweiten Inkubation wurden alle Vibratonschnitte dreimal gründlich mit Aqua dest. gespült. Danach folgte eine 3 minütige Inkubation in jeweils 500 µl 2% Ammoniumsulfid. Wiederum zeigten verschiedene Voruntersuchungen, dass die von Ip (2002) gewählten 2 Minuten eine blässere Färbung hervorbrachten. Als vermutete Ursachen für die insgesamt längeren Inkubationszeiten nahmen wir Veränderungen in der Herstellung der einzelnen chemischen Substanzen an, die die Grundlagen der Reaktionsmedien darstellten. Anschließend wurden die Schnitte erneut mehrmals mit Aqua dest. gespült.

Während des gesamten Vorganges war eine regelmäßige Kontrolle der Temperatur im Wasserbad erforderlich. Es zeigte sich, dass das ideale Färbeergebnis bei einer Temperatur von 37°C bis 39°C erzielt werden konnte. Bei einer Temperatur unterhalb von 37°C war die Intensität unserer Färbung schwächer ausgeprägt und die zu untersuchenden Areale konnten nicht so deutlich dargestellt werden. Dahingegen kam es bei zu heißen Temperaturen im Wasserbad bei über 40°C zur Faltenbildung einzelner Schnitte. Dies führte zum einen zu einer ungleichmäßig verteilten Färbung des gesamten Schnittes, und zum anderen erschwerte es das anschließende Aufziehen der fertigen Schnitte auf Objektträger.

Nach der NDPase-Färbung wurden die fertigen Schnitte in ein größeres Gefäß mit Aqua dest. überführt. Dadurch ließen sich die einzelnen im Wasser schwimmenden Schnitte einfacher auf einen nichthaftenden Objektträger (Engelbrecht, Medizin- und Labortechnik GmbH, Edermünde) glatt aufziehen und mit Filterpapier vorsichtig andrücken. Bei unseren Voruntersuchungen zeigte sich hier, dass sich beim Aufziehen auf einen selbsthaftenden Objektträger wie beispielsweise von Histobond erheblich häufiger Falten bildeten, die im Nachhinein schlechter geglättet werden konnten als bei den von uns gewählten, nichthaftenden Objektträgern.

Nachdem die Objektträger bei Zimmertemperatur zwei Minuten lang getrocknet waren, wurde jeweils ein Tropfen KAISERS Glyzerin Gelatine (Merck, Darmstadt) mit Hilfe einer Glaspipette direkt auf den Schnitt gegeben und mit einem quadratischen Objektgläschen eingedeckt. Die sonst bei Kühlschranktemperatur aufbewahrte

Gelatine musste zuvor für annähernd 30 Minuten in einem Wasserbad von 40°C erwärmt werden, um sie aus einem festen in einen flüssigen Zustand zu überführen. Nach dem Eindecken wurden die Objektträger für 24 Stunden mit einem Bleigewicht beschwert, um möglichst glatte Präparate zu erhalten und keine Luftblasen unterhalb des Deckgläschens entstehen zu lassen.

Nach einem Tag ließen sich die Ränder der Deckgläschen auf dem Objektträger vorsichtig mit farblosem Nagellack (p2, lasting nailpolish) umpinseln, um auch bei längerem Aufbewahren der Schnitte möglichst luftdicht abgeschlossene Präparate zu behalten.

3.2.4 Nissl-Färbung mit Kresyl-Violett

Die Routinefärbung nach Nissl wurde bei allen drei Ebenen eingesetzt: Sie diente sowohl bei den Koronarschnitten, die den somatomotorischen Cortex und das Striatum enthielten, bei den weiter occipital gelegenen Gewebeschnitten, die den Hippocampus und die Fimbria hippocampi umfaßten als auch bei dem zweiten Gewebeschnitt des Cerebellums sowie des Ncl. nervi facialis als Übersichtsfärbung zur Orientierung und Anfärbung der Zellkerne.

Um in der Ebene des Cerebellums die Kerne des Nervus facialis überhaupt erkennen zu können, welche hier als wichtige Orientierungspunkte dienten, wurde bei diesem zweiten Gewebestück an jedem zehnten frei flottierenden Vibratomschnitt eine Kresyl-Violett-Färbung angefertigt. Dadurch konnten wir genau bestimmen, ob wir uns in der zuvor definierten Ebene befanden und demnach genau dort mit der NDPase-Färbung Mikroglia spezifisch darstellen. Zunächst wurden die zuvor auf einen Objektträger aufgezogenen Schnitte für 30 Sekunden mit einer filtrierten 0,5% Kresyl-Violett (Fluka) in 0,1 M Natriumacetat (pH 3,5)-Lösung gefärbt (0,5 g Kresyl Fast Violett in 100 ml 0,1 M Natriumacetat, pH-Einstellung mit Essigsäure). Danach wurde der Objektträger vorsichtig mit Aqua dest. gespült.

Probefärbungen zeigten zwei unterschiedliche Methoden, die Kresyl-Violett-Färbung zu differenzieren und zu fixieren. Beide lieferten jedoch die gleichen Ergebnisse.

Die etwas aufwändigere Methode wurde anfangs bei einem Drittel der Schnitte angewandt. Bei dieser dehydrierenden Methode wurden die Schnitte kurz in eine aufsteigende Alkoholreihe (70% EtOH, 80% EtOH, 96% EtOH und 100% EtOH)

überführt und bei Raumtemperatur in der jeweiligen Konzentration leicht hin und her geschwenkt.

Jetzt ließ sich durch Lagerung der Objektträger in einer Xylol-Ersatzlösung eine Fixierung der Färbung erreichen.

Nach vorsichtigem Abtupfen der Schnitte ließen wir diese kurz an der Luft trocknen und gaben dann zwei Tropfen wasserfreies Eindeckmedium (Eukitt, O. Kindler GmbH & CO, Freiburg) auf den Objektträger an den Rand des Präparates. Ein quadratisches Deckgläschen wurde vorsichtig in einem ungefähren Winkel von 45° zum Präparat auf den Objektträger gesetzt und auf den Schnitt fallengelassen. Um Einschluss von Luftblasen zu vermeiden, drückten wir vorsichtig mit Filterpapier das Deckgläschen auf dem Objektträger fest. Über Nacht konnten die Schnitte nun flach liegend trocknen.

Die zweite, weniger zeitaufwendige Methode wählten wir für die verbleibenden zwei Drittel der Vibratomschnitte aus. Bei dieser nicht dehydrierenden Methode wurde ein wasserlösliches Medium verwendet. Nach dem Abspülen mit Aqua dest. gaben wir einen Tropfen Crystal/Mount (biomeda corp. Foster City, CA) direkt auf den Schnitt und ließen ihn bei Zimmertemperatur antrocknen. Anschließend wurde der Schnitt mit Clarion (biomeda corp. Foster City, CA) eingedeckt und wiederum mit einem Filterpapier fest angedrückt. Auch bei dieser Methode sollten die Schnitte über Nacht komplett antrocknen.

3.2.5 Paraffinschnitttechnik

Neben der Vibratomschnitttechnik wurden an insgesamt 8 Mäusen (jeweils 2 rag2-, 2 pfp-, 2 pfp_{rag2}- und 2 C57BL/6-Mäuse) 4 µm dicke Paraffinschnitte für immunhistochemische Färbungen und für die Färbung mit Kresyl-Violett nach Nissl angefertigt. Nach Perfusion mit 4% PFA und Entnahme des Gehirns unterteilten wir das gesamte Gehirn zunächst in insgesamt vier unterschiedliche Bereiche. Mittels eines Sagitalschnittes ließ sich das Gehirn in zwei Anteile zerlegen, wobei sich einer davon wiederum durch zwei koronare Schnitte in drei Anteile zerlegen ließ. Hierbei halbierten wir das Cerebrum und trennten es vom Cerebellum ab. Die einzelnen Anteile wurden nun in Einbettkassetten über Nacht (12 Stunden) zur Nachfixierung nochmals im 4% PFA-Gemisch belassen und anschließend in 0,1 M Phosphat-Puffer (PB) für weitere 12 Stunden bei 4°C aufbewahrt. Mittels einer aufsteigenden 2-

Propanolreihe (50%, 70%, 90%, absoluter Alkohol) wurde das Gewebe dehydriert. Schließlich folgte eine Einbettung in Paraplast.

Aus den Paraffinblöcken ließen sich nun mit einem Schlittenmikrotom (MICROM GmbH, Type HM 400 R, Ser. Nr. 10951, Walldorf) 4 µm dicke Schnitte anfertigen. Die Schnitte wurden bei 40°C im Wasserbad gestreckt und auf beschichtete Objektträger (HistoBond Adhäsions-Objektträger, Marienfeld GmbH & Co. KG, Landa-Königshofen) aufgezogen. Anschließend wurden sie bei 37°C im Brutschrank über Nacht getrocknet, entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert.

3.2.6 Nissl-Färbung mit Kresyl-Violett

Um sicherzugehen, die richtige Ebene für die darauf folgenden immunhistochemischen Färbungen getroffen zu haben, diente die Kresyl-Violett-Färbung zur Orientierung. Das Vorgehen dabei entsprach dem bei den Vibratomschnitten, nur dass hier alle gefärbten Schnitte mit einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und anschließend mit Eukitt eingedeckt wurden.

3.2.7 Immunhistochemische Färbungen

An den Paraffinschnitten wurden zur Darstellung von Gliazellen zwei unterschiedliche Antikörper eingesetzt:

- (1) Anti-CNPase zur Darstellung der Oligodendrozyten
- (2) Anti-GFAP zur Astrozyten-Darstellung

Da sich die einzelnen Färbungen nur in wenigen Schnitten voneinander unterscheiden, lassen sich die einzelnen Reaktionsschritte anhand der Anti-CNPase-Färbung beispielhaft erläutern.

Abweichungen bei Anti-GFAP-Färbung werden anschließend gesondert aufgeführt.

3.2.7.1 *Anti-CNPase*

Zur Darstellung der Oligodendrozyten wurde als Primärantikörper die Anti-2',3'-zyklische Nukleotid 3'-Phosphodiesterase (monoklonale Maus-anti-CNPase, C5922,

SIGMA BioSciences, St. Louis, USA) in einer Verdünnung von 1:200 verwendet. Dabei handelt es sich um ein Enzym, welches sich nur in Zellen befindet, die im ZNS und im peripheren Nervensystem (PNS) Myelin bilden, also vor allem in den Oligodendrozyten des ZNS und den Schwann-Zellen des PNS. Somit lassen sich mithilfe dieses Antikörpers besonders gut Oligodendrozyten markieren.

Zur Vorbehandlung wurden die Schnitte in einer feuerfesten Form in der Mikrowelle in Citratpuffer (4,2028 g Citronensäure Monohydrat ad 2000 ml Aqua dest., pH 6) bei 1000 Watt zum Kochen gebracht und dann in Zyklen von je 5 x 2 Minuten bei 500 Watt weitergekocht. Zur Inaktivierung der endogenen Peroxidaseaktivität inkubierten wir die Schnitte für 20 Minuten in 3% H₂O₂ in Methanol. Es empfahl sich die Schnitte danach 2 x 5 Minuten in Aqua dest. und darauffolgend 3 x 5 Minuten in 0,1 M salinem Phosphat-Puffer (PBS) zu spülen. Um unspezifische Bindungen zu unterdrücken, wurden die Schnitte anschließend in einem Kaninchen-Normalserum (DAKO X0902, DAKO A/S, Glostrup, Dänemark) 1:10 in Antibody Diluent with Background Reducing Components (DAKO S3022, Glostrup, Dänemark) für 30 Minuten inkubiert. Es folgte über Nacht (12 h) bei 4°C eine Inkubation mit dem primären Antikörper (monoklonale Maus-anti-CNPase, s. o.) in einer Verdünnung von 1:200. Am nächsten Tag konnten die Schnitte für 3 x 5 Minuten in PBS gespült werden. Anschließend wurde als sekundärer Antikörper Kaninchen-anti-Maus (DAKO E 0464, Glostrup, Dänemark) in einer Verdünnung von 1:200 für 30 Minuten bei Raumtemperatur eingesetzt. Nach Spülen in PBS für 2 x 5 Minuten und anschließend ebenfalls für 2 x 5 Minuten in Kalium-Phosphat-Puffer (4,9 g KH₂PO₄ + 29,2 g Na₂HPO₄; pH 7,4) erfolgte die Entwicklung des 3'3'-Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid (DAB, SIGMA, St. Louis, USA, Code no. D5637-5G) mit Glucose-Oxidase (90 ml 0,1M Kalium-Phosphat-Puffer pH 7,4; 45 mg DAB, 36 mg Ammoniumchlorid; 1,8 ml 0,05 M Nickelsulfat; 1,8 ml 10% Glucose; 300 µl Glucoseoxidase) für 25-30 Minuten unter mikroskopischer Kontrolle. Im Anschluss daran wurden die Schnitte für weitere 5 Minuten in Aqua dest. gespült. Wir verzichteten bewusst auf eine zusätzliche Kerngegenfärbung. Jetzt wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkohohlreihe (70%, 96%, 96%, 100%, 100% absoluter Alkohol) dehydriert und mit Eukitt eingedeckt.

Die alleinige Entwicklung mit DAB ergäbe eine spezifische, jedoch weniger farbintensive, bräunliche Färbung. Mittels der Glucoseoxidase-Verstärkung erhielten wir als Ergebnis jedoch eine starke, schwarze, spezifische Färbung.

Negativkontrollen, bei denen der Primärantikörper wegfiel, zeigten keine Anfärbungen, wodurch sich die Spezifität der immunhistochemischen Färbung sicherstellen ließ.

3.2.7.2 Anti-GFAP

Um die Astrozyten spezifisch darzustellen, verwendeten wir das Kaninchen-anti-Kuh-GFAP (Dako Z0334, Glostrup, Dänemark) in einer Verdünnung von 1:800 als primären Antikörper. Dieser polyklonale Antikörper ist gegen das astrozytenspezifische Intermediärfilament GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein), ein Zytoskelett-Protein, gerichtet. Für die GFAP-Färbung wurden die Schnitte ebenfalls mit Citratpuffer in der Mikrowelle vorbehandelt. Nach Inaktivierung der endogenen Peroxidase, wie bei der CNPase-Färbung, wurde Schweineserum in einer Verdünnung von 1:10 als Normalserum eingesetzt. Anschließend wurden die Schnitte mit dem primären Antikörper über Nacht inkubiert und am folgenden Tag mit PBS gespült. Der nun folgende sekundäre Antikörper bei dieser Färbung war ein Schwein-anti-Kaninchen (DAKO E 0353, Glostrup, Dänemark). Auch hier folgte nach 30 minütiger Inkubation eine weitere Spülung mit PBS. Anschließend wurden die Schnitte in 0,5 mg DAB in 0,1 M Tris Puffer (Trizma base, minimum, T 1503, SIGMA-ALDRICH, Steinheim) bei einem pH von 7,6 entwickelt.

3.3 Elektronenmikroskopie

Für die Elektronenmikroskopie wurden je vier NDPase-gefärbte Vibratomschnitte von 2 C57BL/6-, 2 rag2-, 2 pfp- und 2 pfp/rag2-Mäusen mit gepuffertem Osmiumtetroxid (1% Osmiumtetroxid in 0,1 M Phosphat-Saccharose-Puffer) für zwei Stunden nachfixiert und anschließend in einer aufsteigenden Ethanolreihe (35% - 100%) dehydriert. Nach Spülung in Propylenoxid wurden die Gewebstücke in Glycidether (Serva, Heidelberg) eingebettet. Anschließend wurde ein Gewebestück, welches den Motocortex enthält, unter der Stereolupe herausgetrimmt und aufgeblockt. Jetzt konnten 70 - 90 nm ultradünne Schnitte mit dem Sorvall Porter-Blum MT2-B ULTRA-MICROTOME (Norwalk, Connecticut, USA) von den Laminae I-VI des cerebralen Cortex angefertigt werden. Nach Kontrastierung mit 1% Uranylacetat und Bleicitrat ließen sich die Schnitte mit einem Philips CM100 Transmissions-

Elektronenmikroskop untersuchen. Zellen mit schwarzem Reaktionsprodukt wurden genauer untersucht, insbesondere solche Zellen, deren äußere Zellmembran das Reaktionsprodukt zeigte. Pro Tier wurden etwa 10 solcher Zellen fotografiert und ihr Aufbau mit Zellorganellen beschrieben (Lorke et al., 2005).

3.4 Morphometrie

An den NDPase-gefärbten Vibratonschnitten wurde eine morphometrische Auswertung der Mikroglia vorgenommen. Die genaue Beschriftung jedes einzelnen Objektträgers wurde mit einem Klebeband verblindet. Jetzt ließen sich, ohne zu wissen, um welchen Stamm der Mäuse (rag2-, pfp-, pfp/rag2- oder C57BL/6-) es sich jeweils handelte, die einzelnen Mikroglia-Zellen inklusive der perivaskulären Mikroglia unter dem Lichtmikroskop zählen. Die Zählung fand an 6 verschiedenen Hirnregionen statt. Wir untersuchten die Somatomotorische Rinde, die Molekularschicht des Striatum, CA1/3 des Hippocampus, die Fimbria hippocampi, den Ncl. nervi facialis sowie die Körnerschicht des cerebellären Wurms.

Unter einem Lichtmikroskop von Zeiss (Zeiss Axioplan, Göttingen) in 400 facher Vergrößerung ließen sich die einzelnen Mikroglia-Zellen mit Hilfe eines Zählgitters im Okular, welches eine korrespondierende Fläche von 0,0961 mm² besaß, auszählen. Nach vorheriger Festlegung wurden am oberen sowie am linken Zählgitterrand auch die Mikroglia-Zellen mitgezählt, die auf die Begrenzungslinie des Zählgitters trafen. Auf den unteren und rechten Zählgitterrand treffende Zellen wurden nicht mitgezählt. Die Anzahl der Mikroglia ließ sich ermitteln, indem alle Zellen gezählt wurden, bei denen deutlich die Perikaryen zu erkennen waren. Pro Hirnregion wurden bei 28 Tieren (7 rag2-, 7 pfp-, 7 pfp/rag2- und 7 C57Bl/6-Mäuse) eine zuvor festgelegte Anzahl von Zählfeldern definiert und ausgewertet (Somatomotorische Rinde 9, Striatum 9, Molekularschicht des Hippocampus 9, Fimbria hippocampi 6, Ncl. nervi facialis 10, Cerebellum 12), so dass die Summe je Region etwa 100 Zellen ausmachte. Somit betrug die gemessene Fläche bei jedem Tier für die somatomotorische Rinde 0,8649 mm², für das Striatum 0,8649 mm², für den Hippocampus 0,8649 mm², für die Fimbria hippocampi 0,5766 mm², für den Ncl. nervi facialis 0,961 mm² und 1,1532 mm² für das Cerebellum.

Zur Größenbestimmung der Perikaryen der NDPase-gefärbten Mikroglia wurden die Präparate mittels des Lichtmikroskops von Zeiss, einer digitalen Kamera Axiocam

MRc (Zeiss, Göttingen) und dem Bildanalyseprogramm P4 PC multilingual (D) Siemens SCENIC W300 auf einen Monitor (SIEMENS MCM 17P3, 40cm, 17``) projiziert. Mit dem Programm AxioVision (Zeiss, Göttingen) ließen sich die Konturen der Perikaryen von 50 Mikroglia-Zellen pro Region und Tier manuell abfahren und die jeweilige Fläche jeder einzelnen Mikroglia-Zelle bestimmen. Aus dem ermittelten Flächenmaß konnten wir anschließend den mittleren Durchmesser der Zellen errechnen, um diesen später in unsere Rechnungen mit einzubeziehen.

Zur Kontrolle der durchschnittlichen Schnittdicken der Vibratomschnitte wurde am Mikroskop jeweils die obere und die untere Oberfläche der Vibratomschnitte fokussiert und die Differenz mit der Feinfokus-Mikrometerschraube ermittelt. Es ergab sich bei der Einstellung von 20 µm am Vibratom während des Schneidevorgangs eine durchschnittliche Dicke von 18 µm.

Durch Anwendung der Formel von Abercrombie (1946) ließ sich die genaue Dichte der Mikroglia durch Korrektur der Zellzählung ermitteln, um eventuell doppelt gezählte Mikroglia zu verrechnen:

$$P=A*[M/(L+M)]$$

P entspricht dabei der korrigierten Anzahl der Mikroglia pro mm², A bezeichnet die gezählte Anzahl an Mikroglia pro mm², M die Schnittdicke der Vibratomschnittpräparate in µm und L die durchschnittliche Länge bzw. der durchschnittliche Durchmesser der Perikaryen.

