

1. Einleitung

1.1 Das Immunsystem des Gehirns

Das zentrale Nervensystem (ZNS) wurde lange Zeit als ein durch die Blut-Hirn-Schranke vom Immunsystem abgeschirmtes Organ betrachtet (Medawar, 1948). Die intakte Blut-Hirn-Schranke stellt eine Barriere für Immunzellen, Antikörper und andere immunologische Moleküle dar (Hickey et al., 1991; Lassmann, 1997). Unter physiologischen Bedingungen jedoch sind aktivierte T-Lymphozyten in der Lage, die Blut-Hirn-Schranke zu passieren und ins Hirngewebe einzudringen (Lassmann, 1997). Unter diesen Bedingungen ist die Expression von immun relevanten Oberflächenmolekülen wie den beiden Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) Klassen im ZNS kaum nachweisbar (Hart & Fabry, 1995; Lassmann, 1997). Aktivierte T-Lymphozyten verlassen das Gehirn wieder, wenn sie ihr Antigen nicht präsentiert bekommen haben (Hart & Fabry, 1995; Lassmann, 1997). Bei akuten Hirnschäden oder bei chronischen Erkrankungen ändert sich diese Situation. Aktivierte Blutleukozyten können in größerer Anzahl, auch bei nicht geschädigter Blut-Hirn-Schranke, ins Hirngewebe eindringen (Brown, 2001). Welche Signalmoleküle diese Vorgänge zulassen oder fördern können, ist bisher nicht vollständig geklärt.

Neben Blutleukozyten sind vor allem Endothelzellen, Astrozyten und Mikrogliazellen an entzündlichen Vorgängen im Gehirn beteiligt. Lediglich die Mikrogliazellen besitzen im Hirngewebe voll-kompetente, immunologische Funktionen und stellen somit die residenten Makrophagen des Gehirns dar (Gehrmann et al., 1995; Benveniste, 1997).

Mikrogliazellen weisen nicht nur ähnliche Oberflächenmarker wie periphere Makrophagen auf, sondern besitzen ebenfalls die Fähigkeit der Antigenpräsentation, der Freisetzung von Zytokinen, Chemokinen und Zytotoxinen und der Phagozytose (Benveniste, 1995; Wekerle, 1995; Asensio & Campbell, 1999). Auch die Astrozyten produzieren unter pathologischen Bedingungen Zytokine (Asensio & Campbell, 1999), wodurch sie ebenfalls Einfluß auf die Abwehrreaktion nehmen können.

1.2 Mikroglia

Die ontogenetische Herkunft der Mikrogliazellen ist bis heute immer noch umstritten. Einige Untersuchungen deuten darauf hin, daß sie sich, wie alle anderen Zelltypen des Gehirns, aus dem Neuroektoderm ableiten (Hao et al., 1991; Richardson et al., 1993). So

können sich aus Kulturen von embryonalen Neuralrohrzellen Mikrogliazellen entwickeln (Hao et al., 1991; Richardson et al., 1993). Andere Ergebnisse sprechen für einen mesodermalen (pialen) Ursprung (Boya et al., 1979; Ashwell, 1991), was bereits 1932 von Del Rio-Hortega (1932) postuliert wurde. Er entdeckte an spezifischen Stellen im embryonalen Gehirn eine Anhäufung von pialen Zellen, die er als „fountains of microglia“ bezeichnete. Diese Zellen wandern während der Embryogenese aus der Pia mater ins Gehirn ein, verteilen sich im Gehirn und nehmen die Morphologie von Mikrogliazellen an. Die meisten Ergebnisse sprechen für die mesodermale Abstammung der Mikrogliazellen von monozytären Zellen des Blutes, die während der perinatalen Entwicklungsphase das Gehirn infiltrieren und dort verbleiben (Ling & Wong, 1993). In diesem Stadium besitzen die Monozyten/Mikroglia eine runde Morphologie mit wenigen Ausläufern. Diese amöboide Mikroglia differenziert sich während der weiteren ZNS Entwicklung zur ramifizierten Mikroglia, die einen kleinen Zellkörper und zahlreiche lange, verzweigte Ausläufer besitzt (Streit & Kincaid Colton, 1995). Die Mikroglia ist während der Entwicklung des ZNS an der Phagozytose von zellulären Überresten beteiligt, die durch programmierten Zelltod oder Remodulation von Nervenverbindungen entstehen (Ling & Wong, 1993; Moore & Thanos, 1996).

1.2.1 Ramifizierte Mikroglia

Mikrogliazellen sind über das gesamte Gehirn verteilt und stellen 10 bis 20 % der Gliazellen im Gehirn dar (Altman, 1994). Sie sind innerhalb einer Gehirnstruktur gleichmäßig verteilt und weisen kaum Überlappungen ihrer Ausläufer auf (Perry, 1994). Die umfassende Präsenz garantiert eine schnelle Reaktion der Mikroglia auf pathologische Veränderung im Gewebe.

