

Die Funktion des Chemokins CCL21 und des  
Chemokinrezeptors CXCR3 in der Kommunikation  
zwischen Mikrogliazellen und Neuronen

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doctor rerum naturalium**

(Dr. rer. nat.)

von

Dipl.-Biologin Angelika Rappert

geb. am 27.02.1974 in Berlin

im Fachbereich Biologie  
der Freien Universität Berlin  
im Februar 2003 eingereicht

Gutachter: 1. Prof. Dr. Hans-Joachim Pflüger  
Freie Universität Berlin  
Institut für Biologie, Neurobiologie  
Königin-Luise-Strasse 28-30  
14195 Berlin

2. Prof. Dr. Helmut Kettenmann  
Cellular Neurosciences  
Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin  
Robert-Rössle Str. 10  
13125 Berlin

Tag der Disputation: 19. Mai 2003

# Inhaltsangabe

<b>1. Einleitung.....</b>	<b>4</b>
<b>1.1 Das Immunsystem des Gehirns.....</b>	<b>4</b>
<b>1.2 Mikroglia.....</b>	<b>4</b>
1.2.1 Ramifizierte Mikroglia.....	5
1.2.2 Aktivierte Mikroglia.....	6
1.2.3 Aktivierungsmodelle.....	7
1.2.4 Signale, die zu einer Aktivierung von Mikrogliazellen führen.....	9
<b>1.3 Chemokine.....</b>	<b>10</b>
1.3.1 Familie der Chemokine.....	11
1.3.2 Chemokinrezeptoren.....	13
1.3.3 Chemokine und ihre Rezeptoren sind redundant.....	14
1.3.4 Kontrolle über das Chemokinsystem.....	15
1.3.5 Chemokine im ZNS.....	16
1.3.6 CCL21.....	18
<b>1.4 Darstellung der Ziele.....</b>	<b>21</b>
<b>2. Material und Methoden.....</b>	<b>22</b>
<b>2.1 Präparation der Mikrogliazellkulturen.....</b>	<b>22</b>
2.1.1 Serumhaltiges DMEM.....	23
<b>2.2 Präparation von Gewebeschnitten.....</b>	<b>23</b>
<b>2.3 Knockout Tiere.....</b>	<b>24</b>
<b>2.4 Patch-clamp Technik.....</b>	<b>24</b>
2.4.1 Experimenteller Aufbau des Meßstands.....	24
2.4.2 Die Patch-clamp-Technik in Kultur und im akuten Hirnschnitt.....	27
2.4.3 Verwendete Spannungsprotokolle.....	28
<b>2.5 Untersuchungen der Migration mit Hilfe des Chemotaxisassay.....</b>	<b>30</b>
<b>2.6 Zytotoxizitätstest mit Trypanblau.....</b>	<b>30</b>
<b>2.7 Messung der Stickstoffmonoxyd (NO)-Produktion.....</b>	<b>31</b>
<b>2.8 Freisetzung von Zytokinen nach Chemokinstimulation.....</b>	<b>31</b>
<b>2.9 Messung der Zellproliferation mit Hilfe des BrdU ELISA.....</b>	<b>32</b>
<b>2.10 Läsion des Nervus facialis.....</b>	<b>33</b>
<b>2.11 Entorhinale Kortex Läsion (ECL).....</b>	<b>34</b>

2.12	<b>Immunhistochemische Färbung</b> .....	35
2.12.1	Perfusionsfixierung.....	35
2.12.2	Herstellung von Vibratom- oder Gefrierschnitten.....	35
2.12.3	Immunhistochemische Charakterisierung.....	36
2.13	<b>Quantifizieren</b> .....	38
2.14	<b>Vermessung der Dendritenlänge</b> .....	39
2.15	<b>Statistische Auswertung</b> .....	40
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>41</b>
3.1	<b>CCL21 bewirkt eine Änderung in der Membranleitfähigkeit kultivierter Mikrogliazellen</b> .....	41
3.2	<b>Im akuten Hirnschnitt induziert CCL21 einen Strom in Mikrogliazellen</b> .....	45
3.3	<b>CCL21 bewirkt einen langanhaltenden Chloridstrom</b> .....	48
3.4	<b>CCL21 und CXCL10 binden an den CXCR3 Rezeptor und nicht an den CCR7 Rezeptor</b> .....	51
3.5	<b>CCL21 induziert eine chemotaktische Reaktion in Mikrogliazellen, die über den CXC-Rezeptor-3 vermittelt wird</b> .....	55
3.6	<b>Die Migration von Mikrogliazellen wird durch den Chloridkanalblocker DIDS reduziert</b> .....	57
3.7	<b>CCL21 stimuliert keine Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO)</b> .....	58
3.8	<b>CCL21 induziert keine Ausschüttung von Zytokinen von Mikrogliazellen</b> .....	59
3.9	<b>CCL21 und CXCL10 bewirkt keine Zellteilung von Mikrogliazellen</b> .....	60
3.10	<b>Nach einer Fazialisläsion findet man keine Unterschiede in der Morphologie und Proliferation von Mikrogliazellen aus CXCR3 Knockout Mäusen im Vergleich zum Wildtyp</b> .....	61
3.11	<b>Untersuchungen an CXCR3 Knockout Mäusen nach Läsion des entorhinalen Kortex (ECL)</b> .....	65
3.11.1	In CXCR3 Knockout Tieren führt eine ECL zu einer reduzierten Mikrogliaaktivierung im Vergleich zu Wildtyp Tieren.....	66
3.11.2	Der Apoptoseprozeß der Neurone des Tractus perforans wird nicht beeinflusst durch den CXC-Rezeptor-3.....	72

3.11.3 Die Proliferation drei Tage nach ECL ist nicht verändert in CXCR3 Knockout Mäusen im Vergleich zu Wildtyp Tieren.....	73
3.11.4 Die Aktivierung von Astrozyten ist in CXCR3 Knockout Mäusen nicht verändert.....	74
3.11.5 Das Zurückziehen der GABAergen Neurone ist bei CXCR3 Knockout Mäusen reduziert.....	76
<b>4. Diskussion.....</b>	<b>79</b>
<b>4.1 Mikrogliazellen in Kultur und im akuten Hirnschnitt verfügen über Rezeptoren für das Chemokin CCL21, das die Öffnung eines Chloridkanals bewirkt.....</b>	<b>80</b>
<b>4.2 CXCR3 stellt den mikroglialen Rezeptor für CCL21 dar.....</b>	<b>82</b>
<b>4.3 Wirkung von CCL21 auf typische Parameter der Mikroglia-aktivierung.....</b>	<b>84</b>
<b>4.4 Bedeutung des Chemokinrezeptors CXCR3 nach Facialisläsion oder ECL.....</b>	<b>85</b>
4.4.1 Der CXCR3 Rezeptor ist an der Aktivierung der Mikroglia nach ECL, jedoch nicht nach einer Facialisläsion beteiligt.....	85
4.4.2 Die Aktivierung des CXCR3 Rezeptors führt zur Migration und nicht zur Proliferation.....	89
4.4.3 CXCR3 spielt keine Rolle in der Aktivierung von Astrozyten nach ECL.....	90
4.4.4 Funktion von CXCR3 und dessen Liganden.....	91
<b>4.5 Potentielle klinische Aspekte.....</b>	<b>93</b>
<b>5. Literaturliste.....</b>	<b>95</b>
<b>6. Zusammenfassung.....</b>	<b>114</b>
<b>7. Anhang.....</b>	<b>116</b>