Weiterhin wurden die Cortex-Dicke bei allen Tieren der vier Genotypen unter dem Lichtmikroskop mit einem geeichten Mess-Okular von Zeiss (Zeiss, Göttingen) und der Querdurchmesser des Cerebellums mit einem Lineal per Hand gemessen.

Die statistische Analyse wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Michael Bubenheim vom Institut für Medizinische Biometrie und Epidemiologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf durchgeführt: Es wurden sowohl die Zellzahlen und die Durchmesser der Mikroglia in allen sechs Hirnregionen als auch die Cortex-Dicke von außen bis zur Angrenzung an die weiße Hirnsubstanz und der Cerebellum-Querdurchmesser aller vier Genotypen miteinander verglichen. Hierzu wurde der Kruskal-Wallis-Test (H-Test) zum Vergleich von mehr als zwei nicht normalverteilten Variablen angewendet. Mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha = 0,0083$ ($\alpha =$

0,05/6) bezogen auf alle sechs Hirnregionen (Paarvergleiche nach BONFERRONI) ließ sich jetzt die Signifikanz beim Vergleich der Genotypen prüfen.

Falls sich dabei ein signifikanter Unterschied ergab, wurde anschließend der nichtparametrische Mann-Whitney-Test für unabhängige Stichproben (U-Test nach Wilcoxon) angewandt, um jeweils die einzelnen Genotypen gegeneinander zu prüfen. Die dabei ermittelten sechs p-Werte wurden nun der Größe nach angeordnet, wobei mit dem kleinsten Wert begonnen wurde. Da es bei diesem paarweisen Vergleich sechs Möglichkeiten gab, die vier Genotypen gegeneinander zu prüfen, musste die beim Kruskal-Wallis-Test angewandte Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha = 0,0083$ jeweils durch die noch übrigbleibenden Vergleichsmöglichkeiten dividiert werden. So betrug das Signifikanzniveau $\alpha = 0,0083/6$ und im Falle, dass der P-Wert kleiner war, wurde dementsprechend mit dem zweitkleinsten P-Wert fortgefahren und dieser mit einem $\alpha = 0,0083/5$ verglichen usw. (Paarvergleiche nach BONFERRONI). So konnte man genau bestimmen, in welcher Hirnregion welche zwei Genotypen signifikante Unterschiede im Bezug auf die untersuchten Größen zeigten. Auf die gleiche Weise wurden bei der Signifikanzprüfung die Unterschiede zwischen den Hirnregionen innerhalb eines bestimmten Genotyps verglichen.

4 Ergebnisse

4.1 Morphologie

4.1.1 Hirnstruktur

Die C57BL/6-Kontrolltiere ließen in der Kresyl-Violett-Übersichtsfärbung (Abb. 4-1a) die einzelnen Schichten des motorischen Cortex gut erkennen. Der äußeren, zellarmen Lamina molecularis I folgte die Lamina granularis externa II und die Lamina pyramidalis externa III, die jedoch sehr schlecht voneinander zu trennen waren. An die äußere Pyramidenschicht schlossen sich die Lamina granularis interna IV und die Lamina pyramidalis interna V an. Als innerste Schicht folgte die Lamina multiformis VI, deren Zellen im Vergleich zu beiden Pyramidenschichten kleiner waren, so dass ihre Abgrenzung zur Lamina pyramidalis interna leichter fiel.

Die rag2-Mutante (Abb. 4-1b) zeigte den gleichen 6-schichtigen Aufbau der einzelnen Laminae. Es ließen sich keine Fehlbildungen finden. Weiterhin wurden keine Zellen entdeckt, die auf akute oder chronische entzündliche Reaktionen oder Infiltrate hinwiesen, wie etwa neutrophile Granulozyten, Monozyten oder Lymphozyten. Es ließ sich weder eine entzündliche Infiltration der Kapillarwände entdecken, noch Abzessbildungen, Apoptosen oder Nekrosen im Gewebe selbst.

Die pfp- (Abb. 4-1c) und pfp/rag2-Mäuse (Abb. 4-1d) unterschieden sich im morphologischen Aufbau des motorischen Cortex weder vom Aufbau der C57BL/6-Kontrolltiere noch von dem der rag2-Mutanten. Auch bei ihnen ließen sich weder Fehlbildungen, noch Entzündungszeichen, Zeichen von Zelluntergang oder Nekrosen finden.

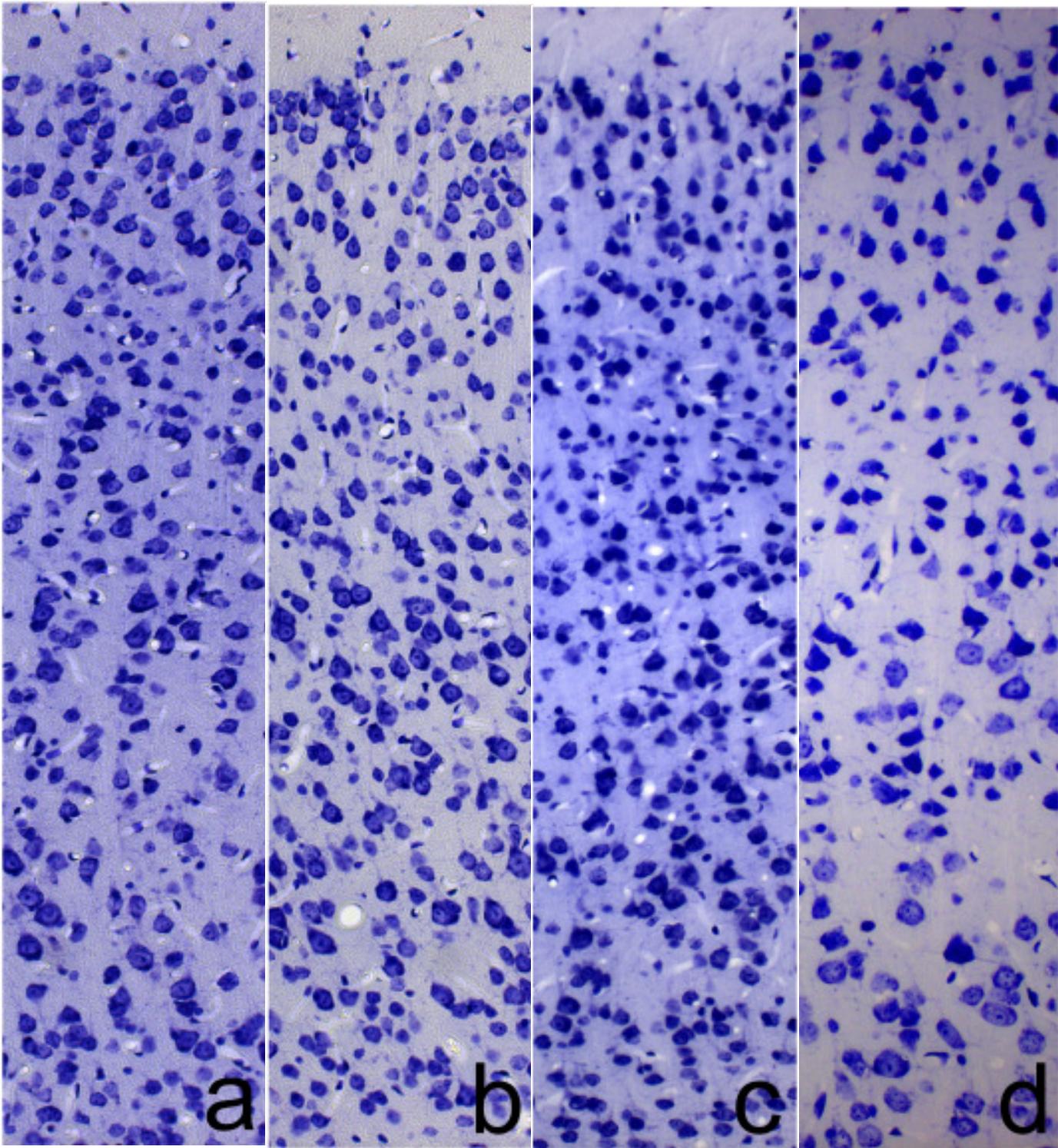


Abb. 4-1: Motocortex, Kresyl-Violett-Färbung nach Nissl. Sowohl bei der Kontrolle C57BL/6 (**a**) als auch bei den drei immundefizienten Mäusen rag2-knockout (**b**) pfp-knockout (**c**) und pfp/rag2-doppelknockout (**d**) lässt sich der laminäre Aufbau (äußere, zellarme Lamina molecularis I, Lamina granularis externa II, Lamina pyramidalis externa III, Lamina granularis interna IV, Lamina pyramidalis interna V und die Lamina multiformis VI) gut erkennen. Bei den Mutanten lassen sich weder pathologische Veränderungen, wie Infiltrationen, Apoptosen oder Nekrosen noch Fehlbildungen erkennen. 280x.

4.1.2 Mikroglia

Mit der enzymhistochemischen NDPase-Färbung an den Vibratomschnitten konnte man Mikroglia sowie Gefäße spezifisch darstellen. Die ruhenden Mikroglia-Zellen besaßen ein kleines Perikaryon, von dem aus mehrere, verzweigte Fortsätze entsprangen (vgl. z.B. Abb. 4-2). Bei den Kontrolltieren C57BL/6 ließen sich je nach Lokalisation drei morphologisch verschiedene Arten von Mikroglia erkennen:

Die erste Form der ruhenden Mikroglia war deutlich erkennbar im Motocortex (Abb. 4-2a), im Hippocampus (Abb. 4-3a), im Striatum (Abb. 4-4a), in der Körnerschicht des Cerebellums (Abb. 4-5a) und im Ncl. nervi facialis (Abb. 4-6a), also in der grauen Substanz. Dieser strahlenförmige Typ besaß ein rundes bis ovales Perikaryon, welches teilweise auch eine dreieckige und vereinzelt eine länglich ausgezogene Form aufwies. Dem Perikaryon entsprangen etwa 3-5 primäre Fortsätze, die in alle Richtungen verliefen und diesem Mikroglia-Typ ein sternförmiges Aussehen verliehen. Im Verlauf von zentral nach peripher wurden die Zellausläufer immer feiner und zeigten starke Verzweigungen in zahlreiche, filigrane Nebenäste.

Weiterhin zeigten sich vereinzelt, vor allem im Ncl. nervi facialis (Abb. 4-6a▶), mikrogliale Fortsätze, die netzartige Strukturen um die Zellkörper der Neurone bildeten und so eine Art Fasernetz sichtbar machten. Das Phänomen der netzartigen Anlegung an Neurone fand sich vereinzelt in allen Hirnregionen, war jedoch am deutlichsten im Ncl. nervi facialis ausgeprägt.

Die zweite Form der ruhenden Mikroglia konnten wir besonders zahlreich in der Fimbria hippocampi, also in der weißen Substanz finden (Abb. 4-7a). Bei diesem longitudinalen Typ zeigte sich ein verlängertes, grober wirkendes Perikaryon, von dem aus sich 2 - 4 feine Fortsätze abzweigten, die entlang der Faserrichtung der neuronalen Faserstränge verliefen. Senkrecht zum Hauptast gaben sie mehrere, kurze Nebenäste ab. Insgesamt machte diese Form der Mikroglia einen eher plumpen Eindruck, da die Verzweigungen hier wesentlich weniger stark ausgeprägt und die Verästelungen sehr viel kürzer waren als bei der ersten Form der Mikroglia. Die Nebenäste erschienen in sich dicker und weniger filigran als beim ersten Typ der Mikroglia. Weiterhin ließ sich schon auf den ersten Blick erkennen, dass in der Fimbria hippocampi die Anzahl der Mikroglia erheblich geringer war als beispielsweise im Motocortex, im Striatum und im Hippocampus und daher die Abstände zwischen den einzelnen Zellen größer waren.

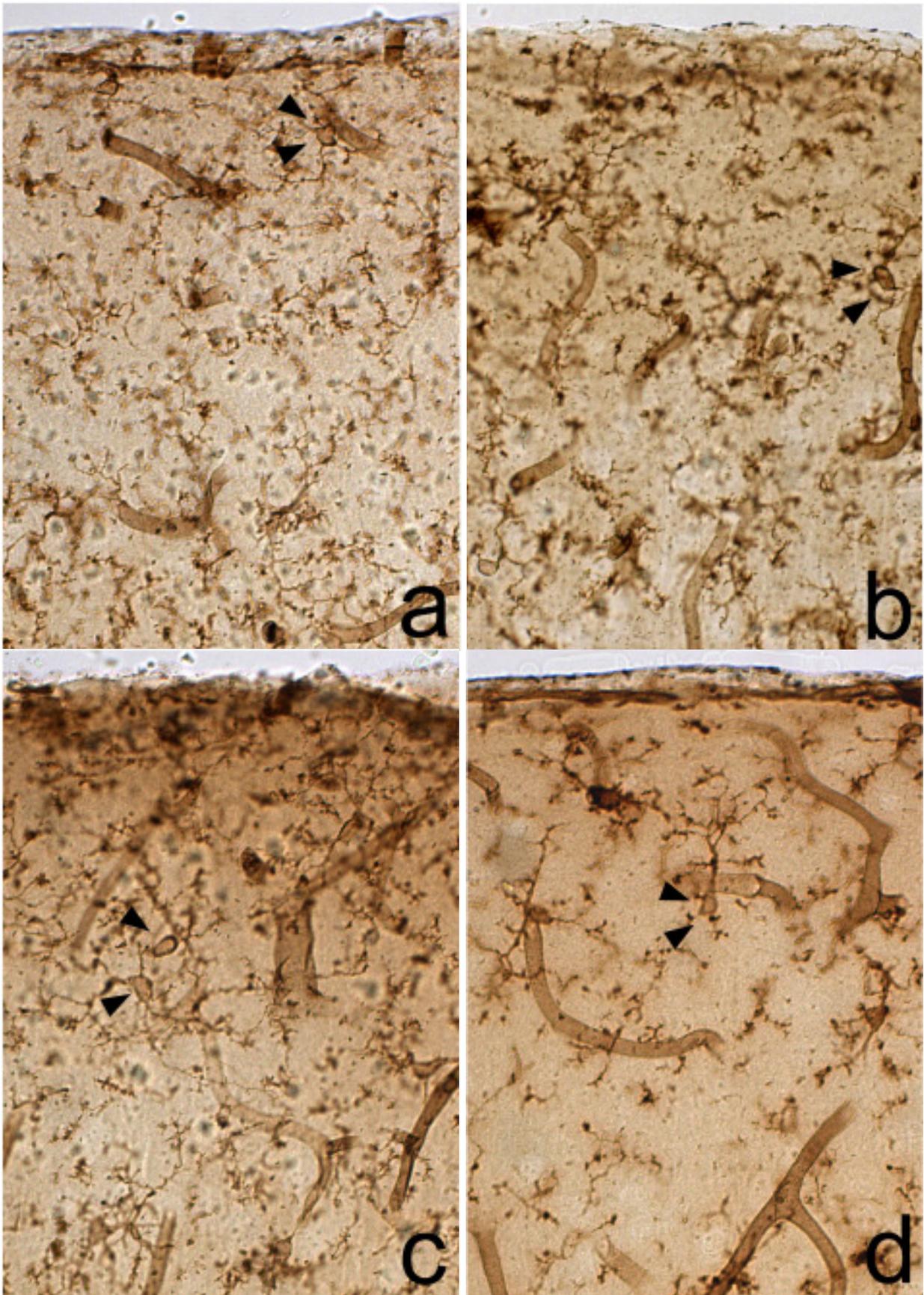


Abb. 4-2: Darstellung der braungefärbten Mikroglia in der NDPase-Enzymhistochemie im Motocortex. Ebenso wie bei der Kontrolle C57BL/6 (a) zeigt sich die Mikroglia bei der rag2-knockout (b), pfp-knockout (c) und pfp/rag2-doppelknockout Maus (d) als ruhende, nicht aktivierte Form mit kleinen, runden bis ovalen Perikaryen. Erkennbar sind sternförmig verzweigte Fortsätze, die nach peripher immer feiner und filigraner werden (▶). Weiterhin Anfärbung der Kapillaren als große und glattbegrenzte Strukturen. 480x.

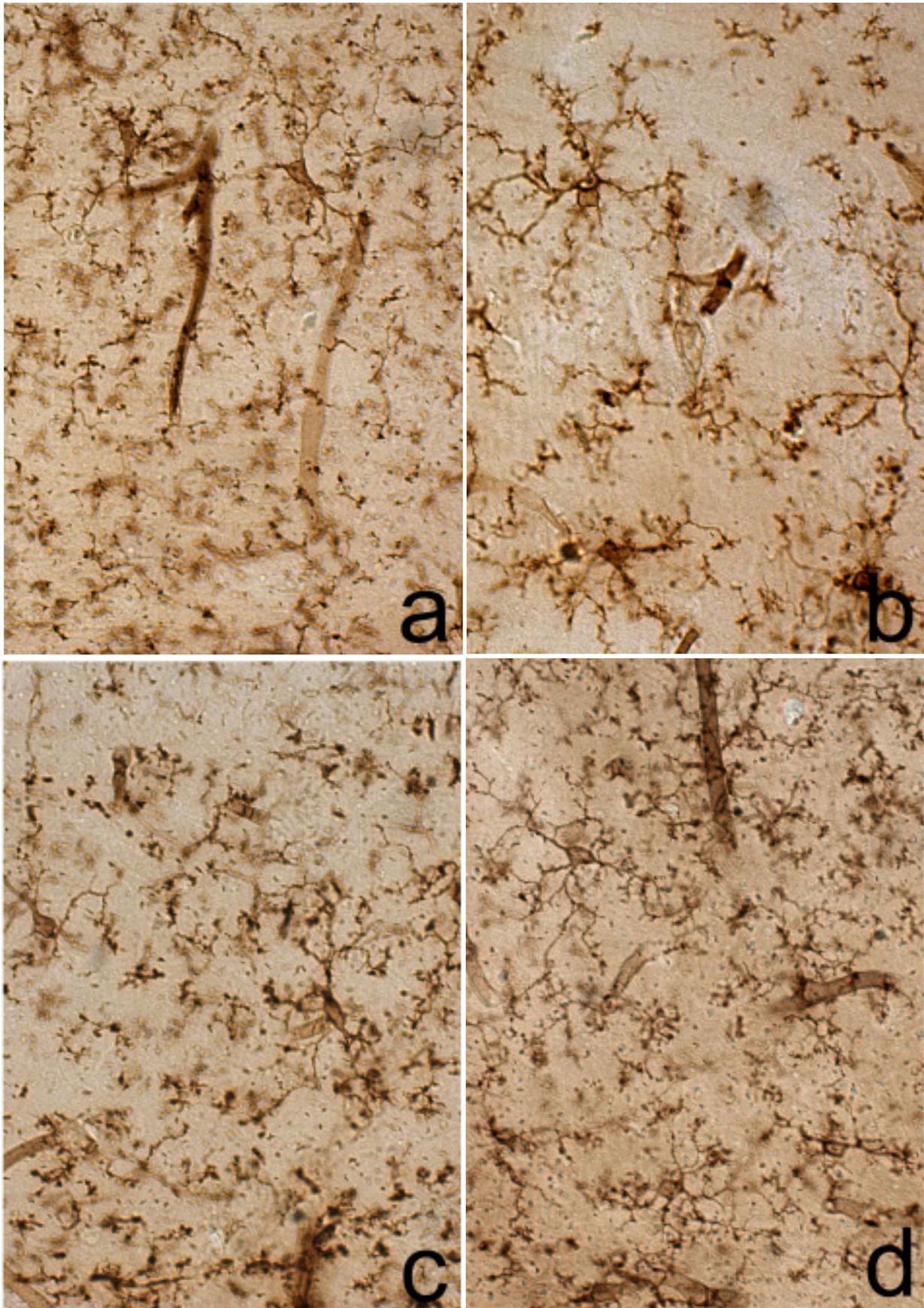


Abb. 4-3: Ruhende Mikroglia in der in der NDPase-Enzymhistochemie im Hippocampus (CA1/CA3). Die Kontrolle C57BL/6 (a) sowie die rag2-knockout (b), die pfp-knockout (c) und die pfp/rag2-doppelknockout Maus (d) zeigen kleine, runde bis ovale Perikaryen mit zahlreichen, sich sternförmig verzweigenden Fortsätzen. 480x.