Im adulten Gehirn befindet sich die Mikroglia im sogenannten „ruhendem“ Zustand. In diesem Zustand besitzen Mikrogliazellen eine ramifizierte Morphologie, das heißt einen kleinen Zellkörper, lange Verzweigungen und eine niedrige Expression von Oberflächenantigenen wie unter anderem dem Komplementrezeptor C3b (Wu et al., 1994; Kreutzberg, 1996). Der in der Literatur verwendete Begriff „ruhend“ suggeriert, daß die Mikroglia in diesem Zustand nicht in Regulationsmechanismen des ZNS eingreift, und aufgrund ihrer komplexen Morphologie wahrscheinlich nicht wanderungsfähig ist. Mit Hilfe von radioaktiv markiertem Thymidin, das sich in die Desoxyribonukleinsäure (DNS) einbaut, wurde nachgewiesen, daß auch im gesunden ZNS eine geringe Zellteilungsrate dieser ramifizierten Mikrogliazellen zu beobachten ist (Lawson et al., 1992).

Physiologische Untersuchungen an ramifizierten Mikrogliazellen im Hirnschnittpräparat (*in situ*) scheiterten bislang weitgehendst an der schlechten Zugänglichkeit der Zellen. In akuten Schnittpräparaten wurde aber gezeigt, daß ramifizierte Mikrogliazellen keine spannungsabhängigen Ströme und ein niedriges Membranpotential besitzen (Boucsein et al., 2000).

Die ramifizierte Mikroglia muß mit einer Vielzahl funktioneller Rezeptorsysteme ausgestattet sein, die es ihr erlaubt, rasch auf die unterschiedlichsten Veränderungen des Milieus unter pathologischen Bedingungen reagieren zu können.

1.2.2 Aktivierte Mikroglia

Mikrogliazellen werden durch eine Verletzung oder pathologische Veränderung des Gehirngewebes aktiviert, und es treten Veränderungen in ihrer Morphologie auf (Streit et al., 1988; Gehrman et al., 1995). Es kommt zu einer Reduzierung der Ausläufer und zu einer Vergrößerung des Zellkörpers (Kreutzberg, 1996). Diese Aktivierung erfolgt abgestuft und ist weiterhin charakterisiert durch verstärkte Motilität, Zellteilung, Expression neuer funktioneller Antigene (Streit et al., 1988; Gehrman et al., 1995; Kreuzberg, 1996) sowie phagozytische Aktivität (Kreutzberg, 1996; Streit et al., 1999).

Viele Untersuchungen werden an kultivierten Mikrogliazellen durchgeführt. In Kultur sind Mikrogliazellen weder „ruhend“ noch sind sie voll aktiviert. Vielmehr stellen sie ein Zwischenstadium in der Aktivierung dar. Sie besitzen, ähnlich wie amöboide Mikrogliazellen auf Hirnschnitten von jungen Mäusen, eine einwärtsgerichtete Leitfähigkeit („inward rectifier“) (Brockhaus et al., 1993). Kultivierte Mikrogliazellen können noch stärker aktiviert werden. Die Inkubation mit Lipopolysaccharid (LPS) löst einen verzögert auswärtsgerichteten Kaliumstrom („delayed outward rectifier“) (Walz & Bekar, 2001) und eine Reduktion des einwärtsgerichteten Kaliumkanals aus (Prinz et al., 1999). Es wird vermutet, daß diese beiden Ströme komplementär wirken. Kultivierte Mikroglia besitzen im Gegensatz zu ramifizierten Mikrogliazellen im gesunden Gehirn eine amöboide Morphologie, das heißt einen runden Zellkörper mit wenigen Ausläufern. Die Kultivierung mit Astrozyten-konditioniertem Medium (ACM) bewirkt eine Ramifizierung der Mikroglia, jedoch keine Veränderung ihres Strommusters (Eder, 1998). Die durch ACM verursachte Transformation von amöboiden zu ramifizierten Mikrogliazellen konnte durch die pharmakologische Blockade von Chloridkanälen verhindert werden (Eder et al., 1998). Chloridkanäle scheinen somit eine wichtige Rolle in der Änderung des funktionellen Stadiums der Mikrogliazellen zu spielen.