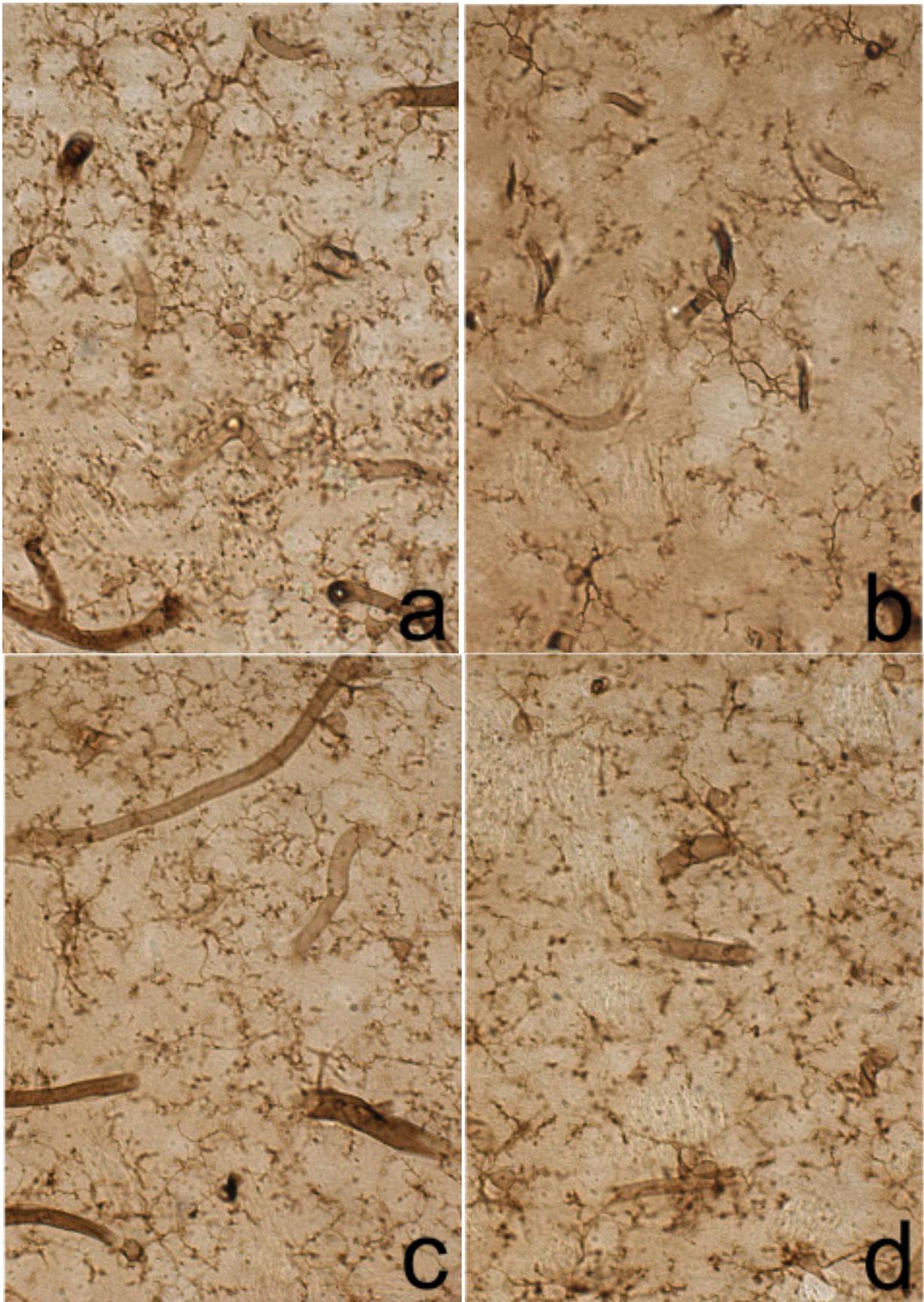


Abb. 4-4: Darstellung durch NDPase-Enzymhistochemie im Striatum. Bei der Kontrolle C57BL/6 (a) lassen sich kleine, rundlich-ovale Perikaryen mit zahlreichen, sternförmig verzweigten Fortsätzen erkennen. Die rag2-knockout Maus (b) zeigt ruhende, nicht aktivierte Mikroglia mit runden Perikaryen und Zellausläufern, die nach peripher immer feiner und filigraner werden. Die pfp-knockout (c) und pfp/rag2-doppelknockout Maus (d) weisen die gleichen typischen Eigenschaften auf. 480x.

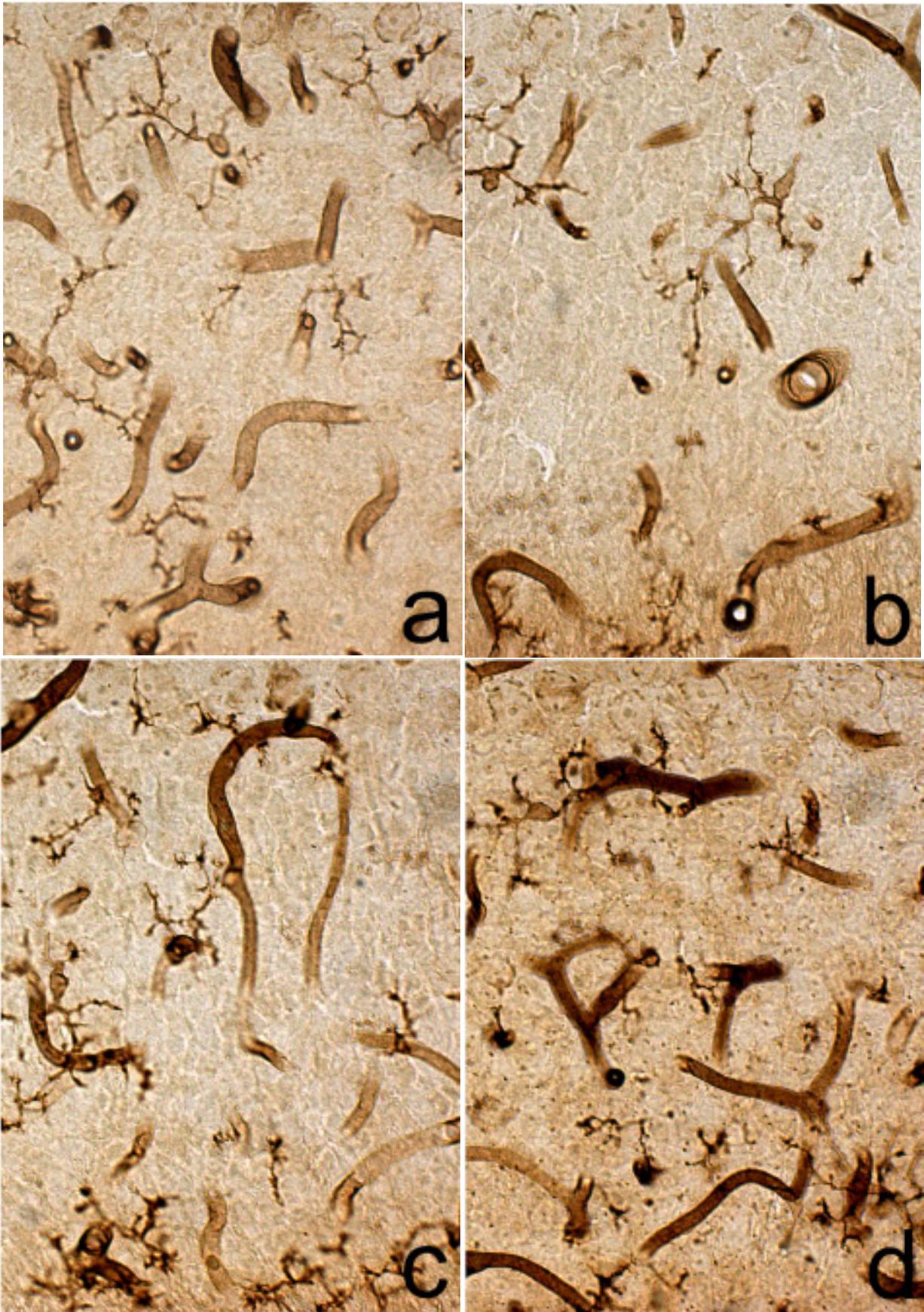


Abb. 4-5: NDPase-Färbung der ruhenden, nicht aktivierten Mikroglia im Cerebellum. Gleiche morphologische Eigenschaften der Mikroglia bei der Kontrolle C57BL/6 (a), der rag2-knockout (b), der pfp-knockout (c) und der pfp/rag2-doppelknockout Maus (d): kleine, runde bis ovale Perikaryen mit zahlreichen, sich sternförmig verzweigenden Fortsätzen, die nach peripher immer feiner und filigraner werden. 480x.

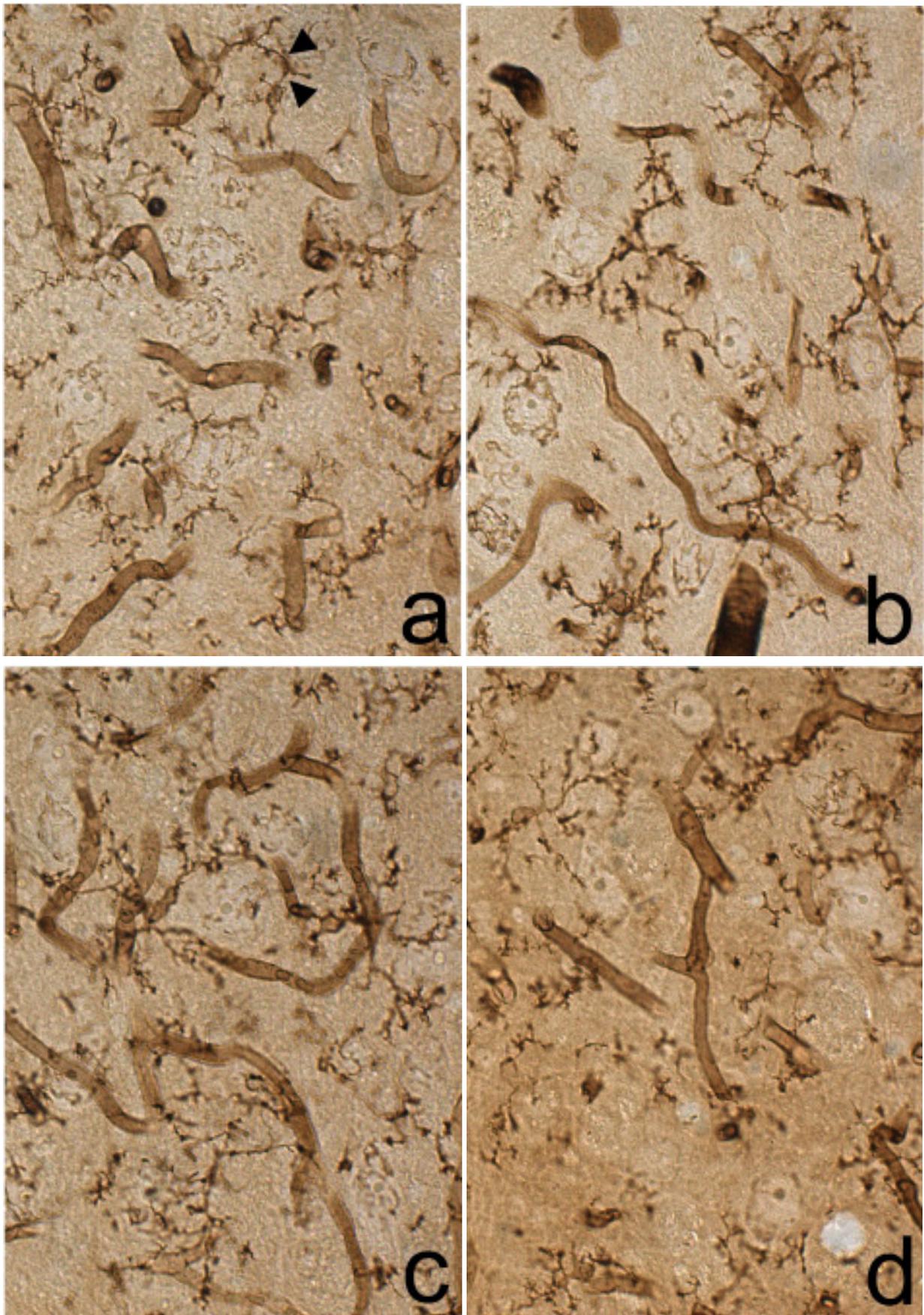


Abb. 4-6: Ruhende Mikroglia in der NDPase-Enzymhistochemie im Ncl. nervi facialis. Die Kontrolle C57BL/6 (a) zeigt kleine, rundlich-ovale Zellkerne mit zahlreichen Fortsätzen. Dieser Aufbau der Perikaryen und die typischen, nach peripher immer feiner und filigraner werdenden Verzweigungen finden sich auch in der rag2-knockout (b), der pfp-knockout (c) und der pfp/rag2-doppelknockout Maus (d). ► Mikroglia, die sich netzartig um die Facialis-Neurone legt. 480x.

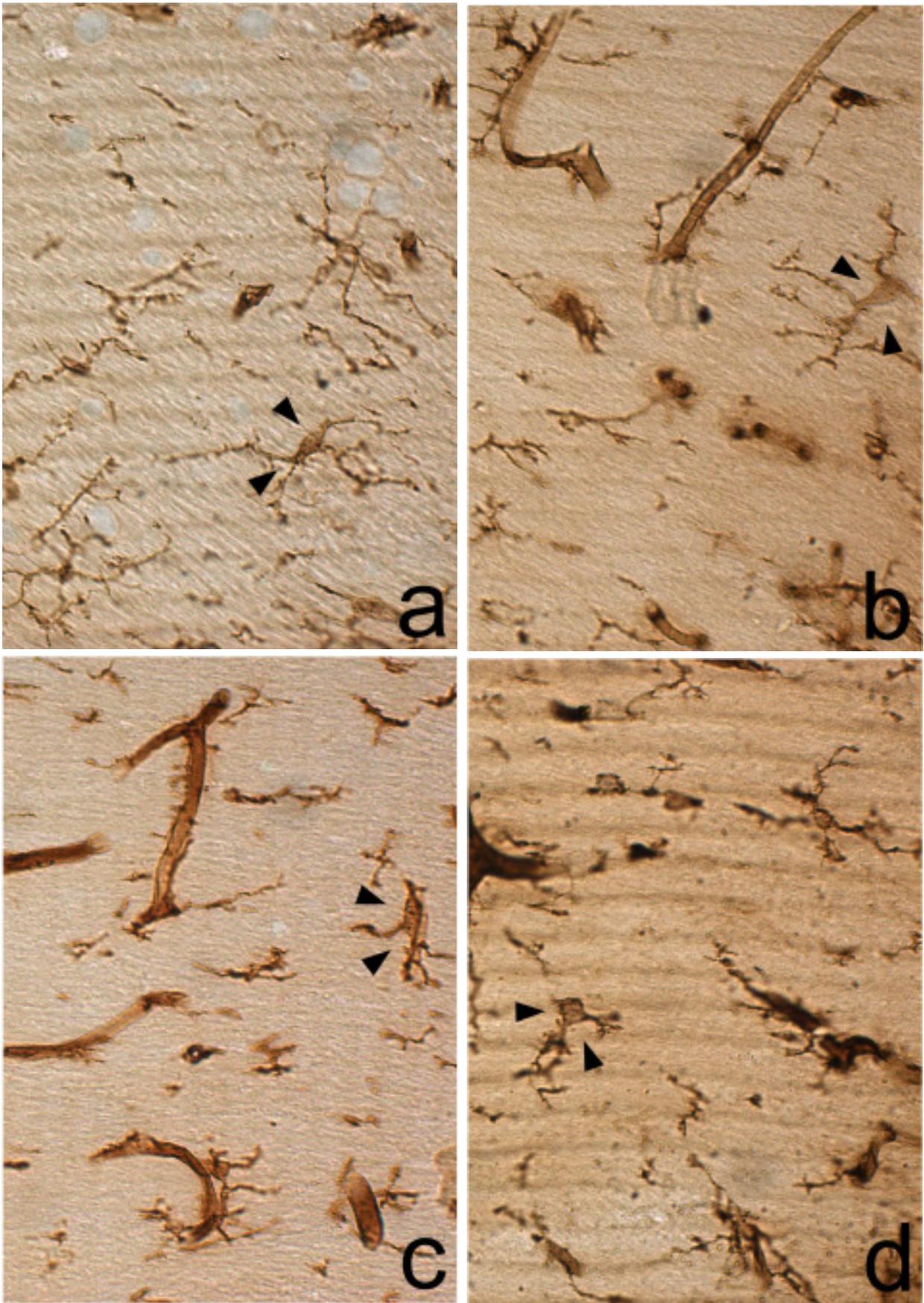


Abb. 4-7: Ruhende Mikroglia in der Fimbria hippocampi. Sowohl die Kontrolle C57BL/6 (a) als auch die rag2-knockout (b), die pfp-knockout (c) und die pfp/rag2-doppelknockout Maus (d) lassen ein verlängertes, grob wirkendes Perikaryon mit fein verzweigten, entlang der Faserrichtung verlaufenden Fortsätzen erkennen (▶). Insgesamt sind weniger Verzweigungen und kürzere, dickere und weniger filigrane Nebenäste erkennbar als beim ersten Mikroglia-Zelltyp in den vorherigen Hirnregionen. 480x.

Die dritte sehr kompakte Variante der Mikroglia besaß einen runden oder ovalen länglichen Zellkörper. Sie hatte sehr wenige und kurze, jedoch dickere Fortsätze als die beiden anderen Mikroglia-Typen, trat in allen Hirnregionen nur extrem selten auf und machte weniger als 0,5% aller Mikroglia-Zellen aus.

Die rag2-Mutante zeigte in den untersuchten Hirnregionen keinerlei morphologische Unterschiede der Mikroglia im Vergleich mit den Kontrolltieren. Auch sie ließ die unterschiedlichen Mikroglia-Typen, den sternförmigen Typ in der grauen Substanz (Abb. 4-2b, 4-3b, 4-4b, 4-5b und 4-6b), den longitudinalen in der weißen Hirnsubstanz (Abb. 4-7b) und den nur sehr vereinzelt auftretenden kompakten Mikroglia-Typ erkennen. Ebenso wie die Kontrollmäuse wiesen auch die rag2-Mäuse keine weiteren Auffälligkeiten auf und keine morphologischen Zeichen einer Aktivierung. Es zeigte sich also keine intensivere NDPase-Färbung, es ließen sich keine Vergrößerung der Zelleiber und keine vermehrt plumpen Fortsätze entdecken. Weiterhin fiel keine Vermehrung der Mikroglia auf.

Sowohl die pfp-Mutante (Abb. 4-2c bis 4-7c) als auch die Doppelmutante pfp/rag2 (Abb. 4-2d bis 4-7d) zeigten ebenso wenig morphologische Unterschiede der Mikroglia im Vergleich mit den Kontrollmäusen und der rag2-Mutante. Auch bei ihnen traten die drei verschiedenen Mikroglia-Typen entsprechend der Verteilung bei der Kontrollgruppe C57BL/6 sowie der rag2-Mutante in Abhängigkeit von der jeweiligen Hirnregion auf. Zeichen, die auf eine Aktivierung hindeuten könnten, ließen sich auch bei diesen beiden immundefizienten Mäusen nicht erkennen.

4.1.3 Astrozyten

Mittels der Anti-GFAP immunhistochemischen Färbung ist es möglich, das Intermediärfilament GFAP der Astrozyten spezifisch anzufärben, um diesen Zelltyp gezielt darstellen zu können (Abb. 4-8).

Bei den Kontrollmäusen C57BL/6 (Abb. 4-8a) besaßen die Astrozyten einen großen, rundlich bis ovalen, teils auch dreieckigen Zellkörper, von dem aus meist 3 - 6 reich verzweigte, eher kurze Fortsätze abgingen. Während sich im Cortex nur sehr vereinzelt GFAP-markierte Astrozyten fanden, waren sie im Hippocampus und der Fimbria hippocampi häufig zu erkennen.

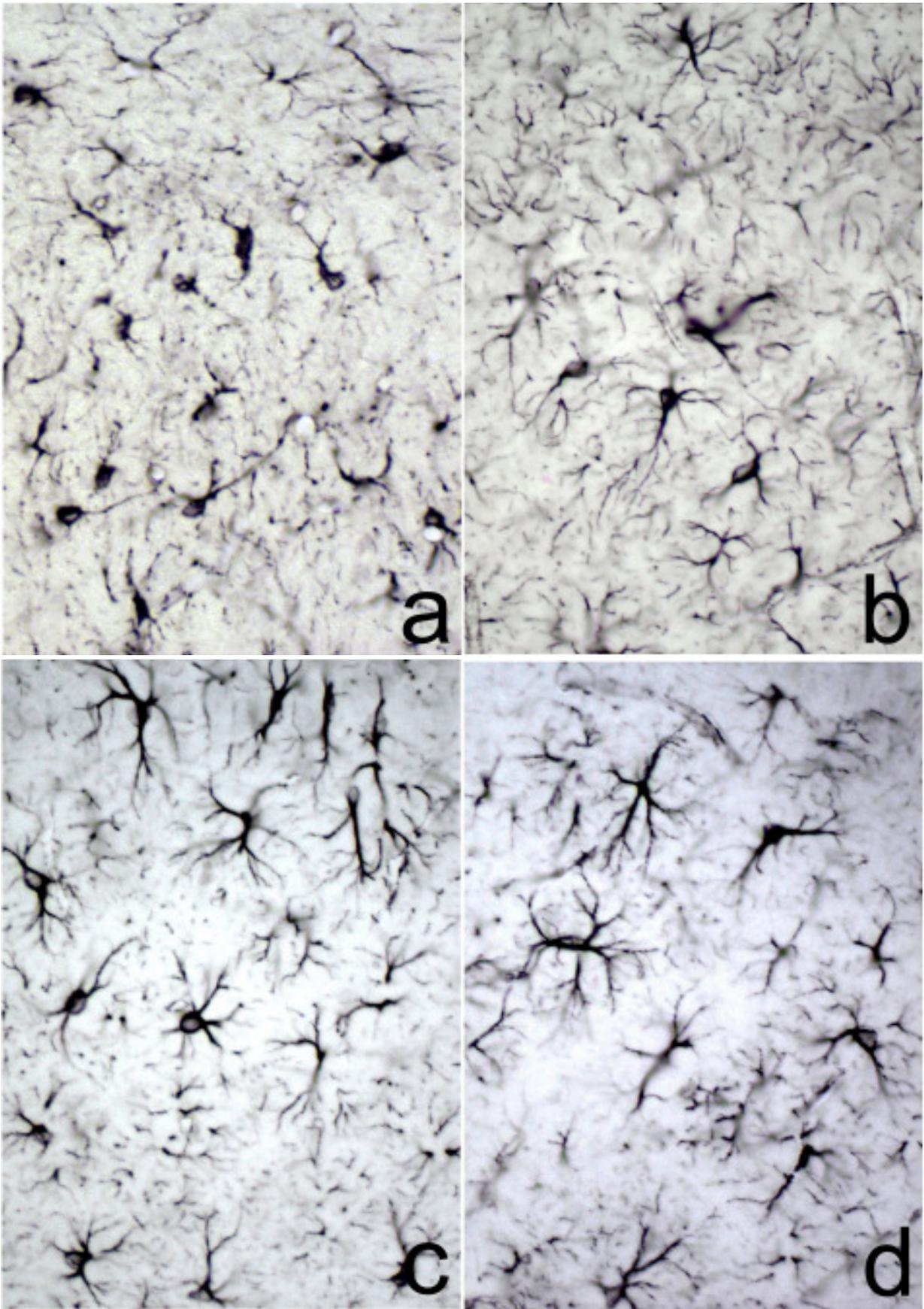


Abb. 4-8: Darstellung der Astrozyten in der GFAP-Immunhistochemie im Hippocampus. Die Astrozyten der Kontrolle C57BL/6 (**a**) besitzen einen großen, rundlich bis ovalen Zellkörper, von dem aus mehrere reich verzweigte, eher kurze Fortsätze abgehen. Diese typische Morphologie findet sich auch bei der rag2-knockout (**b**), der pfp-knockout (**c**) und der pfp/rag2-doppelknockout Maus (**d**). Es gibt keine Anzeichen für Astrogliose, vergrößerte Astrozyten und verstärkte Anfärbungen bei den Mutanten verglichen mit der Kontrolle. 480x.

Die rag2-Mutante (Abb. 4-8b) wies bei den GFAP-Färbungen keinerlei auffällige Unterschiede innerhalb der Morphologie der Astrozyten im Vergleich mit der Kontrollgruppe C57BL/6 auf. Bei diesen immundefizienten Mäusen zeigte sich keine Astroglie, ein reaktiver Zustand der Astrozyten im ZNS: Es kam weder zu einer Größenzunahme der Zellkörper noch zu einer Vermehrung der Zellzahl. Die GFAP-Färbung ließ keine verstärkte Anfärbung der Astrozyten erkennen, wie sie beispielsweise bei neuropathologischen Veränderungen auftritt.

Des Weiteren zeigten weder die pfp-Maus (Abb. 4-8c) noch die pfp/rag2-Doppelmutante (Abb. 4-8d) morphologische Veränderungen der Astroglia. Auch hier ließen sich keine Zeichen einer Astroglie oder sonstige neuropathologische Veränderungen erkennen.

4.1.4 Oligodendrozyten

Um Oligodendrozyten spezifisch anzufärben, wurde die Anti-CNPase immunhistochemische Färbung angewandt (Abb. 4-9). Die Oligodendrozyten der Kontrolle C57BL/6 (Abb. 4-9a) waren insgesamt sehr viel kleiner als Astrozyten. Sie besaßen einen sehr kleinen, runden und stark dunkel gefärbten Zellkörper, von dem aus einzelne, lange, einem Strich ähnelnde immunmarkierte Fortsätze abgingen.

Es ließen sich Oligodendrozyten sowohl in der grauen als auch in der weißen Substanz finden. Im Cortex war eine geringere Dichte der Oligodendrozyten von der inneren zur äußeren Zellschicht hin erkennbar. Insgesamt war die Oligodendrozyten-Dichte im Neocortex geringer als im Hippocampus.

Beim Vergleich der rag2-Mutante (Abb. 4-9b) mit den Kontrolltieren C57BL/6 ließen sich keinerlei Unterschiede in der Morphologie der Oligodendrozyten oder neuropathologische Veränderungen finden. Es zeigte sich keine Dichtezunahme der Oligodendrozyten, und es gab keinerlei Hinweise auf eine Schädigung des Myelins oder andere Zeichen einer Demyelinisierung.

Auch unsere pfp-Mutante (Abb. 4-9c) und die pfp/rag2-Doppelmutante (Abb. 4-9d) zeigten keine morphologischen Abweichungen oder pathologische Veränderungen der Oligodendrozyten.

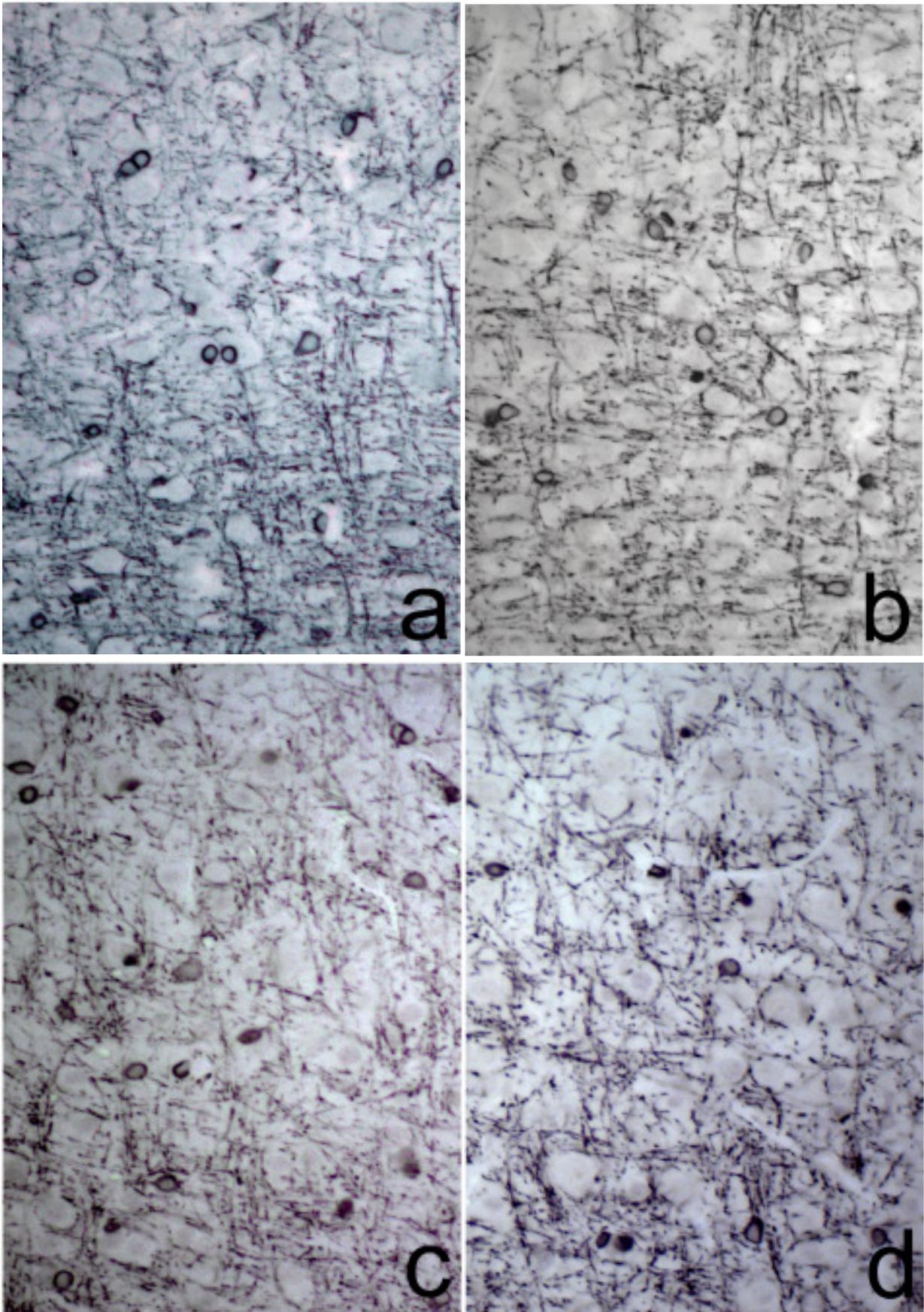


Abb. 4-9: Darstellung der Oligodendrozyten in der CNPase-Immunhistochemie im Hippocampus. Sowohl bei der Kontrolle C57BL/6 (a) als auch bei der rag2-knockout (b), der pfp-knockout (c) und der pfp/rag2-doppelknockout Maus (d) haben die Oligodendrozyten einen sehr kleinen, runden Zellkörper, von dem aus einzelne, lange, immunmarkierte Fortsätze abgehen. Keine neuropathologischen Veränderungen und keine Dichteabnahme der Zellen bei den Mutanten verglichen mit der Kontrolle. Auch keine Hinweise auf Demyelinisation. 480x.

4.1.5 Elektronenmikroskopie

Bei der elektronenmikroskopischen Darstellung zeigte sich NDPase-Aktivität in der Plasmamembran ausschließlich von Mikroglia-Zellen und im Endothel der Kapillaren (Abb. 4-10 und 4-11). Die Mikroglia der C57BL/6-Kontrolltiere (Abb. 4-10a) stellte einen stark schwarz markierten Zelltyp dar, der ganz spezielle Eigenschaften in seiner Zytoarchitektur aufwies: Er besaß einen kleinen, meist ovalen Zellkern mit dunkelgefärbtem, randständig stehendem Heterochromatin. Vereinzelt waren Fortsätze erkennbar (Abb. 4-10a). Weiterhin charakteristisch war ein relativ geringer Anteil an Zytoplasma im Vergleich zur gesamten Zelle. Es ließen sich außerdem dunkel-gefärbte, unterschiedlich große Lysosomen, Vakuolen, Zisternen des rER und ein gut ausgebildeter Golgi-Apparat erkennen. Bei unseren Kontrolltieren C57BL/6 fanden sich hauptsächlich kleine, vereinzelt jedoch auch größere Lysosomen, als Zeichen von Phagozytose bzw. einer Aktivierung (Abb. 4-11a).

Mit Hilfe der elektronenmikroskopischen Darstellung konnte die Mikroglia in zwei verschiedene Typen unterteilt werden. Während der erste Zelltyp unabhängig von Gefäßen auftrat, entsprach der zweite Mikroglia-Typ einer perivaskulären Zelle, die sich also direkt angrenzend an ein Gefäß finden ließ (Abb. 4-11a ►).

Neben der Anfärbung von Mikroglia zeigte die NDPase-Färbung auch stark markierte Kapillargefäße, die luminal und abluminal einen schwärzlich-gefärbten Saum aufwiesen (Abb. 4-10a). Hierbei war das Heterochromatin der Endothelzelle sehr kondensiert.

Zytoplasmatische Markierungen des Reaktionsproduktes ließen sich in allen Zellarten, also ebenfalls bei Neuronen und Makroglia erkennen. Da sie somit nicht spezifisch für Mikroglia sind und damit für unsere Arbeit keine wesentliche Rolle spielten, wurden sie hier außer Acht gelassen. Verschiedene weitere Zellarten, wie beispielsweise Neuronen, Astroglia und Oligodendrozyten wurden von uns nicht analysiert und auf sie soll in diesem Abschnitt nicht näher eingegangen werden.

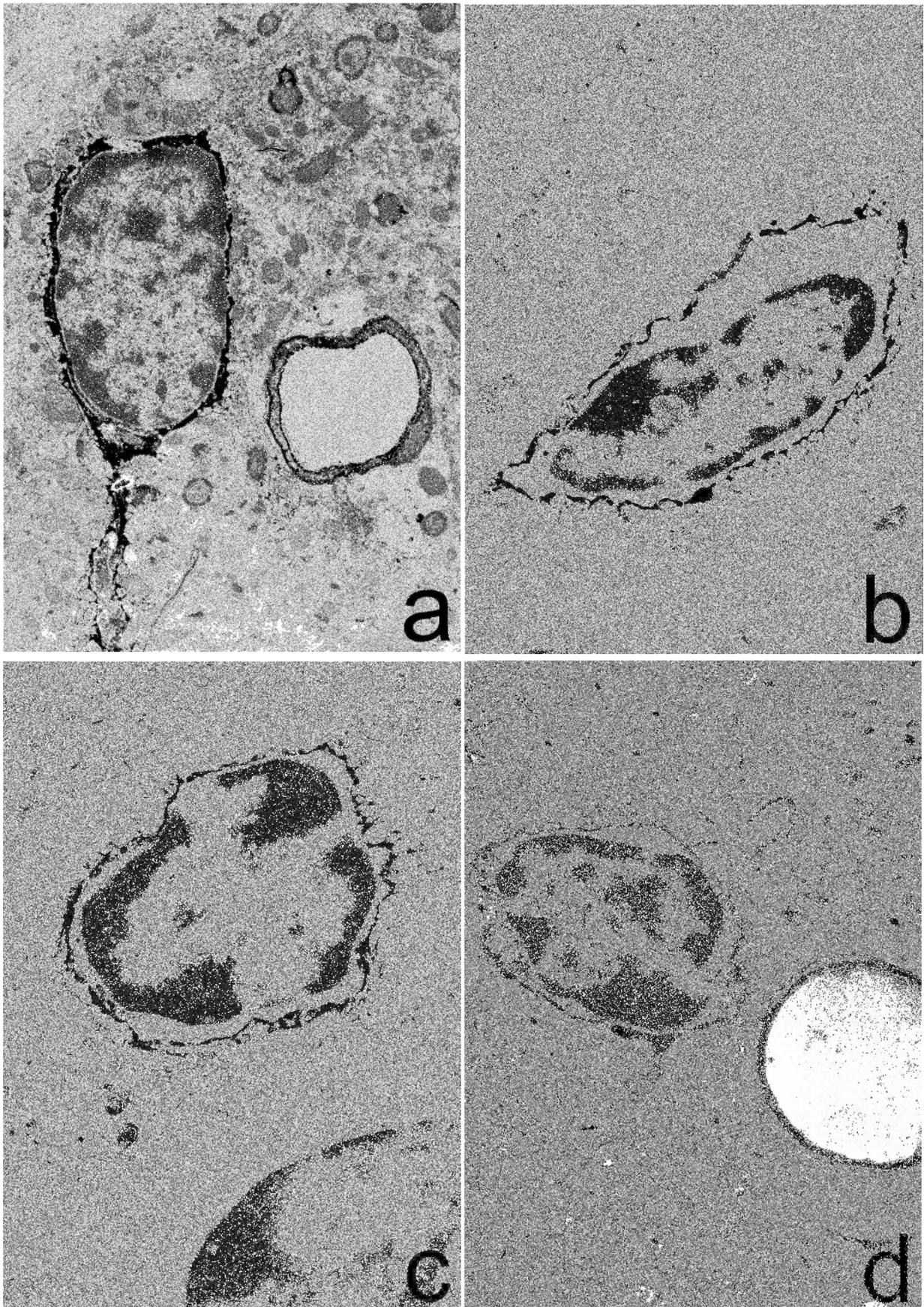


Abb. 4-10: Darstellung der dunkel, NDPase-markierten Mikroglia in der Elektronenmikroskopie (EM). Sowohl bei der Kontrolle C57BL/6 (a) als auch bei der rag2-knockout (b), der pfp-knockout (c) und der pfp/rag2-doppelknockout Maus (d) lassen sich der Zellkern mit dunkelgefärbtem, randständig stehendem Heterochromatin erkennen. Vereinzelt Vakuolen, Zisternen des rER und ein Golgi-Feld. Keine vermehrten Lysosomen als Zeichen einer Zellaktivierung. Ebenfalls dunkel-markiert die KapillargefäÙe mit schwärzlich-gefärbtem Saum (a + d).

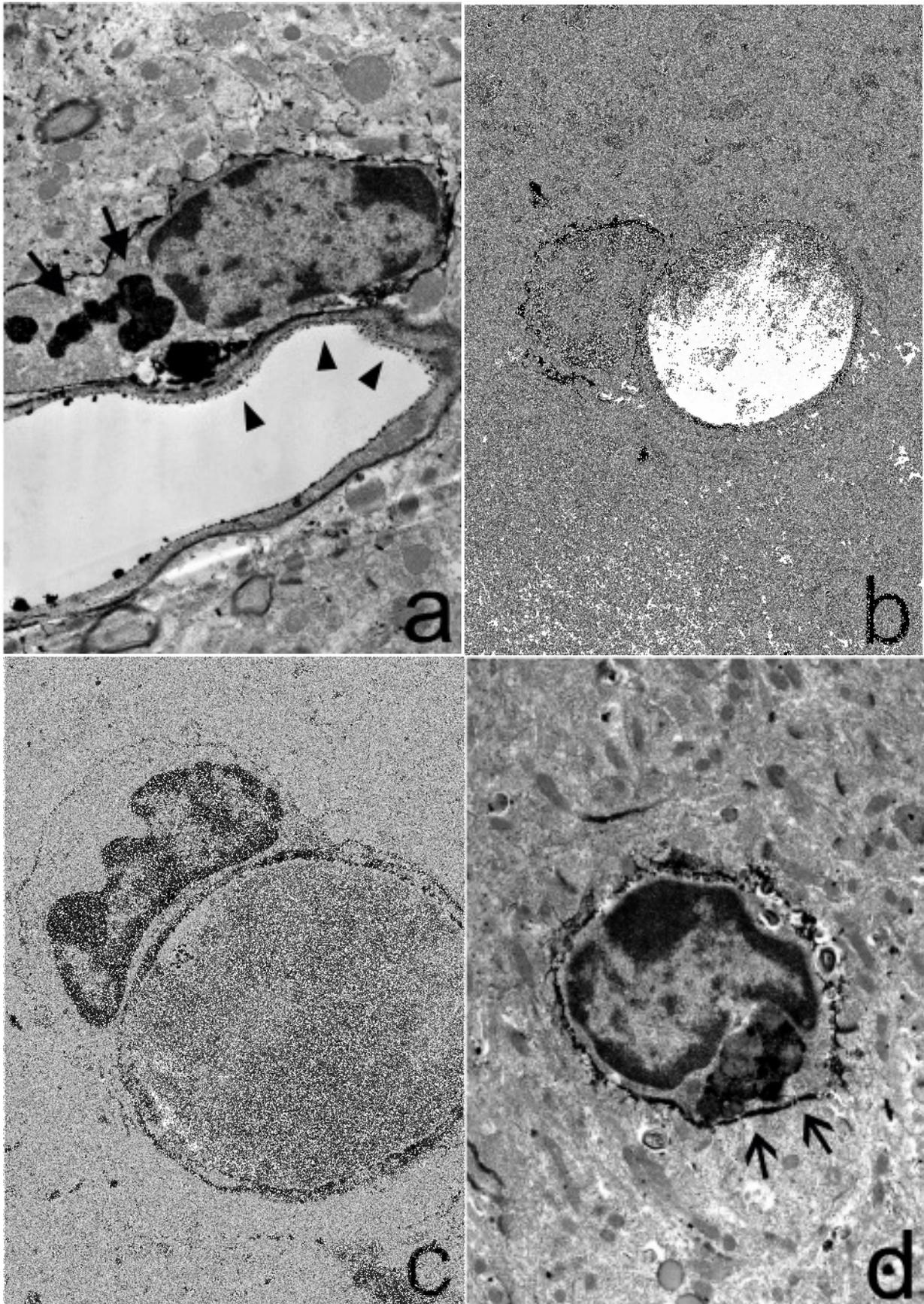


Abb. 4-11: NDPase-markierte Mikroglia im EM. Die Kontrolle C57BL/6 (a) zeigt eine dunkel-markierte, perivaskuläre Zelle angrenzend an ein Kapillargefäß, dass einen ebenfalls NDPase-markierten Saum aufweist (▶). Sichtbare Lysosomen (➔) im Zytoplasma. Perivaskuläre Mikroglia der rag2-knockout (b) und der pfp/rag2- doppelknockout Maus (c) ohne morphologische Auffälligkeiten. Auch hier dunkel-markierter Saum des Kapillarendothels erkennbar. Mikroglia-Zelle mit stark gefärbten Lysosomen (➔) bei der pfp/rag2-doppelknockout Maus (d).