Aktivierete Mikrogliazellen können auch zytotoxische Substanzen wie freie Sauerstoffradikale, Stickstoffmonoxid (NO), nicht-spezifische Proteasen sowie Zytokine sezernieren (Banati et al., 1993; Kreutzberg, 1996; Zielasek & Hartung, 1996). Des weiteren besitzen sie die Fähigkeit zur Antigenpräsentation im Kontext mit MHC II-Molekülen an der Zelloberfläche (Hayes et al., 1987; Woodroffe et al., 1989). Die eben erwähnten zytotoxischen Substanzen schädigen neben fremden Pathogenen oder verletzten Zellen auch intakte Zellen (Streit & Kincaid Colton, 1995). Damit greift die Mikroglia maßgeblich in den Krankheitsverlauf ein. Da Mikrogliazellen die ersten Zellen im ZNS sind, die auf eine neuronale Verletzung reagieren, wurde ein Neuron-Mikroglia Kommunikationssystem postuliert (Aschner et al. 1999, Streit et al., 1999). Die genauen Vorgänge der Signalereignisse, die zur Aktivierung der Mikroglia führt, sowie der zelluläre Ursprung dieser Signale ist bisher unbekannt.

1.2.3 Aktivierungsmodelle

Im weiteren sollen zwei Tiermodelle zum Studium der Mikrogliaaktivierung vorgestellt werden: die periphere Fazialisläsion und die entorhinale Kortexläsion.

Die periphere Fazialisläsion

In diesem Schädigungsmodell kommt es nach Durchtrennen des Nervus facialis in der Peripherie zu einer bereits gut beschriebenen Abfolge von morphologischen und metabolischen Veränderungen in der Umgebung der verletzten Neuronen des im Stammhirn lokalisierten Nucleus nervi facialis (Blinzinger & Kreutzberg, 1968; Kreutzberg, 1996). Diese Veränderungen scheinen eine wichtige Rolle zu spielen, um weiteren Schaden zu verhindern und ein Milieu zu schaffen, in dem das verletzte neuronale Gewebe wieder repariert werden kann. Mikrogliazellen in der Nähe der verletzten Motorneurone zeigen eine rasche Aktivierung, wobei die Blut-Hirn-Schranke in Mäusen intakt bleibt und lediglich eine geringe Invasion von Monozyten/Makrophagen aus dem Blut in das Läsionsgebiet beschrieben ist (Raivich et al., 1998).

Bereits wenige Stunden nach der Axotomie des Nerven konnte die Expression des Komplementrezeptor 3 (Graeber et al., 1988), der MHC I und des Intermediärfilamentes Vimentin (Streit & Graeber, 1993; Raivich et al., 1999) auf der Mikroglia nachgewiesen werden. In Ratten wurde bereits zwölf Stunden nach der Läsion eine Veränderung in der Leitfähigkeit der Mikrogliazellen festgestellt (Boucsein et al., 2000). Diese Mikrogliazellen besitzen einwärtsgerichtete Kaliumströme, ähnlich denen, wie sie bei

kultivierten Mikrogliazellen gefunden wurden. Mikrogliazellen aus Fazialiskerngebieten nicht operierter Tiere zeigen hingegen wie ramifizierte Mikroglia aus dem Kortex sehr kleine Leitfähigkeiten. 24 Stunden nach der Läsion weisen Mikrogliazellen einen auswärtsgerichteten Kaliumstrom auf, ähnlich dem bei kultivierten Mikrogliazellen nach einer LPS Aktivierung (Boucsein et al., 2000). In dieser Zeit verändert sich die Morphologie der Zellen, die etwa zwei Tage nach der Läsion eine amöboide Morphologie annehmen. Gleichzeitig kommt es zu einer verstärkten Proliferation, was sich sieben Tage nach Axotomie in einen vier- bis sechsfachen Anstieg der Mikrogliazahl im Nucleus nervi facialis äußert (Blinzinger & Kreutzberg, 1968; Raivich et al., 1994). Eine Woche nach der Fazialisläsion können die MHC Klasse II Antigene auf den Mikrogliazellen nachgewiesen werden, die für die Antigenpräsentation benötigt werden.

Entorhinale Kortexläsion

Die entorhinale Kortexläsion (ECL) ist ein ebenfalls gut etabliertes *in vivo* Modell zur Analyse von postläsionalen Veränderungen im ZNS (Lynch et al., 1975;). Es weist außerdem Parallelen zur Reaktion des menschlichen ZNS auf die Degeneration von Neuronen bei der Alzheimerscher Erkrankung auf (Hyman et al., 1984). Über den entorhinalen Kortex gelangt Information vom Isokortex in die hippocampale Formation. Die Läsion, bei der diese Fasern durchtrennt werden, führt zu einer anterograden Degeneration der Axone im Tractus perforans, das heißt vom neuronalen Zellkörper aus zu den Axonendigungen (Lynch et al., 1975; Jensen et al., 1994). Der Tractus perforans stellt die wichtigste entorhinale Projektion zum Gyrus dentatus dar. Der Gyrus dentatus besteht aus der äußeren, der mittleren und der inneren Molekularschicht sowie dem Hippocampus proper (unterteilt in die Felder CA3, CA2 und CA1) und der Körnerzellschicht (Buzsaki et al., 1995).

Die ECL führt zu einer massiven Degeneration von 80 bis 90 % der Synapsen (Steward & Vinsant, 1983; Fagan & Gage, 1994) und einer schnellen astroglialen und mikroglialen Reaktion in der deafferenzierten äußeren Molekularschicht (OML) des Gyrus dentatus (Gall et al., 1979; Gehrmann et al., 1991; Jensen et al., 1994; Hailer et al., 1999; Bechmann & Nitsch, 2000). Diese Reaktion der Mikroglia beinhaltet morphologische Veränderungen, wie unter anderem das Zurückziehen der Fortsätze. Die Anzahl der Mikrogliazellen in der OML steigt und sinkt in dem hippocampalen Umfeld (Gall et al., 1979; Bechmann & Nitsch, 2000). Dies könnte durch die Wanderung (Migration) von Mikrogliazellen in das

denervierte Gebiet erklärt werden. Andererseits wurde auch die Proliferation von Mikrogliazellen nach Läsion beschrieben (Hailer et al., 1999).

Astrozyten zeigen im Vergleich zur Mikroglia erst später nach einer ECL eine Aktivierung (Gall et al., 1979; Jensen et al., 1994). Die Fortsätze der Astrozyten werden dicker und die Zellen weisen eine gesteigerte Immunreaktivität für „glial fibrillary acidic protein“ (GFAP), dem Astrozyten-spezifischen Intermediärfilament, auf. Diese sogenannte reaktive „Gliose“ von Astrozyten tritt in der OML drei Tage nach dem Eingriff auf und erreicht ihren Höhepunkt vier bis sieben Tage nach der Läsion (Lynch et al., 1975; Rose et al., 1976; Gage et al., 1988; Jensen et al., 1994).

1.2.4 Signale, die zu einer Aktivierung von Mikrogliazellen führen

Ein mögliches Signal, das zur Aktivierung der Mikroglia führt, könnte das Fehlen oder eine zu starke neuronale (synaptische) Aktivität sein. Immunzytochemische Daten deuten darauf hin, daß Mikrogliazellen nach Aktivierung sowohl Glutamatrezeptoren des alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropion Säure (AMPA) Typs, als auch des N-methyl-D-Aspartat (NMDA) Typs exprimieren (Gottlieb & Matute, 1997). Keine dieser Studien zeigte jedoch funktionelle Rezeptoren *in vivo* oder *in situ*; entweder wurden funktionelle Studien an kultivierten Mikrogliazellen durchgeführt oder der nicht-funktionelle, immunzytochemische Nachweis des Rezeptorproteins *in situ* erbracht.

Ein weiteres mögliches Signal, das eine Veränderung der neuronalen Aktivität anzeigt, könnte die extrazellulären Kaliumkonzentration darstellen. Das Membranpotential der Mikrogliazellen wird durch einen einwärts-gleichrichtenden Kaliumkanal dominiert. Dieser Kanal ist für die Mikroglia charakteristisch und macht diese besonders sensitiv für Änderungen der extrazellulären Kaliumkonzentration (Kettenmann et al., 1990, 1993). Die intrazelluläre Kaliumkonzentration in intakten Zellen beträgt ungefähr 150 mM, während im Extrazellulärraum eine Konzentration von etwa 5 mM herrscht. Ein örtlich begrenzter Anstieg von extrazellulärem Kalium kann zum Beispiel durch Zelltod verursacht werden. In einem Modell für „cortical spreading depression“ wurden Hinweise darauf gefunden, daß eine erhöhte extrazelluläre Kaliumkonzentration zur Aktivierung von Mikroglia führen kann (Gehrmann et al., 1993).

Änderungen des extrazellulären pH-Werts könnten ebenfalls ein Aktivierungssignal für die Mikroglia darstellen. Einen sauren pH-Wert findet man zum Beispiel nach globaler Ischämie (Hope et al., 1988) oder im Verlauf einer Hirnhautentzündung (Andersen et al., 1989). Auch Adenosin-5'-triphosphat (ATP) und Adenosin werden bei Zellschädigungen

oder Zelltod frei gesetzt. ATP ist als Kotransmitter in den meisten bisher näher analysierten synaptischen Vesikeln gespeichert. Adenosin entsteht unter anderem durch Dephosphorylierung des freigesetzten ATPs. Kultivierte Mikrogliazellen sowie Mikrogliazellen im akuten Hirnschnitt können über ATP-(P₂)-Purinorezeptoren oder durch Bindung von Adenosin an Adenosin-(P₁)-Rezeptoren aktiviert werden (Walz et al., 1993; Gebicke-Haerter et al., 1996; Boucsein et al., 2000).