Die rag2-Mutante (Abb. 4-10b) ließ beim Vergleich mit der Kontrollgruppe C57BL/6 keine relevanten Unterschiede innerhalb der Zytoarchitektur erkennen, d. h. die Zellorganellen (Vakuolen, Zisternen des rER und ein Golgi-Apparat) schienen auch bei ihr gleichmäßig stark ausgeprägt zu sein. Auch sie besaß einen kleinen, ovalen Zellkern und randständiges Heterochromatin (Abb. 4-10b). Ebenso wies die rag2-Maus ebenfalls einen im Vergleich zur Zelle relativ geringen Cytoplasma-Anteil auf. Auch Anzeichen einer Zellaktivierung bzw. Phagozytose, wie stark vermehrte Lysosomen fanden sich nicht.

Ebenso wenig wies die pfp-Mutante (Abb. 4-10c) irgendwelche morphologischen oder pathologischen Auffälligkeiten innerhalb ihrer Zellstrukturen auf. Auch bei ihr fanden sich nur vereinzelt Lysosomen, also keine Anzeichen einer Aktivierung.

Des Weiteren ließen sich auch bei der pfp/rag2-Doppelmutante (Abb. 4-10d, 4-11c und d) alle Zellstrukturen finden. Die Zellgröße sowie die Gestalt des Zellkerns bei der Doppelmutante unterschieden sich nicht von der Kontrolle und den rag2- bzw. pfp-Mutanten und auch die pfp/rag2-Doppelmutante zeigte lediglich vereinzelte Lysosomen und somit keine Aktivierung.

4.2 Morphometrie

In sechs zuvor festgelegten Hirnregionen, nämlich im Motocortex, im Striatum, im Hippocampus, in der Fimbria hippocampi, im cerebellären Wurm und im Ncl. nervi facialis wurde durch Zellzählung die Mikroglia-Dichte bestimmt und verglichen (Abb. 4-12 und 4-13).

Bei der Kontrollgruppe C57BL/6 (Abb. 4-12 links oben) zeigten sich deutlich regionale Unterschiede in der Dichte der Mikroglia. Die meisten Zellen fanden sich im Striatum mit einer mittleren Zelldichte von $95,57 \text{ Zellen/mm}^2$ und einem Standardfehler (SEM) von $\pm 2,94$, im Motocortex mit einer Zelldichte von $87,99 \pm 3,44 \text{ Zellen/mm}^2$ und dem Hippocampus mit einer Dichte von $79,15 \pm 2,27 \text{ Zellen/mm}^2$. Die Dichteunterschiede zwischen diesen drei Regionen waren jedoch nicht signifikant. Weiterhin zeigte der Ncl. nervi facialis eine geringere Dichte von $61,54 \pm 1,84 \text{ Zellen/mm}^2$, die Dichte in der Fimbria hippocampi betrug $50,04 \pm 2,8 \text{ Zellen/mm}^2$ und die Dichte des Cerebellums $39,08 \pm 3,02 \text{ Zellen/mm}^2$. Die Zelldichte der drei letzteren Hirnregionen war signifikant kleiner als die Dichte in Striatum, Motocortex und Hippocampus ($p < 0,0001$). Während der Unterschied in der

Mikroglia-Dichte zwischen Ncl. nervi facialis und Fimbria hippocampi nicht signifikant war, zeigte sich ein signifikanter Dichteunterschied der Mikroglia zwischen Cerebellum und Ncl. nervi facialis ($p < 0,0001$).

Bei der rag2-Maus (Abb. 4-12 rechts oben) war die Zelldichte wiederum im Striatum mit $85,87 \pm 2,07$ Zellen/mm², im Motocortex mit $81,42 \pm 2,0$ Zellen/mm² und im Hippocampus mit $70,57 \pm 3,84$ Zellen/mm² am größten. Die Unterschiede zwischen diesen drei Regionen waren nicht signifikant. Im Ncl. nervi facialis betrug die Dichte $53,19 \pm 2,45$ Zellen/mm², in der Fimbria $38,46 \pm 2,51$ Zellen/mm² und im Cerebellum $29,88 \pm 0,96$ Zellen/mm². Motocortex, Striatum und Hippocampus zeigten wie bei den C57BL/6-Kontrolltieren signifikant höhere Dichtewerte als Fimbria, Cerebellum und Ncl. nervi facialis ($p < 0,0001$), und auch der Unterschied zwischen Cerebellum und Ncl. nervi facialis stellte sich als signifikant heraus ($p < 0,0001$) (Abb. 4-12). Die Mikroglia-Dichte der rag2-Mutante war zwar in allen sechs Regionen geringer als bei der Kontrollgruppe C57BL/6 (Abb. 4-13), dieser Dichteunterschied war jedoch nicht signifikant.

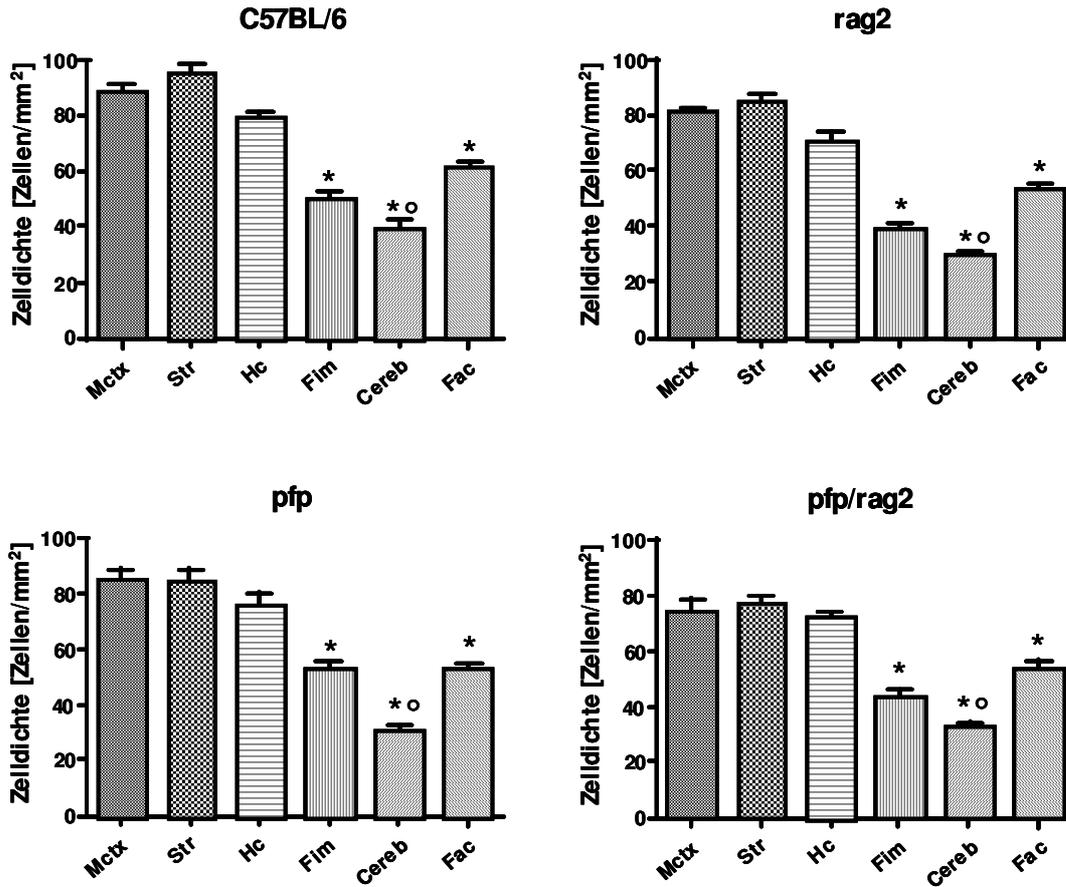


Abb. 4-12: Mikroglia-Dichte [Zellen/mm²] der vier Genotypen (C57BL/6, rag2-knockout, pfp-knockout und pfp/rag2-doppelknockout). Darstellung von Mittelwerten und Standardfehlern (SEM) in Motocortex (Mctx), Striatum (Str), Hippocampus (Hc), Fimbria (Fim), Cerebellum (Cereb) und Ncl. nervi facialis (Fac). * Signifikante Unterschiede zwischen Mctx, Str und Hc im Vergleich zu Fim, Cereb und Fac bei 7 Tieren je Genotyp ($p < 0,0001$). ° Das Cerebellum besitzt signifikant weniger Mikroglia als der Ncl. nervi facialis ($p < 0,0001$).

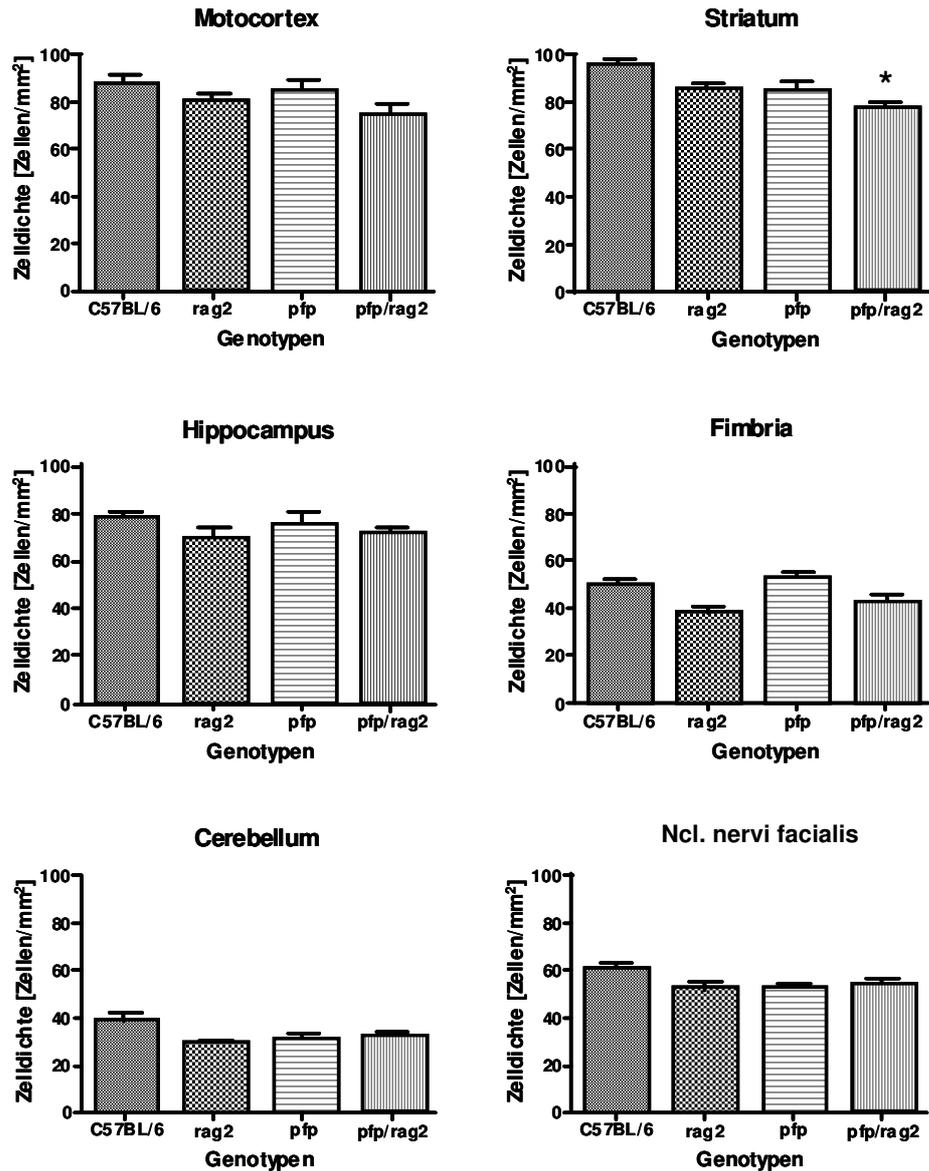


Abb. 4-13: Darstellung der Mikroglia-Dichte [Zellen/mm²]. Vergleich der Mittelwerte und Standardfehler (SEM) in 6 Hirnregionen von je 7 Tieren. Bei fünf Regionen finden sich zwischen Mutanten (rag2-knockout, pfp-knockout und pfp/rag2-doppelknockout) und Kontrolle (C57BL/6) keine signifikanten Unterschiede.

* Einzig das Striatum weist eine signifikant geringere Zelldichte bei der pfp/rag2-doppelknockout Maus im Vergleich zur Kontrolle auf ($p < 0,001$).

Die pfp-Mutante (Abb. 4-12 links unten) zeigte die höchste Mikroglia-Dichte im Motocortex mit $85,23 \pm 4,31$ Zellen/mm², im Striatum mit $84,75 \pm 4,38$ Zellen/mm² und dem Hippocampus mit $75,93 \pm 4,94$ Zellen/mm². Zwischen diesen drei Regionen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Die Zelldichte im Ncl. nervi facialis mit $53,35 \pm 1,76$ Zellen/mm², in der Fimbria mit $53,15 \pm 2,54$ Zellen/mm² und im Cerebellum mit $31,35 \pm 1,61$ Zellen/mm² war auch bei der pfp-Mutante signifikant geringer als in den drei zuerst erwähnten Hirnregionen ($p < 0,0001$). Ebenso ergab die Zelldichte im Cerebellum einen signifikant kleineren Wert als im Ncl. nervi facialis ($p < 0,0001$). Im Vergleich zwischen den Genotypen war die Dichte bei der pfp-Mutante in fünf Regionen, nämlich im Motocortex, im Striatum, im Hippocampus, im Cerebellum und im Ncl. nervi facialis unwesentlich, also nicht signifikant geringer als bei der Kontrolle C57BL/6 (Abb. 4-13). Allein in der Fimbria hippocampi zeigte sich bei der pfp-Maus eine mäßig höhere Dichte der Mikroglia im Vergleich zur Kontrolle sowie zur rag2- und auch zur pfp/rag2-Maus.

Die Doppelmutante pfp/rag2 (Abb. 4-12 rechts unten) zeigte die gleichen signifikanten Unterschiede hinsichtlich ihrer Mikroglia-Dichte in den untersuchten Regionen wie die Kontrollgruppe C57BL/6 sowie die rag2-Maus und die pfp-Mutante: Im Striatum lag die Zelldichte bei $78,03 \pm 1,9$ Zellen/mm², im Motocortex bei $75,12 \pm 4,21$ Zellen/mm², im Hippocampus bei $72,65 \pm 2,06$ Zellen/mm², im Ncl. nervi facialis bei $54,19 \pm 2,09$ Zellen/mm², in der Fimbria hippocampi bei $43,48 \pm 2,97$ Zellen/mm² und schließlich im Cerebellum bei $32,48 \pm 1,9$ Zellen/mm². Es ließ sich also auch bei der Doppelmutante eine signifikant erhöhte Mikroglia-Dichte in Motocortex, Striatum und Hippocampus im Vergleich zu Fimbria, Cerebellum und Ncl. nervi facialis finden ($p < 0,0001$). Auch der Dichteunterschied zwischen Cerebellum und Ncl. nervi facialis war hier wiederum signifikant ($p < 0,0001$). Zwischen den drei erstgenannten Hirnregionen, Motocortex, Striatum und Hippocampus, konnten auch bei der Doppelmutante keine signifikanten Unterschiede gefunden werden. Ebenso wie bei den beiden anderen Mutanten war auch bei der Doppelmutante der Dichteunterschied zur Kontrolle in fünf Hirnregionen nicht signifikant (Abb. 4-13). Einzig das Striatum ließ einen signifikanten Dichteunterschied zwischen der Doppelmutante pfp/rag2 und der Kontrolle C57BL/6 erkennen, wobei der p-Wert 0,0006 betrug und eindeutig kleiner war als das errechnete α von $0,0083/6$ ($=0,00138$).

Da die Zellgröße einen wichtigen Faktor darstellt, der eine Mikroglia-Aktivierung erkennen lässt, wurden die Durchmesser der mikroglialen Perikaryen gemessen (Abb. 4-14). Insgesamt waren die regionalen Unterschiede hinsichtlich des Zelldurchmessers der Mikroglia sehr gering. Tendenziell zeigte das Striatum den kleinsten Durchmesser bei allen vier Mäusen.

Die Kontrollgruppe C57BL/6 wies folgende mittlere Zelldurchmesser auf: In der Fimbria betrug er $7,32 \pm 0,1 \mu\text{m}$, im Motocortex $7,11 \pm 0,09 \mu\text{m}$, im Hippocampus $7,1 \pm 0,13 \mu\text{m}$, im Ncl. nervi facialis $7,08 \pm 0,07 \mu\text{m}$, im Cerebellum $7,06 \pm 0,11 \mu\text{m}$ und im Striatum $6,65 \pm 0,07 \mu\text{m}$. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den sechs verschiedenen Regionen.

Bei der rag2-Maus ergaben sich mittlere Durchmesser von $7,3 \pm 0,12 \mu\text{m}$ in der Fimbria, $7,11 \pm 0,14 \mu\text{m}$ im Hippocampus, $7,12 \pm 0,11 \mu\text{m}$ im Ncl. nervi facialis, $7,06 \pm 0,1 \mu\text{m}$ im Cerebellum, $7,0 \pm 0,11 \mu\text{m}$ im Motocortex und $6,87 \pm 0,12 \mu\text{m}$ im Striatum. Auch hier war der regionale Unterschied nicht signifikant. Genauso wenig fand sich ein signifikanter Unterschied der Zelldurchmesser bei unserer rag2-Mutante im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Bei der pfp-Maus betrug der mittlere Durchmesser der Mikroglia in der Fimbria $7,2 \pm 0,13 \mu\text{m}$, im Hippocampus $7,139 \pm 0,11 \mu\text{m}$, im Motocortex $7,137 \pm 0,1 \mu\text{m}$, im Cerebellum $6,95 \pm 0,09 \mu\text{m}$, im Ncl. nervi facialis $6,92 \pm 0,08 \mu\text{m}$ und im Striatum $6,7 \pm 0,07 \mu\text{m}$. Wiederum bestand weder ein signifikanter regionaler Unterschied noch einer im Vergleich mit den Kontrollmäusen.

Die mittleren Zelldurchmesser der pfp/rag2-Maus betrugen im Motocortex $7,32 \pm 0,08 \mu\text{m}$, im Hippocampus $7,13 \pm 0,08 \mu\text{m}$, in der Fimbria hippocampi $7,12 \pm 0,1 \mu\text{m}$, im Cerebellum $7,06 \pm 0,08 \mu\text{m}$, im Ncl. nervi facialis $6,89 \pm 0,1 \mu\text{m}$ und im Striatum $6,78 \pm 0,1 \mu\text{m}$. Auch bei der Doppelmutante fanden sich keine signifikanten regionalen Unterschiede des Zelldurchmessers, und der mittlere Zelldurchmesser der pfp/rag2-Maus unterschied sich wiederum nicht signifikant von den Kontrolltieren.

Zusammenfassend ließ sich zeigen, dass der Durchmesser bei jedem der vier Genotypen in Abhängigkeit von der jeweiligen Hirnregion im Mittel zwischen $6,6 \mu\text{m}$ und $7,32 \mu\text{m}$ lag und kein signifikanter Unterschied beim Vergleich der Zelldurchmesser von den Mutanten mit der Kontrollgruppe bestand (Abb. 4-14). Es wurden somit keine Anzeichen einer Mikroglia-Aktivierung bei den pfp-, den rag2- oder den pfp/rag2-Mäusen in Form einer Zunahme des Perikaryendurchmessers beobachtet.