Die Komplement-Anaphylotoxine spielen möglicherweise eine Rolle bei der frühen Aktivierung bei bestimmten Krankheitsbildern, wie zum Beispiel der Multiplen Sklerose (MS) oder der Alzheimer Krankheit (Morgan, 1994). β -Amyloid, welches sich während einer Alzheimer Erkrankung in den Plaques ansammelt, aktiviert das Komplement System *in vitro* (Johnson et al., 2002). Mikrogliazellen besitzen den Komplementrezeptor für Komplement 3a (C3a) und Komplement 5a (C5a), die an der Bindung von Komplement opsonierten Partikeln beteiligt sind (Möller et al., 1997).

Zytokine wie Interleukin-1 (IL-1) und Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF α) stellen Schlüsselmediatoren in der Initiation von akuten entzündlichen Reaktionen dar. Messungen der Boten („messenger“-)Ribonukleinsäure (mRNS) und der Zytokinproduktion im ZNS und in isolierten Zellkulturen zeigten, daß die Mehrheit der bekannten Zytokine nicht nur von Lymphozyten und Monozyten, sondern auch von Gliazellen und Neuronen exprimiert und sezerniert werden (Benveniste, 1995). Insbesondere nach Verletzung scheint die Mikroglia die wichtigste Quelle für Zytokine darzustellen. Es konnte gezeigt werden, daß die oben genannten Zytokine außerdem eine breite Wirkung auf die Effekte von der Mikroglia selbst besitzen. Bei Mikrogliazellen in Ratte oder Mensch kommt es nach Stimulation mit IL-1 oder TNF α zu verstärkter Expression von MHC II-Molekülen (Woodrooffe et al., 1989) und Fc-Rezeptoren (Woodrooffe et al., 1989). Fc-Rezeptoren sind, ähnlich wie die Komplementrezeptoren, an der Bindung von Antikörper opsonierten Partikeln beteiligt.

1.3 Chemokine

Weitere Kandidaten für Signalmoleküle, die zur Aktivierung der Mikroglia führen könnte, stellt die Gruppe der Chemokine dar. Chemokine sind kleine chemoattraktive Zytokine mit einem Molekulargewicht von ungefähr 8 bis 14 Kilodalton (kd) (Rollins, 1997; Baggiolini, 1998). Die meisten Chemokine werden unter pathologischen Bedingungen von entzündetem Gewebe produziert und regulieren das migratorische Verhalten und die Aktivierung von Immunzellen (Karpus & Ransohoff, 1998). Durch die Anziehung und

Aktivierung von Leukozyten, die eine zelluläre Invasionen durch pathologische Organismen verhindern, spielen Chemokine normalerweise eine nützliche Rolle in der Abwehr von Infektionen. Ist die Regulation der Chemokinproduktion jedoch gestört, können diese Moleküle Immunzellen dauerhaft aktivieren, und es kann zu einer chronischen Entzündung kommen (Baggiolini, 1998; Luster, 1998).

1.3.1 Familie der Chemokine

Die Familie der Chemokine wird aus mehr als 50 unterschiedlichen Proteinen gebildet (Rollins, 1997; Soto et al., 1998). Die Aminosäuresequenz der Chemokine zwischen verschiedenen Spezies ist homolog. Sie bestehen aus 68 bis 120 Aminosäuren und werden aufgrund der Zahl und der Anordnung der ersten beiden von vier konservierten Cysteinen an dem aminoterminalen Ende in vier strukturelle Gruppen eingeteilt (Rollins, 1997; Luster, 1998) (Abb. 1).

Familie:				
CX3C :	...CXXXCC.....	C.....	C.....
CXC :	...CX__CC.....	C.....	C.....
CC :	...C__C.....	C.....	C.....
C :C	C.....	C.....

Abbildung 1: Strukturelle Klassifikation der Chemokinfamilie anhand der Cysteine in der Sequenz.

In dieser Abbildung steht ein X für eine andere Aminosäure als ein konserviertes Cystein (C). Punkte stellen nicht konservierte Aminosäurepositionen dar. Die Linie kennzeichnet Positionen, wo Aminosäuren in der Sequenz fehlen (Lücken in dem Alignment); das amino- oder carboxyterminale Ende kann in der Länge variieren.

Die CXC oder α Familie, die CC oder β Familie und die CX3C oder δ Familie besitzen vier konservierte Cysteine, hingegen die C-Chemokine oder γ Subfamilie nur zwei (Abb.1). Die CXC-Chemokine besitzen eine nicht konservierte Aminosäure (X) zwischen den ersten beiden Cysteinen. Bei den CC-Chemokinen befinden sich die ersten zwei Cysteine nebeneinander und die C-Chemokine haben zwei der vier konservierten Cysteine verloren.

In der Tabelle 1 sind die Mitglieder der vier Chemokinfamilien nach der neuen Nomenklatur sowie in Klammern die zuvor verwendeten Namen aufgelistet. Weiterhin sind die Rezeptoren aufgeführt, an denen die Chemokine binden.

Tabelle 1: Klassifizierung der Chemokine und ihrer Rezeptoren.

Chemokine	Rezeptor	Chemokine	Rezeptor
CXC oder α Familie		CC oder β Familie	
CXCL1 (GRO α)	CXCR2, CXCR1	CCL13 (MCP4)	CCR1, CCR2, CCR3, CCR9, CXCR3
CXCL2 (GRO β (MIP2 α))	CXCR2	CCL14 (HCC1)	CCR9
CXCL3 (GRO γ (MIP2 β))	CXCR2	CCL15 (HCC2/MIP5/Lknl)	CCR1, CCR3
CXCL5 (ENA78)	CXCR2	CCL16 (HCC4/LEC)	unbekannt
CXCL6 (GCP2)	CXCR1, CXCR2	CCL17 (TARC)	CCR4
CXCL7 (PBP)	CXCR2	CCL18 (DC-CK-1/PARC)	unbekannt
CXCL8 (IL-8)	CXCR1, CXCR2	CCL19	
CXCL4 (PF4)	unbekannt	(MIP3 β /ELC/exodus3)	CCR7
CXCL9 (Mig)	CXCR3	CCL20	
CXCL10 (IP10)	CXCR3	(MIP3 α /LARC/exodus1)	CCR6
CXCL11 (I-TAC)	CXCR3	CCL21	
CXCL12 (SDF1 α/β , PBSF)	CXCR4	(6Ckine/SLC/exodus2/TCA4)	CCR7, CXCR3
CXCL13 (BCA-1/BLC)	CXCR5	CCL22 (MDC/STCP1)	CCR4
CXCL14 (BRAK)	unbekannt	CCL23 (MPIFI (CK β 8))	CCR1
CC oder β Familie		CCL24 (Eotaxin2/MPIF2)	CCR3
CCL1 (I-309)	CCR8	CCL25 (TECK)	CCR9
CCL2 (MCP1)	CCR2	CCL26 (Eotaxin-3)	CCR3
CCL3 (MIPI α)	CCR1, CCR5, CCR9	CCL27 (ILC)	CCR10
CCL4 (MIPI β)	CCR1, CCR5, CCR9	C oder γ Familie	
CCL5 (RANTES)	CCR1, CCR3, CCR4, CCR5	XCL1	
CCL6 (C10, MRP-1)	unbekannt	(Lymphotactin α /SCM1 α)	XCR1
CCL7 (MCP-3)	CCR1, CCR2, CCR3	XCL2	
CCL8 (MCP2)	CCR1, CCR2, CCR3, CCR9	(Lymphotactin β /SCM1 β)	XCR1
CCL9 (MRP-2, MIP-1 γ)	unbekannt	CXXXC oder δ Familie	
CCL10	unbekannt	CX3CL1	
CCL11 (Eotaxin)	CCR3, CCR9, CXCR3	(Fractalkine/Neurotactin)	CX3CR1
CCL12 (MCP5)	CCR2		

XCL stellt zur Zeit das einzige bekannte C-Chemokin dar (Kelner et al., 1994). Einzigartig für Chemokine kommt das CX3CL1 Chemokin sowohl in löslicher als auch in membrangebundener Form vor (Bazan et al., 1997; Pan et al., 1997).

Chemokine werden entweder konstitutiv, das heißt permanent, oder induziert produziert (Mantovani, 1999). In Lymphorganen werden konstitutiv Chemokine exprimiert und kontrollieren dort möglicherweise die Wanderung von Zellen unter physiologischen Bedingungen (Mantovani, 1999). Induzierbare Chemokine werden als Antwort auf mikrobielle, entzündliche oder andere Signalen des Immunsystems synthetisiert und bewirken die Anlockung von Immunzellen. Die Unterscheidung zwischen konstitutiven und induzierbaren Chemokinen ist hilfreich, jedoch nur schematisch. So gibt es konstitutiv exprimierte Chemokine, die unter pathologischen Bedingungen auch induziert werden können und somit in beiden Gruppen auftreten müßten.