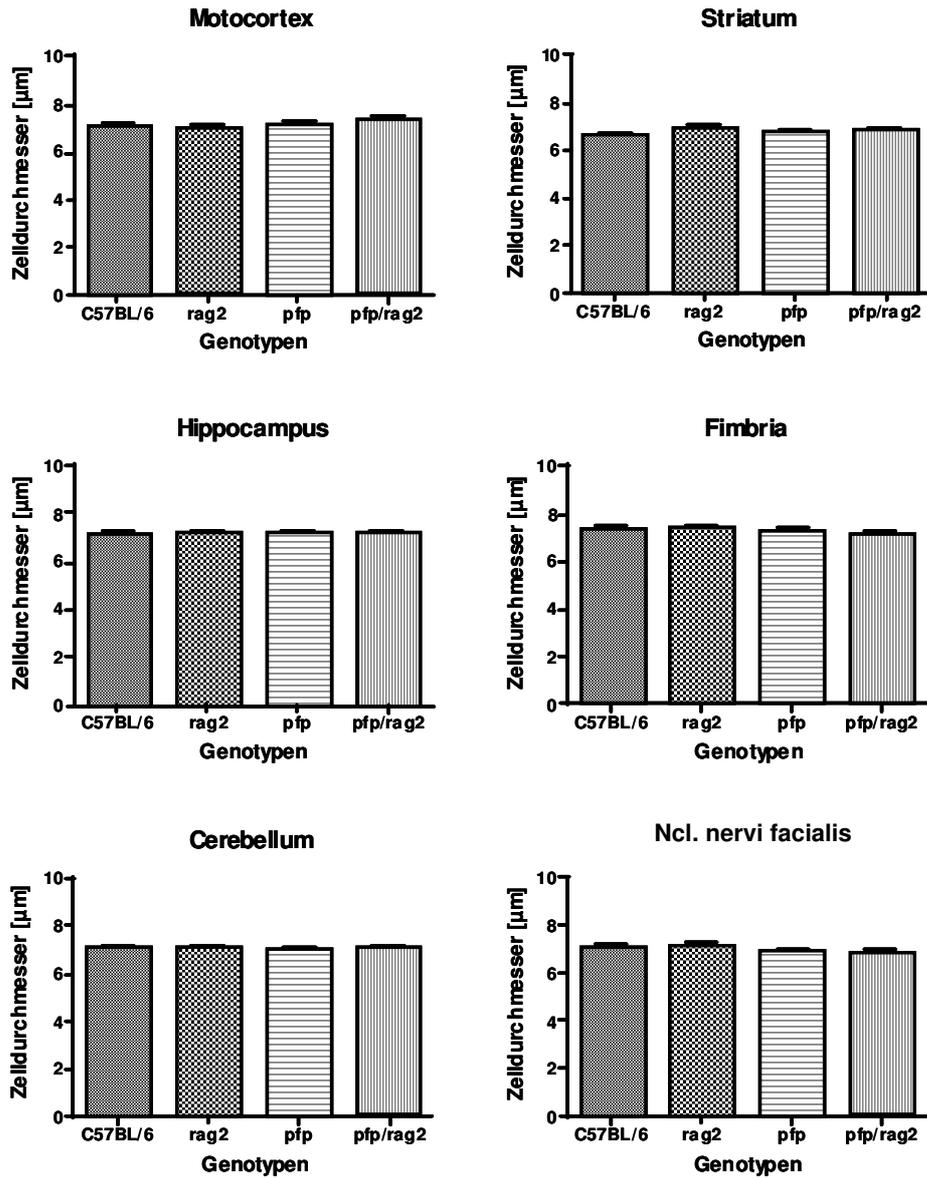


Abb. 4-14: Zelldurchmesser der Mikroglia-Somata in µm. Darstellung von Mittelwerten und Standardfehlern (SEM) in 6 Hirnregionen von je 7 Tieren pro immundefizienter Mäusepopulation (rag2-knockout, pfp-knockout und pfp/rag2-doppelknockout) und Kontrolle (C57BL/6). Die minimalen Unterschiede zwischen den Genotypen innerhalb einer Hirnregion sind nicht signifikant.

Weiterhin ergab die morphometrische Analyse, dass weniger als 1 Zelle/mm² dem kompakten Mikroglia-Typ entsprach. Es wurden keine Unterschiede hinsichtlich dieses Mikroglia-Typs zwischen pfp-, rag2- und pfp/rag2-Mäusen sowie den Kontrolltieren beobachtet. Aufgrund der sehr geringen Zellzahl von weniger als 0,5% war eine statistische Analyse nicht möglich.

Neben der Dichtebestimmung und des Durchmessers der Mikroglia wurde zusätzlich bei allen vier Genotypen die Dicke des Cortex bis zur Angrenzung ans Marklager und der Querdurchmesser des Cerebellums in coronarer Ebene bestimmt.

Beim Vergleich der Cortex-Dicke wies die Kontrolle die größte Dicke mit $2,97 \pm 0,06$ mm auf. In der Reihenfolge folgten dann die pfp/rag2-Maus mit $2,91 \pm 0,06$ mm, die pfp-Maus mit $2,79 \pm 0,05$ mm und zuletzt die rag2-Mutante mit $2,64 \pm 0,04$ mm. Diese Unterschiede zwischen den Genotypen erwiesen sich jedoch als nicht signifikant (Abb. 4-15a).

Beim Betrachten des Querdurchmessers des Cerebellums ließ die Kontrollgruppe C57BL/6 eine Breite von $0,819 \pm 0,01$ cm, die pfp-Maus von $0,85 \pm 0,01$ cm, die rag2-Maus von $0,83 \pm 0,01$ cm und die Doppelmutante pfp/rag2 von $0,83 \pm 0,01$ cm erkennen. Der Querdurchmesser zeigte beim Vergleich der vier Genotypen keine signifikanten Unterschiede, die Werte lagen alle im Bereich von 0,81 cm und 0,85 cm (Abb. 4-15b).

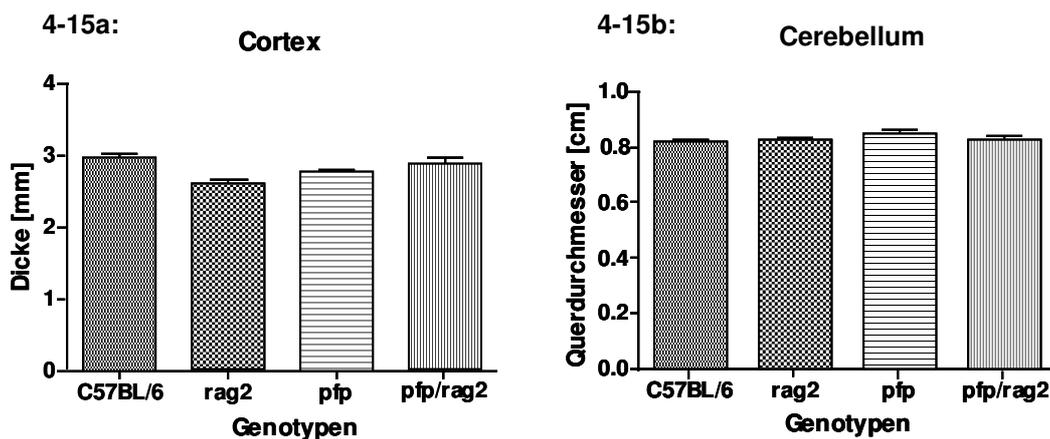


Abb. 4-15: Größenvergleich der Gehirne von je 7 Tieren pro Kontrolle C57BL/6 und immundefizienter Maus (rag2-knockout, pfp-knockout und pfp/rag2-doppelknockout). Darstellung von Mittelwerten und Standardfehlern (SEM). **4-15a:** Cortex-Dicke [mm] von der pialen Oberfläche des Cerebrums. Keine signifikanten Dicke-Unterschiede beim Vergleich der Mutanten mit der Kontrolle. **4-15b:** Querdurchmesser des Cerebellums [cm]. Keine Signifikanzen zwischen den Genotypen.

5 Diskussion

In der vorliegenden experimentellen Arbeit wurden Gehirne von rag2-knockout, pfp-knockout und pfp/rag2-doppelknockout Mäusen analysiert und mit der Kontrollgruppe C57BL/6 verglichen. Dabei wurde besonders auf morphologische Strukturanomalien, Veränderungen der Mikroglia-Dichte sowie der Mikroglia-Größe und Veränderungen in der übrigen Glia geachtet.

Die Morphologie des motorischen Cortex der Kontrollgruppe C57BL/6 zeigt in der Kresyl-Violett-Übersichtsfärbung den in der Literatur beschriebenen typischen geschichteten Aufbau (Caviness, 1975) mit sechs Laminae, wobei jedoch die Lamina granularis externa II und die Lamina pyramidalis externa III schlecht voneinander zu trennen waren.

Die Morphologie des motorischen Cortex der rag2-knockout Maus zeigt in der Übersichtsfärbung den gleichen geschichteten Aufbau und weist damit keine Unterschiede oder Strukturanomalien im Vergleich mit der Kontrolle auf. Sowohl die pfp-knockout Maus als auch die pfp/rag2-doppelknockout Maus lassen die gleiche Gliederung im Motocortex erkennen und zeigen genauso wenig Strukturanomalien wie die rag2-Mutante.

Um Mikroglia spezifisch darstellen zu können, wurde die NDPase-enzymhistochemische Färbung angewandt. Die Lokalisation der Nukleosid-Diphosphatase (NDPase)-Aktivität als zytochemischer Marker im ZNS unterscheidet sich je nach Zelltyp (Vorbrodts *et al.*, 1982). So findet sich bei ektodermalen Zellen wie Neuronen und Makroglia eine Reaktion intrazellulär im ER und/oder im Golgi-Apparat. Im Gegensatz dazu zeigt sich eine enzymatische Reaktion im Plasmalemma bei Endothelzellen, perivaskulären Zellen und Mikroglia. Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen bestätigen diesen Befund. Es konnte eine plasmalemmale Reaktion nur an Endothelzellen und Zellen mit einer Ultrastruktur, die für Mikroglia-Zellen charakteristisch ist, beobachtet werden. Da sich Mikroglia im Lichtmikroskop morphologisch eindeutig von Endothelzellen unterscheiden lässt - sie besitzt ein kleines, oval-rundes Perikaryon, von dem aus mehrere, teilweise stark verzweigte Fortsätze entspringen - stellt die plasmalemmale NDPase-Reaktion eine hochspezifische Färbemethode für diesen Zelltyp dar.

Die eigenen Untersuchungen haben gezeigt, dass die Mikroglia der Kontrollgruppe C57BL/6 starke regionale Unterschiede hinsichtlich ihrer Morphologie aufweist und sich drei verschiedene morphologische Erscheinungsformen von Mikroglia beobachten lassen. Auch Ip (2002) und Lawson *et al.* (1990) haben diese Unterschiede und die Morphologie beschrieben. Die erste Form der ruhenden Mikroglia mit oval-runden Perikaryen und sternförmig feinen radiär entspringenden Fortsätzen, die sich in der Peripherie verzweigen, findet sich deutlich erkennbar im Motocortex, im Hippocampus (CA1), im Striatum, in der Körnerschicht des Cerebellums und im Ncl. nervi facialis, also in der grauen Hirnsubstanz. Diese Form wird auch von Ip (2002) im cerebralen Cortex, im Hippocampus (CA1/CA3), im Ncl. nervi facialis sowie in der Körnerschicht des cerebellären Wurms beobachtet. Auch Lawson *et al.* (1990) beschreiben diese radiär verzweigte Form der Mikroglia (*radially branched cells*), die im Gehirn der Maus am weitesten verbreitet ist. Diese Ausprägungsform ist bei Lawsons *et al.* Untersuchungen ebenfalls in der grauen Hirnsubstanz, wie dem cerebralen Cortex, dem Hippocampus und der Körnerschicht des Cerebellums beobachtet worden.

Die zweite Form der ruhenden Mikroglia wurde in der Fimbria hippocampi, einem Teil der weißen Hirnsubstanz, gefunden. Dieser longitudinale Typ zeigt ein verlängertes, gröber wirkendes Perikaryon mit feinen Fortsätzen und mehreren kurzen Nebenästen. Unsere morphologische und ortsspezifische Beschreibung dieses zweiten Typs deckt sich mit den Beobachtungen von Ip (2002). Auch Lawson *et al.* (1990) beschreiben als zweite Form der ruhenden Mikroglia eine longitudinale Form, die in den Fasertrakten der weißen Hirnsubstanz vorkommt (*longitudinally branched cells*).

Die dritte sehr kompakte Variante der Mikroglia mit einem oval-runden bis länglichen Zellkörper, sehr wenigen und kurzen, jedoch dickeren Fortsätzen als bei den beiden anderen Mikroglia-Typen, ist in allen sechs Hirnregionen nur extrem selten beobachtet worden. Auch Ip (2002) hat den dritten kompakten Mikroglia-Typ nur sporadisch beobachtet und ihn als aktivierte Mikroglia interpretiert. Ebenso beobachten Lawson und seine Mitarbeiter (1990) die kompakte Mikroglia mit kleinen, stark-dunkel gefärbten Perikaryen (*compact cells*), die der hier extrem selten beobachteten kompakten Mikroglia-Form ähnelt. Im Gegensatz zu den Beobachtungen in dieser Arbeit und zu Ips Untersuchungen (2002) beschreiben Lawson und seine Mitarbeiter (1990) aber ein Auftreten dieser kompakten Mikroglia

ausschließlich in circumventrikulären Organen, welche von uns jedoch nicht erfasst wurden. Laut Lawson ähnelt diese Variante den Kupffer-Zellen in der Leber und findet sich ausschließlich in jenen Hirnregionen, in denen die Blut-Hirn-Schranke nicht ausgebildet ist.

Eigene Untersuchungen zeigten regionale Unterschiede hinsichtlich der Dichte der Mikroglia bei den C57BL/6-Kontrollmäusen. Die größte Mikroglia-Dichte wurde im Striatum, dem motorischen Cortex und dem Hippocampus ermittelt. Im Cerebellum, in der Fimbria hippocampi und im Ncl. nervi facialis haben wir signifikant weniger Mikroglia gezählt als in den ersten drei genannten Hirnregionen. Die Körnerschicht des Cerebellums besitzt bei allen Kontrolltieren die geringste Zellzahl und weist im Vergleich mit dem Ncl. nervi facialis signifikant weniger Mikroglia auf.

Im Vergleich zu den eigenen morphometrischen Auswertungen hat Ip (2002) vergleichbare regionale Unterschiede im Bezug auf die Zelldichte beschrieben. Auch er erkennt die Tendenz, dass sich eine große Dichte der Mikroglia im cerebralen Cortex und in den untersuchten Bereichen der Hippocampus-Formation einer weitaus geringeren Dichte in der Körnerschicht des Kleinhirns gegenüberstellen lässt. Diese und Ips (2002) regionalen Unterschiede decken sich weitgehend mit den Untersuchungen von Lawson *et al.* (1990). Auch sie haben im cerebralen Cortex und im Hippocampus die größte mikrogliale Zelldichte und in der Körnerschicht des Kleinhirns die geringste Zelldichte beobachtet. Lawson *et al.* erörtern in seiner Arbeit (1990) die Frage, ob ein Zusammenhang zwischen der beschriebenen regionalen Verteilung der Mikroglia und dem Ausmaß von Zelltod, bzw. des Aktivitätszustandes der Mikroglia besteht. Er kommt zu dem Schluss, dass hierbei keine einfache Beziehung erkennbar ist, die das unterschiedliche Dichteverhältnis erklären könnte. Ebenso können Lawson *et al.* (1990) eine weitere Hypothese, die einen Zusammenhang zwischen Mikroglia-Dichte und Verteilung bestimmter Neurotransmitter in bestimmten Hirnregionen in Erwägung zieht, nicht bestätigen.

Als weitere morphometrische Untersuchungsgröße wurden die Zelldurchmesser der Mikroglia ausgewertet um zeigen zu können, dass die Unterschiede zwischen den sechs Hirnregionen statistisch nicht signifikant sind. Tendenziell besitzt das Striatum den kleinsten Durchmesser.

Die ermittelten Zelldurchmesser decken sich mit denen von Ip (2002) gemessenen. Ebenso wie wir kommt Ip (2002) auf einen Zelldurchmesser im Mittel zwischen 6,5 μm und 8,6 μm bei seinen BALB/c-Kontrollmäusen. Im Vergleich mit Lawson *et al.* (1990) weisen unsere Mikroglia jedoch geringere Durchmesser auf. Lawson *et al.* (1990) hat in seinen Untersuchungen die Zellfortsätze mit umfahren und mit eingerechnet, weshalb er insgesamt größere Werte ermittelt hat.

Als erste immundefiziente Maus wurde die rag2-knockout Maus gewählt, um eventuelle Unterschiede zwischen ihr und unserer Kontrolle C57BL/6 einerseits sowie zwischen ihr und der von Ip (2002) gewählten scid-Maus zu diskutieren.

Auch bei der rag2-knockout Maus lassen sich regionale Unterschiede hinsichtlich der Erscheinungsform der Mikroglia erkennen. Es fanden sich alle drei beschriebenen Ausprägungsformen in den oben erwähnten Hirnregionen.

Des Weiteren zeigen unsere Untersuchungen, dass sich die Mikroglia in einem nicht aktivierten Zustand befindet. Es lassen sich weder morphologische Veränderungen der Zellen noch morphometrische Veränderungen ihrer Zellgröße erkennen. Im Vergleich mit der ruhenden Mikroglia ließe sich bei einer aktivierten Form ein vergrößerter Zelleib mit stärkeren proximalen Ausläufern und einer abnehmenden distalen Ramifizierung (Raivich *et al.*, 1999) erkennen, was jedoch bei unseren Untersuchungen nicht der Fall ist. Unsere morphometrischen Analysen des Zelldurchmessers zeigen keine großen Unterschiede beim Vergleich der rag2-Mutante mit der Kontrollgruppe. Wieder besitzt tendenziell das Striatum die kleinsten Zelldurchmesser, die regionalen Unterschiede sind auch bei der rag2-Maus nicht signifikant.

Die Untersuchungen zur Zelldichte zeigen, dass die mengenmäßige Verteilung der Mikroglia bei der rag2-Maus tendenziell der Verteilung bei der Kontrolle C57BL/6 entspricht. Wiederum weisen Motocortex, Striatum und Hippocampus signifikant höhere Dichtewerte als Fimbria, Cerebellum und Ncl. nervi facialis auf. Das Cerebellum besitzt auch hier signifikant niedrigere Werte als der Ncl. nervi facialis. Der Dichteunterschied der Mikroglia beim Vergleich der Mutanten mit der Kontrolle zeigt sich nach statistischer Analyse als nicht signifikant. Es lässt sich lediglich erkennen, dass die Dichte-Werte der Mutanten leicht unter den Werten der Kontrollmäuse liegen.

Die Untersuchungen von Ip (2002) haben hingegen ergeben, dass die Mikroglia-Dichte bei scid-Mäusen im Vergleich zu den Kontrolltieren BALB/c eine signifikante Erhöhung der Zellzahl in allen von ihm untersuchten Hirnregionen aufweist. Einzige Ausnahme bildet der somatosensorische Cortex, in dem die Dichte zwar erhöht, nicht aber signifikant unterschiedlich ist (Ip, 2002). Somit steht eine Erhöhung der Mikroglia-Dichte bei den Knockout-Mäusen von Ip (2002) einer nicht signifikanten Veränderung der Dichte bei unseren rag2-Mäusen gegenüber. Ebenso wie die scid-Maus besitzt auch die rag2-Maus einen Defekt in der B- und T-Zellreifung, sie weist jedoch keine erhöhte Mikroglia-Dichte auf.

Die von Ip (2002) aufgestellte Hypothese, dass nämlich die Ursache der erhöhten Mikroglia-Dichte möglicherweise auf einen Defekt in der B- und T-Zellreifung zurückzuführen sei, erscheint unwahrscheinlich. Denn rag1- und rag2-knockout Mäuse sind absolut unfähig, die V(D)J-Rekombination einzuleiten und besitzen somit einen sehr frühen Block in den Differenzierungsphasen von sowohl T- als auch B-Lymphozyten (Notarangelo *et al.*, 1999; Shinkai *et al.*, 1992). Die Tiere besitzen keine reifen B- und T-Lymphozyten. Sie zeigen jedoch eine normale oder auch erhöhte Anzahl an sehr unreifen B- und T-Zellen. Diese Erhöhung repräsentiert das Stadium, in dem die V(D)J-Rekombination geblockt ist (Shinkai *et al.*, 1992).