1.3.2 Chemokinrezeptoren

Chemokine vermitteln ihre biologischen Effekte durch die Interaktion mit spezifischen Rezeptoren auf der Zelloberfläche (Rollins, 1997; Murphy et al., 2000). Chemokinrezeptoren sind durch eine heptahelikale Struktur charakterisiert, die an Guanosin-triphosphat (GTP)-bindende Proteinen (G-Proteine) gekoppelt sind (Dohlman et al., 1991). Die Nomenklatur der Chemokinrezeptoren entspricht der Nomenklatur der Chemokine (Tabelle 1). Rezeptoren, die CXC-Chemokine binden, werden als CXC-Rezeptoren (CXCR) bezeichnet und die CC-Chemokine binden als CC-Rezeptoren (CCR). Bisher sind 16 verschiedene Chemokinrezeptoren kloniert: fünf CXCR (CXCR1-CXCR5), zehn CCR (CCR1-CCR10) und ein CX3CR (CX3CR1) (Luster, 1998; Murphy et al., 2000). Während die Transmembrandomänen und die zweite und dritte intrazelluläre/zytoplasmatische Domäne der Chemokinrezeptoren konserviert sind, variieren die Aminosäuresequenzen der amino- und carboxyterminalen Enden. Generell wird die Bindungsspezifität der Liganden durch die Sequenz des freien Aminosäure-Endes in Kombination mit der Sequenz der extrazellulären Domäne definiert. Das intrazelluläre carboxyterminale Ende dieser Rezeptoren ist reich an Serin und Threonin-Aminosäuren, die möglicherweise wichtig für eine Phosphorylierung und Kopplung über G-Proteine sind (Murphy et al., 2000). Die strukturelle Konformation und Aminosäuresequenz der intrazellulären Loops entscheidet die Spezifität der G-Protein Kopplung (Damaj et al., 1996). Viele Chemokinrezeptoren sind an $G_{\alpha i}$ Proteine gekoppelt, da die meisten biologischen Funktionen der Chemokine durch Pertussis Toxin blockiert werden können (Rollins, 1997; Luster, 1998). Einige biologische Funktionen können jedoch nicht mit Pertussis Toxin unterdrückt werden, und somit dürften weitere G Proteine in der Signaltransduktionskaskade eine Rolle spielen.

1.3.3 Chemokine und ihre Rezeptoren sind redundant

Kein Chemokin vermittelt eine einzige Wirkung auf eine bestimmte Population von Zellen. Ein Chemokin kann an verschiedene Chemokinrezeptoren binden und Chemokinrezeptoren können verschiedene Chemokine binden (siehe Tabelle 1). Zum Beispiel binden die Chemokine CCL2, CCL7, CCL8, CCL12 und CCL13 alle an den CC-Rezeptor-2, jedoch können die Chemokine CCL7, CCL8 und CCL13 auch an andere Chemokinrezeptoren (CCR1 und CCR3) binden. Bindet ein Chemokinrezeptor unterschiedliche Chemokine, so gehören diese Chemokine in der Regel in die selbe Chemokingruppe. Bisher ist nur ein Chemokinrezeptor (CXCR3) beschrieben, der Chemokine sowohl aus der CXC- wie auch der CC-Chemokinfamilie binden kann (Soto et al., 1998).

Die meisten Zellen exprimieren verschiedene Rezeptoren für Chemokine. Ist ein Ligand oder Rezeptor nicht funktionell, können alternative Chemokine oder Rezeptoren die biologische Funktion übernehmen. Zum Beispiel gibt es acht verschiedene CXC-Chemokine, die an den CXC-Rezeptor 2 binden und ihn aktivieren können. Ist der CXCR2 nicht funktionell, können Granulozyten über die Aktivierung des CXCR1 durch CXCL8 oder CXCL6 angelockt werden. Diese Kombinationsvielfalt an Chemokinen und Rezeptoren macht das Chemokinsystem sehr robust gegenüber Ausfällen. Dies konnte durch verschiedene Knockout Mäuse, die entweder ein Chemokin nicht mehr produzieren oder Chemokinrezeptoren nicht exprimieren können, bestätigt werden (Mantovani, 1999). Diese Knockout Mäuse zeigen nur geringe Veränderungen bezüglich Entwicklung und Überleben.

Ein weiteres Beispiel für diese Redundanz wurde bei dem Chemokinrezeptor vermittelten HIV Eintritt gefunden. Verschiedene Chemokine (CCL3, CCL4, CCL5, CCL8) können durch Bindung an den CCR5 den Eintritt des M-tropischen Stranges von HIV in Zellen verhindern (Cocchi et al., 1995; Pal et al., 1997). Der Verlust an CCR5 scheint eine Resistenz gegenüber HIV-Infektionen zu verleihen (Dean et al., 1996, Liu et al., 1996). Durch die Strukturähnlichkeit der CC-Rezeptoren konnten weitere Chemokinrezeptoren wie CCR2, CCR3 und CCR8 gefunden werden, die ebenfalls Korezeptoren für den HIV Eintritt darstellen (Cairns & D'Souza, 1998). Das kompensatorische Eingreifen von Chemokinen und ihren Rezeptoren konnte in der Klinik an Patienten gezeigt werden, welche trotz eines CCR5 Defektes keine angeborenen Immunstörungen aufwiesen (Dean et al., 1996).