Eine weitere jedoch auch schon von Ip (2002) als eher unwahrscheinlich erscheinende Hypothese kann an dieser Stelle ebenfalls verworfen werden: Eine Infektion der Gehirne von scid-Mäusen oder auch von rag2-knockout Mäusen als Ursache für eine Veränderung der Mikroglia-Dichte lässt sich ausschließen, da beide immunsupprimierte Tier-Modelle steril gehalten worden sind. Des Weiteren geben die detaillierten morphologischen Untersuchungen in beiden Arbeiten keine Anzeichen für Entzündung, Infektion, Neuronenuntergang, Astrogliose oder aktivierte Makrophagen.

Im Unterschied zur rag2-Mutation sprechen einige Untersuchungen an der scid-Maus dafür, dass neben den B- und T-Lymphozyten auch die NK-Zellen betroffen sein könnten. Greiner und seine Mitarbeiter (1997) beschreiben eine höhere NK-Zellaktivität bei C,B-17 scid-Mäusen gegenüber C,B-17 Wild-Typ-Tieren und vermuten als Ursache eine Art Kompensation des Fehlens des adaptiven Immunsystems. Die gleichen Differenzen in der NK-Zellaktivität werden bei C57BL/6 scid-Mäusen und dem äquivalenten Wildtyp beschrieben (Christianson *et al.*, 1996).

Diese erhöhte Aktivität der NK-Zellen wird bei scid-Mäusen jedoch insgesamt als eher gering beschrieben (Greiner *et al.*, 1997).

Trotz eines möglicherweise nur geringen Einflusses lässt sich an dieser Stelle eine weitere Hypothese für die erhöhte Mikroglia-Dichte bei den scid-Mäusen von Ip (2002) aufstellen: Die beschriebene NK-Zell-Aktivität der scid-Maus könnte durchaus einen Einfluss auf die Dichteerhöhung der Mikroglia bei der scid-Maus haben und eventuell sogar den Grund für die Erhöhung darstellen. Mittlerweile ist bekannt, dass das angeborene Abwehrsystem, welches u.a. NK-Zellen umfasst, eine gewisse Rolle im ZNS spielt (Friese *et al.*, 2004). Während des inflammatorischen Prozesses einer experimentell induzierten Autoimmun-Encephalomyelitis sind NK-Zellen unter den zuerst rekrutierten Zellen. Ebenso spielen NK-Zellen beim Krankheitsbild der Multiplen Sklerose (MS) eine entscheidende Rolle (Takahashi *et al.*, 2004). MS-Patienten in der Remissionsphase lassen sich in zwei Gruppen einteilen. Sie besitzen entweder einen „CD95⁺ NK-high“- oder einen „CD95⁺ NK-low“-Phänotyp, wobei Patienten des NK-high-Phänotyps mehr aktive Schübe der MS aufweisen als Patienten mit weniger NK-Zellen (Takahashi *et al.*, 2004).

Falls die von Ip (2002) beobachtete Mikroglia-Erhöhung bei der immundefizienten scid-Maus auf NK-Zell-Aktivität zurückzuführen wäre, müssten sich entsprechend auch bei anderen immundefizienten Mäusen, bei denen die NK-Zellen betroffen sind, Veränderungen zeigen.

Die eigenen Untersuchungen der pfp-knockout Maus, der das Perforin-Gen fehlt und somit der zytotoxische Effekt der NK-Zellen beeinträchtigt ist, haben jedoch keine Signifikanzen bei Betrachtung der Mikroglia-Dichte im Vergleich zur Kontrollgruppe C57BL/6 gezeigt. Die Zelldichte der pfp-Maus entspricht tendenziell der Zelldichte der Kontrolle C57BL/6. Auch hier bestehen die gleichen signifikanten Unterschiede zwischen Motocortex, Striatum und Hippocampus im Vergleich zu Fimbria, Cerebellum und Ncl. nervi facialis einerseits und zwischen Cerebellum und Ncl. nervi facialis andererseits.

Falls die NK-Zellaktivität die Mikroglia-Dichte tatsächlich beeinflusst, wäre bei den Untersuchungen der pfp-Maus eine signifikant geringere Dichte aufgetreten. Da dies aber nicht eingetroffen ist, ist es unwahrscheinlich, dass NK-Zellen bei der scid-Mutation ursächlich für die signifikante Erhöhung der Mikroglia-Dichte sind.

Um mögliche Ursachen für die erhöhte Dichte der Mikroglia bei scid-Mäusen zu diskutieren, ist eine genauere Beschreibung der scid-Mutation sinnvoll und soll im

Folgenden dem besseren Verständnis dienen. Der scid-Defekt stellt eine rezessive Mutation auf Chromosom 16 dar (Bosma *et al.*, 1989) und ist bei den genetischen, homozygoten scid-Mäusen dadurch gekennzeichnet, dass sie bis zu einem bestimmten Alter einen schwerwiegenden Mangel an funktionierenden B- und T-Lymphozyten aufweisen (Bosma, 1992). Wie auch bei der rag2-knockout Maus sind andere, nicht lymphoide Blutzellen wie Monozyten, Granulozyten, Megakaryozyten und Erythrozyten durch die scid-Mutation nicht betroffen und besitzen eine normale Funktion.

Anders als bei der rag-Mutation ist bei der scid-Mutation nicht direkt die lymphozyten-spezifische Komponente der V(D)J-Rekombination betroffen, sondern ein stärker generalisierter Prozess im System des DNA-Reparaturmechanismus, die katalytische Untereinheit (DNA-PK_{CS}) des Multiprotein-Komplexes DNA-Proteinkinase (PK). Die Mutation in scid-Zellen befindet sich in der „kinase domain“ der DNA-PK_{CS} (Gellert, 2002), auch als „protein kinase, DNA activated catalytic polypeptide“ (Prkdc) bezeichnet (Araki *et al.*, 1997; Greiner *et al.*, 1997; Lorke *et al.*, 2005), und zwar in den Gen-Codierungen für diesen DNA-Proteinkinase-Komplex (Nicolas *et al.*, 1998). Beim scid-Defekt liegt der Block in den terminalen Schritten der V(D)J-Rekombination, in denen die freien Code-Segmente zusammengefügt werden und nicht wie bei der rag2-Mutation in einem frühen Stadium (Shinkai *et al.*, 1992). Das Prkdc^{scid} Gen codiert für eine Nonsense-Mutation, welche zum Einsetzen eines Stopp-Codons (*termination codon*) in die DNA führt (Greiner *et al.*, 1997). Somit kommt es zu einer Akkumulation von Zwischenprodukten im Coding-Prozess der V(D)J-Rekombination (Smith und Jackson, 1999). Dadurch, dass die scid-Mutation nicht die Einleitung des V(D)J-Rekombinationsprozesses beeinträchtigt, lassen sich Neuarrangements der variablen Regionen von Antikörpern und T-Zell-Rezeptoren ohne weiteres in primären lymphoiden Organen von scid-Mäusen entdecken. Im Gegensatz dazu findet man jedoch keinerlei Umordnungsprozesse von T-Zell-Rezeptoren sowie Immunglobulinen bei den homozygoten rag2-Mutationen (Bosma und Carroll, 1991).

Ein weiterer Unterschied der scid-Mutation zur rag2-Mutation stellt die Pleiotrophie des scid-Defektes dar. Die Mutation im Prkdc-Gen beeinflusst andere Prozesse, wie beispielsweise den DNA-Reparaturmechanismus bei Doppelstrang-Brüchen, der wiederum zu zunehmender Sensitivität gegenüber ionisierender Strahlung führt (Fulop und Phillips, 1990; Biedermann *et al.*, 1991; Hendrickson *et al.*, 1991;

Mombaerts *et al.*, 1992). Die späten Stadien der V(D)J-Rekombination haben sehr viel gemeinsam mit Reparaturmechanismen von DNA-Doppelstrang-Brüchen. Beide Prozesse teilen eine Anzahl verschiedener Faktoren (Gellert, 2002). Es hat sich gezeigt, dass Mutanten, die eine Sensitivität gegenüber ionisierenden Strahlen zeigen, oftmals im V(D)J-Joining-Prozess beeinträchtigt sind und umgekehrt (Smith und Jackson, 1999).

Eine mögliche Ursache für die von Ip ermittelte Erhöhung der Mikroglia-Dichte bei der *scid*-Maus könnte in dem pleiotrophen Defekt der *scid*-Mutation liegen. Dies würde bedeuten, dass die erhöhte Strahlensensitivität oder der beeinträchtigte DNA-Reparaturmechanismus zu einer Erhöhung der Mikroglia führt. Diese Hypothese müsste experimentell überprüft werden.

Die zuvor beschriebenen und diskutierten Vergleiche zwischen der *scid*-Maus und der *rag2*-Maus zeigen einige Eigenschaften der *scid*-Mutation, wie der Einfluss auf die NK-Zellen sowie die Pleiotrophie ihres Gendefektes, die unter Umständen ihre Rolle als ideales Modell einer angeborenen Immunsuppression relativieren könnten. Über einen langen Zeitraum ist der *scid*-Maus in der Literatur diese besondere Stellung zugeschrieben worden (Bosma und Carroll, 1991; Bancroft und Kelly, 1994). Weitere Eigenschaften der *scid*-Mutation könnten ihre überlegene Stellung gegenüber anderen Modellen jedoch noch stärker in Frage stellen: Die *scid*-Mutation wird als sehr stark „leaky“ beschrieben (Shinkai, 1992). Unter „leakiness“ versteht man hier den undichten bzw. inkompletten Block in der B- und T-Zell-Entwicklung. Die vorhandenen *rag*-Proteine können V-, D- und J-Segmente schneiden, die dann mit geringerer Effizienz von „nonhomologous DNA end-joining“- (NHEJ) Proteinen oder auf einigen anderen Reparaturwegen zu funktionalen V(D)J-Ketten zusammengesetzt werden. „Leakiness“ tritt mit zunehmendem Alter der *scid*-Maus vermehrt auf (Carroll *et al.*, 1989). Carroll und ihre Mitarbeiter (1989) haben unterschiedlich alte *scid*-Mäuse untersucht. Dabei hat sich gezeigt, dass alle einjährigen Tiere, zwischen 10 und 14 Monaten, sowohl für B- als auch für T-Lymphozyten „leaky“ sind (Carroll *et al.*, 1989; Bosma und Carroll, 1991). Im Gegensatz dazu findet bei der *rag2*- sowie der *rag1*-Mutante ein kompletter, vollständiger Block statt; sie werden in der Literatur als nicht „leaky“ charakterisiert (Shinkai *et al.*, 1992; Bassing, 2002).

Sowohl die „leakiness“ der scid-Maus, als auch ihr als pleiotroph beschriebener Defekt, die mögliche Beeinflussung der NK-Zellen sowie ein bis jetzt noch nicht erfolgtes Klonen ihrer Gene stellen verschiedenste Nachteile im Vergleich zur rag2-Maus dar. Deswegen wird das Maus-Modell der scid-Mutation als ideales Modell einer angeborenen Immunsuppression schon in einigen Fällen durch das Maus-Modell mit einer rag-Mutation abgelöst. Im Folgenden seien nur drei mögliche Beispiele genannt:

Das Einsetzen von funktional zusammengesetzten Antigen-Rezeptor-Genen in einen rag-knockout Background kann die Blockierung des V(D)J-Rekombinationsprozesses umgehen und die Lymphozytendifferenzierung von rag-defizienten Mäusen in unterschiedlichen Stadien beeinflussen. Lymphozytenspezifische Prozesse, wie der Mechanismus und die Kontrolle von Immunglobulin-Klassen-„switching“ ließen sich dadurch veranschaulichen (Chen *et al.*, 1994).

Die „RAG-2-deficient blastocyst complementation“ (Chen *et al.*, 1994) hat bereits die Untersuchung von zahlreichen Genen und Regulationselementen in lymphozytenspezifischen Prozessen ermöglicht. Die Modifizierung des „RAG-2-deficient blastocyst complementation“-Systems könnte eine Annäherung dahingehend sein, die zahlreichen Signaltransduktionswege innerhalb der frühen Entwicklungsphasen der Lymphozytenreifung besser zu verstehen bzw. aufzuklären (Chen *et al.*, 1994).

Die rag1-knockout Maus könnte eine sinnvolle Alternative für zahlreiche Studien sein. Ein Beispiel dafür wäre das Produzieren eines menschlichen Immunsystems in der Maus, die sogenannte „SCID-hu mouse“ (McCune *et al.*, 1988; Mosier *et al.*, 1988; Mombaerts *et al.*, 1992) – ein Tiermodell, um durch gezielte Rekonstruktions- bzw. Infektions-Experimente mehr über die Immunschwäche AIDS, ausgelöst durch den HI-Virus, zu erfahren (McCune, 1991).

Die Hypothese, dass die rag2-knockout Maus zunehmend ein idealeres Maus-Modell als die scid-Maus darstellen könnte, wird durch diese Untersuchungen bestätigt, da die rag2-Mutation keinen Einfluss auf die Mikroglia-Dichte hat bzw. es zu keiner signifikanten Veränderung der Mikroglia-Dichte in rag2-knockout Mäusen kommt.

6 Zusammenfassung

Um die Wirkung von Immunsuppression auf Mikroglia zu analysieren, wurden drei Tier-Modelle mit einer angeborenen Immunschwäche untersucht: (1) die rag2 (recombination activating gene 2)-knockout (-/-) Maus, die unfähig ist, reife T- und B-Lymphozyten zu bilden, (2) die pfp-knockout (-/-) Maus, der das Perforin-Gen fehlt, so dass die Zytotoxizität der NK-Zellen und zytotoxischen T-Lymphozyten herabgesetzt ist, und (3) die pfp/rag2-doppelknockout (-/-) Maus, die keine funktionellen B- noch T-Lymphozyten besitzt und deren NK-Zellen eine eingeschränkte Funktion haben. Es sollte die Hypothese getestet werden, ob ein Mangel an reifen T- und B-Lymphozyten zu einer Erhöhung der Mikroglia-Dichte führt. 7 rag2-, 7 pfp- und 7 pfp/rag2-Mäuse wurden zusammen mit 7 C57BL/6-Kontrolltieren morphologisch und morphometrisch untersucht.

Keines der drei immundefizienten Maus-Modelle zeigte pathologische Veränderungen der Hirnstruktur. Neurone, Astrozyten und Oligodendrozyten zeigten die gleiche Morphologie wie bei der Kontrolle. Sowohl bei rag2-, pfp- und pfp/rag2- (-/-) Mäusen als auch bei den Kontrolltieren ließen sich drei Arten der Mikroglia erkennen: (1) die ramifizierten Mikroglia in der grauen Substanz, (2) die longitudinalen Mikroglia in der weißen Substanz (Fimbria hippocampi) und (3) die extrem selten auftretende, kompakt aussehende Mikroglia. Bei keiner der immundefizienten Mäuse ließen sich Anzeichen einer Mikroglia-Aktivierung erkennen. Weiterhin konnte eine regionale Variation der Mikroglia-Dichte beobachtet werden. In Motocortex, Striatum und Hippocampus (CA1/CA3) fand sich bei allen 4 Genotypen eine signifikant höhere Mikroglia-Zellzahl als in Fimbria hippocampi, Cerebellum und Ncl. nervi facialis ($p < 0,0001$). Weder bei der rag2 (-/-) -, noch bei der pfp (-/-) - oder der pfp/rag2 (-/-) - Maus fand sich eine signifikante Veränderung der Mikroglia-Dichte im Vergleich zur C57BL/6-Kontrollmaus. Unsere Untersuchungen an der rag2 (-/-) - Maus sprechen gegen die Annahme, dass ein Fehlen reifer T- und B-Lymphozyten zu einer Erhöhung der Mikroglia-Dichte führt. Diese Hypothese war aufgrund morphometrischer Analysen der Mikroglia an scid-Mäusen aufgestellt worden, die ebenfalls einen Mangel an B- und T-Lymphozyten aufweisen. Da der Defekt der scid-Maus als pleiotroph beschrieben wird - sie besitzt einen gestörten DNA-Reparaturmechanismus und weist daher eine erhöhte Strahlensensibilität auf - könnte die beschriebene signifikante Dichteerhöhung der Mikroglia bei scid-Mäusen auf diesem pleiotrophen Effekt beruhen.

7 Literaturverzeichnis

Akamatsu Y, Monroe R, Dudley DD, Eklin SK, Gärtner F, Talukder SR, Takahama Y, Alt FW, Bassing CH, Oettinger MA (2002) Deletion of the RAG2 terminus leads to impaired lymphoid development in mice. *PNAS* 100:1209-1214

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD (2002) The Immune System. In: *Molecular Biology of The Cell*. 4th Edition. Garland Publishing, Inc. New York & London: pp. 1001-1057

Aloisi F (2001) Immune function of microglia. *Glia* 36:165-179

Araki R, Fujimori A, Hamatani K, Mita K, Saito T, Mori M, Fukumura R, Morimyo M, Muto M, Itoh M, Tatsumi K, Abe M (1997) Nonsense mutation at Tyr-4046 in the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit of severe combined immune deficiency mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:2438-2443

Bancroft GJ, Kelly JP (1994) Macrophage activation and innate resistance to infection in SCID mice. *Immunobiol* 191:424-431

Bassing CH, Swat W, Alt FW (2002) The mechanism and regulation of chromosomal V(D)J recombination. *Cell* 109:45-55

Beilhack A, Rockson SG (2003) Immune traffic: a functional overview. *Lymphat Res Biol* 1:219-234

Bignami A, Eng LF, Dahl D, Uyeda CT (1972) Localization of the glial fibrillary acidic protein in astrocytes by immunofluorescence. *Brain Res* 43:429-435

Binder D, van den Broek MF, Kagi D, Bluethmann H, Fehr J, Hengartner H, Zinkernagel RM (1998) Aplastic anemia rescued by exhaustion of cytokine-secreting CD8⁺ T cells in persistent infection with lymphocytic choriomeningitis virus. *J Exp Med* 187:1903-1920

Bosma GC, Custer RP, Bosma MJ (1983) A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. *Nature* 301:527-530

Bosma GC, Davisson MT, Ruetsch NR, Sweet HO, Shultz LD, Bosma MJ (1989) The mouse mutation severe combined immune deficiency (*scid*) is on chromosome 16. *Immunogenetics* 29:54-57

Bosma MJ, Carroll AM (1991) The *scid* mouse mutant: definition, characterization and potential uses. *Annu Rev Immunol* 9:323-350

Bosma MJ (1992) B und T cell leakiness in the *scid* mouse mutant. *Immunodef Rev* 3:261-276

Carroll AM, Hardy RR, Bosma MJ (1989) Occurrence of mature B (IGM⁺, B220⁺) and T (CD3⁺) lymphocytes in *scid* mice. *J Immunol* 143:1087-1093

Chaplin DC (2003) Overview of the immune response. *J Allergy Clin Immunol* 111:442-459

Chatterji M, Tsai CL, Schatz DG (2004) New concepts in the regulation of an ancient reaction: transposition by RAG1/RAG2. *Immunol Rev* 200:261-271

Chen J, Shinkai Y, Young F, Alt FW (1994) Probing immune functions in RAG-deficient mice. *Curr Opin Immunol* 6:313-319

Christianson SW, Greiner DL, Schweitzer IB, Gott B, Beamer GL, Schweitzer PA, Hesselton RM, Shultz LD (1996) Role of natural killer cells on engraftment of human lymphoid cells and on metastasis of human T-lymphoblastoid leukemia cells in C57BL/6J-*scid* mice and in C57BL/6J-*scid* bg mice. *Cell Immunol* 171:186-199

Claus G, Finze FR, Partsch L (1995) Statistik für Soziologen, Pädagogen, Psychologen und Mediziner. Grundlagen. Band 1. Verlag Harri Deutsch, Thun und Frankfurt am Main

Colucci F, Caligiuri MA, Di Santo JP (2003) What does it take to make a natural killer? *Nat Rev Immunol* 3:413-425

Corneo B, Moshous D, Callebaut I, de Chasseval R, Fischer A, de Villartay JP (2000) Three-dimensional clustering of human RAG2 gene mutation in severe combined immune deficiency. *J Biol Chem* 275:12672-12675

Corneo B, Moshous D, Güngör T, Wulffraat N, Philippet P, Le Deist F, Fischer A, de Villartay JP (2001) Identical mutations in RAG1 or RAG2 genes leading to defective V(D)J recombinase activity can cause either T-B-severe combined immune deficiency or Omenn syndrome. *BLOOD* 97:2772-2776

Cuadros MA, Navascues J (1998) The origin and differentiation of microglial cells during development. *Prog Neurobiol* 56:173-189

Davis EJ, Foster TD, Thomas WE (1994) Cellular forms and functions of brain microglia. *Brain Res Bull* 34:73-78

Eglitis MA, Mezey E (1997) Hematopoietic cells differentiate into both microglia and macroglia in the brains of adult mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:4080-4085

Fedoroff S, Zhai R, Novak JP (1997) Microglia and astroglia have a common progenitor cell. *J Neurosci Res* 50:477-486

Frank J, Pignanta C, Panteleyev AA, Prowse DM, Baden H, Weiner L, Gaetaniello L, Ahmad W, Pozzi N, Cserhalmi-Friedmann PB, Aita VM, Uyttendaele H, Gordon D, Ott J, Brissette JL, Christiano AM (1999) Exposing the human nude phenotype. *Nature* 398:473-474

Friese MA, Steinle A, Weller M (2004) The innate immune response in the central nervous system and its role in glioma immune surveillance. *Onkologie* 27:487-491

Froelich CJ, Orth K, Turbov J, Seth P, Gottlieb R, Babior B, Shah GM, Bleackley RC, Dixit VM, Hanna W (1996) New paradigm for lymphocyte granule-mediated

cytotoxicity. Target cells bind and internalize granzyme B, but an endosomolytic agent is necessary for cytosolic delivery and subsequent apoptosis. *J Biol Chem* 271:29037-29079

Gebhard JR, Perry CM, Harkins S, Lane T, Mena I, Asenio VC, Campbell IL, Whitton JL (1998) Coxsackievirus B3-induced myocarditis: perforin exacerbates disease, but plays no detectable role in virus clearance. *Am J Pathol* 153:417-428

Gellert M (2002) V(D)J Recombination: RAG Proteins, Repair Factors, and Regulation. *Annu Rev Biochem* 71:101-132

Ghiasi H, Cai S, Perng GC, Nesburn AB, Wechsler SL (1999) Perforin pathway is essential for protection of mice against lethal ocular HSV-1 challenge but not corneal scarring. *Virus Res* 65:97-101

Graubert TA, DiPersio JF, Russell HJ, Ley TJ (1997) Perforin/granzyme-dependent and independent mechanisms are both important for the development of graft-versus-host disease after murine bone marrow transplantation. *J Clin Invest* 100:904-911

Greiner DL, Hesselton RA, Shultz LD (1998) SCID mouse models of human stem cell engraftment. *Stem Cells* 16:166-177

Guillemin GJ, Brew BJ (2004) Microglia, macrophages, perivascular macrophages, and pericytes: a review of function and identification. *J Leuk Biol* 75:388-397

Gomez CA, Ptaszek LM, Villa A, Bozzi F, Sobacchi C, Brooks EG, Notarangelo LD, Spanopoulou E, Pan ZQ, Vezoni P, Cortes P, Santagata S (2000) Mutations in Conserved Regions of the Predicted RAG2 Kelch Repeats Block Initiation of V(D)J Recombination and Result in Primary Immunodeficiencies. *Mol Cell Biol* 20(15):5653-5664

Hasegawa S, Yamaguchi M, Nagao H, Yoshihari Y, Mori K (2004) Activated natural killer cells adhere to cultured hippocampal neurons and affect the dendritic morphology. *J Neuroimmunol* 151:126-136

Hickey WF (2001) Basic Principles of Immunological Surveillance of the Normal Central Nervous System. *Glia* 36:118-124

Hiramoto R, Ghanta V, Solvason B, Lorden J, Hsueh CM, Rogers C, Demissie S, Hiramoto N (1993) Identification of specific pathways of communication between the CNS and NK cell system. *Life Sci* 53:527-540

Htain WW, Leong SK, Ling EA (1994) A comparative Mac-1 immunocytochemical and lectin histochemical study of microglial cells in the normal and athymic mice. *Glia* 12:44-51

Htain WW, Leong SK, Ling EA (1995) A qualitative and quantitative study of the glial cells in normal and athymic mice. *Glia* 15:11-21

Ibrahim Mzm, Khreis Y, Koshayan DS (1974) The histochemical identification of microglia. *J Neurol Sci* 22:211-233

Ip CW (2002) Mikroglia unter angeborener und induzierter Immunsuppression: Eine Studie an *scid* und *mdr 1a/1b (-/-)* double-knockout Mäusen. Dissertation. Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Jankovic M, Casellas R, Yannoutsos N, Wardemann H, Nussenzweig MC (2004) RAGs and regulation of autoantibodies. *Annu Rev Immunol* 22:485-501

Kagi D, Ledermann B, Burkl K, Seiler P, Odermatt B, Olsen KJ, Podack ER, Zinkernagel RM, Hengartner H (1994) Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice. *Nature* 369:31-37

Kagi D, Seiler P, Pavlovic J, Ledermann B, Burki K, Zinkernagel RM, Hengartner H (1995) The roles of perforin- and FAS-dependent cytotoxicity in protection against cytopathic and noncytopathic viruses. *Eur J Immunol* 25:3256-3262

Katafuchi T (1996) Correlation between the nervous system and the immune system. *Fukuoka Igaku Zasshi* 87:127-132

Katano H, Cohen JI (2005) Perforin and lymphohistiocytic proliferative disorders. *Br J Haematol* 128:739-750

Kauer C, Hao AJ, Wu CH, Ling EA (2001) Origin of microglia. *Microsc Res Tech* 54:2-9

Kreutzberg GW (1996) Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci* 19:312-318

Lawson LJ, Perry VH, Dri P, Gordon S (1990) Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience* 39:151-170

Ling EA, Wong WC (1993) The origin and nature of ramified and amoeboid microglia: a historical review and current concepts. *Glia* 7:9-18

Lorke DE, Ip CW, Schumacher U (2005) Increased number of microglia in severe combined immunodeficient (SCID) mice. *Neurosignals eingereicht*

McCune JM (1991) SCID mice as immune system models. *Curr Opin Immunol* 3:224-228

McCune Jm, Namikawa R, Kaneshima H, Shultz LD, Lieberman M, Weissman IL (1988) The SCID-hu mouse: murine model for the analysis of human hematolymphoid differentiation and function. *Science* 241:1632-1639

Medana IM, Chang-Ling T, Hunt NH (2000) Reactive changes of retinal microglia during fatal murine cerebral malaria. Effects of dexamethasone and experimental permeabilization of the blood-brain barrier. *Am J Pathol* 156:1055-1065

Mombaerts P, Iacomini J, Johnson RS, Herrup K, Tonegawa S, Papaioannou VE (1992) RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. *Cell* 68:869-877
Monsier DE, Gulizia RJ, Baird SM, Wilson DB (1988) Transfer of a functional human immune system to mice with severe combined immunodeficiency. *Nature* 335:256-259

Monteiro RA, Rocha E, Marini-Abreu MM (1996) Do microglia arise from pericytes? An ultrastructural and distribution study in the rat cerebellar cortex. *J Submicrosc Cytol Pathol* 28:457-469

Mullbacher A, Hla RT, Museteanu C, Simon MM (1999) Perforin is essential for control of ectromelia virus but not related poxviruses in mice. *J Virol* 73:1665-1667

Murabe Y, Sano Y (1982) Morphological studies on neuroglia. VI. Postnatal development of microglial cells. *Cell Tissue Res* 225:469-485

Navascues J, Calvente R, Marin-Teva JL, Cuadros MA (2000) Entry, dispersion and differentiation of microglia in the developing central nervous system. *An Acad Bras Cienc* 72:91-102

Nicolas N, Moshous D, Cavazzana-Calvo M, Papadopoulo D, de Chasseval R, Le Deist F, Fischer A, de Villartay JP (1998) A human severe combined immunodeficiency (SCID) condition with increased sensitivity to ionizing radiations and impaired V(D)J rearrangements defines a new DNA recombination/repair deficiency. *J Exp Med* 188:627-634

Nishizawa Y, Kurihara T, Masuda T, Takahashi Y (1985) Immunohistochemical localization of 2'3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase in adult bovine cerebrum and cerebellum. *Neurochem Res* 10:1107-1118

Notarangelo LD, Villa A, Schwarz K (1999) RAG and RAG defects. *Curr Opin Immunol* 11:435-442

Notarangelo LD, Santagata S, Villa A (2001) Recombinase activating gene enzymes of lymphocytes. *Curr Opin Hematol* 8:41-46

Novikoff AB (1957) Enzyme localization and ultrastructure of neurons. In *The Neuron*:255

Novikoff AB (1976) The endoplasmatic reticulum: a cytochemist's view. *Proc Natl Acad Sci* 73:2781

Novikoff AB, Goldfischer S (1961) Nucleoside diphosphatase activity in the Golgi apparatus and its usefulness for cytological studies. *Proc Natl Acad Sci* 47:2781

Oettinger MA, Schatz DG, Gorka C, Baltimore D (1990) RAG-1 and RAG-2, adjacent genes that synergistically activate V(D)J recombination. *Science* 248:1517-1523

Perry VH, Gordon S (1991) Macrophages and the nervous system. *Int Rev Cytol* 125:203-244

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

Rezaie P, Male D (2002) Differentiation, ramification and distribution of microglia within the central nervous system examined. *Neuroembryology* 1:29-43

Rezaie P, Male D (2002) Mesoglia & microglia – a historical review of the concept of mononuclear phagocytes within the central nervous system. *Hist Neurosci* 11:325-374

Richardson A, Hao C, Fedoroff S (1993) Microglia progenitor cells: a subpopulation in cultures of mouse neopallial astroglia. *Glia* 7:25-33

Rio Hortega P del (1919) El "tracer elemento" de los centros nerviosos I. La microglia en estado normal. II. Intervención de la microglia en los procesos patológicos. III. Naturaleza probable de la microglia. *Biol Soc Exp Biol* 9:69-120

Rio Hortega P del (1932) Mikroglia. In: Penfield W (ed) *Cytology and cellular pathology of the nervous system*. 2:481-534

Rossi CP, McAllister A, Tanguy M, Kagi D, Brahic M (1998) Theiler's virus infection of perforin-deficient mice. *J Virol* 72:4515-4519

Rossi D, Gaidano G (2003) Messengers of cell death: apoptotic signaling in health and disease. *Haematologica* 88:212-218

Schwarz K, Gauss GH, Ludwig L, Pannicke U, Li Z, Lindner D, Friedrich W, Seger RA, Hansen-Hagge TE, Desiderio S, Lieber MR, Bartram CR (1996) RAG Mutations in Human B Cell-Negative SCID. *Science* 274:97-99

Shinkai Y, Rathbun G, Lam KP, Oltz EM, Stewart V, Mendelsohn M, Young F, Stall AM, Alt FW (1992) RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell* 68:855-867

Smith GCM, Jackson SP (1999) The DNA-dependent protein kinase. *Genes Dev* 13:916-34

Smyth MJ, Thia KY, Street SEA, MacGregor D, Godfrey DI, Trapani JA (2000) Perforin-mediated cytotoxicity is critical for surveillance of spontaneous lymphoma. *J Exp Med* 192:755-760

Streit WJ, Walter SA, Pennell NA (1999) Reactive microgliosis. *Prog Neurobiol* 57:563-581

Streit WJ (2002) Microglia as neuroprotective, immunocompetent cells of the CNS. *Glia* 40:133-139

Takahashi K, Aranami T, Endoh M, Miyake S, Yamamura T (2004) The regulatory role of natural killer cells in multiple sclerosis. *Brain* 127:1917-1927

Thomas WE (1992) Brain macrophages: evaluation of microglia and their functions. *Brain Res Rev* 31:42-57

Trapani JA, Smyth MJ (2002) Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat Rev Immunol* 2:735-747

Tschopp J, Jongedeel CV (1988) Cytotoxic T lymphocyte mediated cytotoxicity. *Biochemistry* 27:2641-2646

Usherwood EJ, Brooks JW, Sarawar SR, Cardin RD, Young WD, Allen DJ, Doherty PC, Nash AA (1997) Immunological control of murine gamma-herpesvirus infection is independent of perforin. *J Gen Virol* 78:2025-2030

Villa A, Sobacchi C, Vezoni P (2001) Recombination activating gene and its defects. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 1:491-495

Villa A, Sobacchi C, Notarangelo LD, Bozzi F, Abinun M, Abrahamsen TG, Arkwright PD, Baniyash M, Brooks EG, Conley ME, Cortes P, Duse M, Fasth A, Filipovich AM, Infante AJ, Jones A, Mazzolari E, Muller SM, Pasic S, Rechavi G, Sacco MG, Santagata S, Schroeder ML, Seger R, Strina D, Ugazio A, Väliäho J, Vihinen M, Vogler LB, Ochs H, Vezoni P, Friedrich W, Schwarz K (2001) V(D)J recombination defects in lymphocytes due to RAG mutations: severe immunodeficiency with a spectrum of clinical presentation. *BLOOD* 97:81-88

De Villartay JP, Poisson C, de Chasseval R, Buck D, Le Guyader G, Villey I (2003) Human and animal models of V(D)J recombination deficiency. *Curr Opin Immunol* 15:592-598

Vorbrodt AW, Wisniewski HM (1982) Plasmalemma-bound nucleoside diphosphatase as a cytochemical marker of central nervous system (CNS) mesodermal cells. *J Histochem Cytochem* 30:418-424

Walsh CM, Matloubian M, Liu CC, Ueda R, Kurahara CG, Christensen JL, Huang MTF, Young JDE, Ahmed R, Clark WR (1994) Immune function in mice lacking the perforin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:10854-10858

Williams K, Alvarez X, Lackner AA (2001) Central nervous system perivascular cells are immunoregulatory cells that connect the CNS with the peripheral immune system. *Glia* 36:156-164

William KC, Hickey WF (2002) Central Nervous System Damage, Monocytes and Microphages, and Neurological Disorders in AIDS. *Annu Rev Neurosci* 25:537-562

Youn BS, Liu CC, Kim KK, Young JDE, Kwon MH, Kwon BS (1991) Structure of the mouse pore-forming protein (perforin) gene: Analysis of transcription initiation site, 5' flanking sequence, and alternative splicing of 5' untranslated regions. *J Exp Med* 173:813-822

Zeitz M (1999) Immunologie des Gastrointestinaltrakts. In: Zeitz M *et al.* (Hrsg.) Georg Thieme Verlag, Stuttgart New York (Thiemes Innere Medizin TIM, 1.Aufl., S 482-483)

Zielasek J, Hartung HP (1996) Molecular mechanisms of microglial activation. *Adv Neuroimmunol* 6:191-122

8 Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosin-Diphosphat
AEA	autoimmune Encephalomyelitis
AIDS	acquired immune deficiency syndrome
AS	Aminosäure
BHS	Blut-Hirn-Schranke
Bp	Basenpaar
C	constant
CD	cluster of differentiation
CNPase	zyklische Nukleotid 3`-Phosphodiesterase
CsA	Cyclosporin A
DAB	Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid
DED	death effector domain
DISC	death-inducing signaling complex
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DR	death receptor
EBV	Epstein-Bar-Virus
EM	Elektronenmikroskopie
FADD	Fas-associated death domain
FasL	Fas Ligand
FHL	hämophagocytische Lymphohistiocytose
GDP	Guanin-Diphosphat
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein
GvDH	graft-versus-host-diseases
H	heavy
HIV	human immunodeficiency virus
HSC	haematopoietic stem cell
Hu	human
i.p.	intraperitoneal
IDP	Inosin-5-Diphosphat
IFN- γ	Interferon γ
Ig	Immunglobulin
L	light
LCMV	lymphocytic choriomeningitis virus

mdr	multi drug resistance
MHC	major histocompatibility complex
MPS	Monozyten-Phagozytose-System
mRNA	messenger-RNA
MS	Multiple Sklerose
NDPase	Nucleotid-Diphosphatase
NHEJ	nonhomologous DNA end-joining
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
NOD	non-overweight diabetes
PB	Phosphat-Puffer
PBS	saliner Phosphat-Puffer
PFA	Paraformaldehyd
pfp	pore-forming protein
PK	Proteinkinase
PNS	peripheres Nervensystem
Prkdc	protein kinase, DNA activated catalytic polypeptide
rag	recombination activating gene
rER	rauhes Endoplasmatisches Reticulum
RNA	Ribonucleinsäure
RSS	recombination signal sequence
scid	severe combined immunodeficiency
SEM	standard error of the mean (Standardfehler)
SG	Serglycin
TCR	T-Zell-Rezeptor
TH-Zellen	T-Helferzellen
TNF	Tumornekrose-Faktor
UDP	Uridin-Diphosphat
V	variabel
V(D)J	variable (diversity) joining
ZNS	zentrales Nervensystem

9 Danksagung

Diese Arbeit ist in dem Zeitraum vom Mai 2003 bis September 2005 im Institut für Anatomie II: Experimentelle Morphologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf entstanden.

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dietrich Lorke für die freundliche Überlassung des Dissertationsthemas und für seine sehr engagierte und hilfreiche Unterstützung bei der Durchführung und Fertigstellung dieser Arbeit. Er gab mir jederzeit die Möglichkeit, mit ihm über Probleme und Schwierigkeiten im Bezug auf diese Arbeit sprechen zu können.

Des weiteren danke ich Herrn Prof. Dr. Schumacher, geschäftsführender Direktor des Institutes für Anatomie und Direktor der Abteilung Anatomie II, der entscheidende Anregungen zur Entstehung der vorliegenden Arbeit gegeben hat und auch während der Durchführung bei Fragen jederzeit zur Verfügung stand.

Auch danke ich ihm für die großzügige Bereitstellung der Räumlichkeiten und der technischen Möglichkeiten zur Durchführung meiner Arbeit.

Herrn Dr. Michael Bubenheim, wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Medizinische Biometrie und Epidemiologie, danke ich für die Hilfe bei der Durchführung der statistischen Analyse unserer Ergebnisse.

Ich danke Frau Elke Schäfer für die Einbettung der Präparate und die Entwicklung der elektronenmikroskopischen Bilder.

Herrn Thorsten Krieger, wissenschaftlicher Mitarbeiter des Institutes für Immunologie, danke ich für die Durchsicht und Korrektur meiner Einleitung.

Mein Dank gilt allen Technischen Mitarbeitern des Institutes für Anatomie II für die ausgezeichnete technische Unterstützung während des gesamten Zeitraumes meiner Arbeit:

Ich danke Frau Susanne Feldhaus für ihr Korrekturlesen des Abschnittes Material und Methoden sowie für ihre technische Hilfe beim Einscannen und Bearbeiten der Fotos, Herrn Klaus Siebert für die Einführung in das Arbeiten mit dem Vibratom sowie für seine Hilfe bei den Enzymfärbungen, Frau Kornelia Babista für die Hilfe bei der Perfusion der Mäuse, Frau Maike Märker für arbeitserleichternde Unterstützung bei allen Immunhistochemischen Färbungen und Frau Heike Gustke für ihre Hilfe bei der Formatierung meiner Arbeit.

Allen Dozenten und Mitarbeitern des Institutes für Anatomie II gilt mein herzlicher Dank für die freundliche Aufnahme im Institut während meiner gesamten Promotionszeit.

Ganz herzlich möchte ich meinem lieben Freund Felix Müller für seine Hilfe bei der Entwicklung und Bearbeitung der zahlreichen digitalisierten Fotos und der Graphiken sowie für seine Rücksichtnahme, liebevolle Unterstützung und hingenommenen Entbehrungen danken.

Schließlich gilt mein Dank meinen Eltern, ohne deren finanzielle Unterstützung ich diese Arbeit niemals so sorgenfrei hätte durchführen können. Während problematischer Phasen und psychischen Belastungssituationen in dem Zeitraum dieser Arbeit hatten sie immer ein offenes Ohr und gaben mir das Gefühl aufgefangen zu werden.

10 Lebenslauf

Name: Christine Zylmann
Geburtsdatum/ -ort: 03. März 1978 in Mainz
Nationalität: deutsch
Familienstand: ledig
Adresse: Hofweg 9
22085 Hamburg
Tel.: 040-248 22 758

Ausbildung

1984-88 Grundschule Mainz-Lerchenberg
1988-97 Integrierte Gesamtschule Mainz
1997 Abitur
1997-99 Soziologie-Studium an der Universität Hamburg, Vordiplom
1999 Auslandsaufenthalt in Barcelona, Spanien durch ein ERASMUS-Stipendium
2000 Beginn des Studiums der Humanmedizin am Universitätskrankenhaus Eppendorf in Hamburg

März 2002 Ärztliche Vorprüfung
März 2003 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
März 2005 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
Dezember 2006 Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Famulaturen

2002 Innere Medizin - St. Vincenz- und Elisabeth-Hospital, Mainz
2003 Institut für Anatomie, UKE Hamburg
2004 Praxis für Kinder- und Jugendmedizin, Hamburg
2004 Abt. f. Kinder- und Jugendmedizin - Wilhelminenspital Wien, Österreich
2004 Abt. f. Gynäkologie & Geburtshilfe – St. Vincenz- und Elisabeth-Hospital, Mainz

Sprachen

Englisch und Spanisch: fließend in Sprache und Schrift
Französisch und Latein: grundlegende Sprachkenntnisse

11 Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich diese Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Hamburg 2005

Christine Zylmann