1.3.4 Kontrolle über das Chemokinsystem

Aufgrund der Redundanz der Chemokine und Ihrer Rezeptoren muß die Verfügbarkeit beider Faktoren in diesem System reguliert sein, um spezifische Reaktionen zu gewährleisten. Dies kann durch unterschiedliche Wege ermöglicht werden: 1) Chemokin/Rezeptor Verfügbarkeit, 2) dynamische Interaktion zwischen Ligand und Rezeptor auf der Zelloberfläche und 3) Signaltransduktion.

1) Chemokin/Rezeptor Verfügbarkeit: Es ist bekannt, daß während der Differenzierung von Leukozyten oder Epithelzellen je nach Stadium die Expression von Chemokinen und Chemokinrezeptoren variiert, um programmierte Antworten auf spezifische Chemokine zu ermöglichen (Murphy et al., 2000). Mononukleäre Zellen können fast alle Chemokine produzieren, jedoch ist die zelluläre Expression der Chemokinrezeptoren stark variabel und diktiert die zellulären Antworten (Murphy et al., 2000). Beide Beispiele zeigen, daß bereits über die Chemokin/Rezeptor Verfügbarkeit eine Regulation der Wirkung von Chemokinen stattfindet.

2) Dynamische Interaktion zwischen Ligand und Rezeptor auf der Zelloberfläche: Auch wenn zwei Chemokinrezeptoren mit ähnlicher Ligandenbindung auf derselben Zelle vorhanden sind, treten in der Regel Unterschiede in der Bindungsaffinität der Liganden für diese Rezeptoren auf (Devalaraja & Richmond, 1999). Weiterhin kann ein Rezeptor durch Bindung des Liganden degradiert werden, während ein anderer Rezeptor nach der Internalisierung wieder auf der Zelloberfläche präsentiert werden kann und so ein zweites Mal fähig ist, den Liganden zu binden (Devalaraja & Richmond, 1999). Diese unterschiedliche Aktivierung entspricht einer feinen Abstimmung und erlaubt eine schnelle und anhaltende Antwort auf Chemokine.

3) Signaltransduktion: Die Interaktion eines Chemokins mit seinem Rezeptor kann zu dem Austausch von GTP mit Guanosindiphosphat (GDP) führen und zur Ablösung der α Untereinheit von der $\beta\gamma$ Untereinheit des G-Proteins. Die freien α - und $\beta\gamma$ -Untereinheiten können unterschiedliche intrazelluläre Signalwege aktivieren wie zum Beispiel den zyklischen Adenosinmonophosphat/Proteinkinase A-Weg, den Mikrotubuli-assoziierte Proteinkinase Weg (MAP), den Phosphatidylinositol/Kalzium/Proteinkinase C-Weg und den C-Jun-N-terminale Kinase-Weg (JNK) (Hamm, 1998; Shyamala & Khoja, 1998). Es gibt weiterhin auch noch Evidenzen für eine gegenseitige Beeinflussung („cross-talk“) zwischen diesen Wegen (Xia et al., 1995). Die MAP Kinasen sind eine Familie von Serine-Threonin Kinasen, die hauptsächlich proliferative und mitogene Antworten vermitteln (Shyamala & Khoja, 1998).

1.3.5 Chemokine im ZNS

Wie auch im peripherem Immunsystem werden Chemokine im gesunden und im erkrankten ZNS produziert (Ransohoff et al., 1993; Asensio & Campbell, 1999; Bacon & Harrison, 2000). Bei verschiedenen neurologischen oder neuroinflammatorischen Erkrankungen, wie MS und dem erworbenen Immundefizienz Syndrom („Acquired immunodeficiency syndrome“, AIDS), in Gehirntumoren, sowie nach Schlaganfall und Gehirntrauma, konnte die Expression von Chemokinen und ihren Rezeptoren nachgewiesen werden (Luster, 1998). Chemokine besitzen im ZNS ähnliche Funktionen wie im peripheren Immunsystem, wie zum Beispiel die Kontrolle der Einwanderung von Blutleukozyten in das ZNS (Mennicken et al., 1999; Wu et al., 2000).

Fast alle intrinsischen Zellen des ZNS, wie zum Beispiel Neurone, Endothelzellen, Astrozyten und Mikrogliazellen, sind in der Lage Chemokine zu produzieren, wobei Astrozyten und Mikroglia die meisten Chemokine der unterschiedlichen Gruppen synthetisieren (Mennicken et al., 1999). Weiterhin exprimieren diese Zellen Chemokinrezeptoren der verschiedenen Gruppen und können so auf Chemokine in ihrem Milieu reagieren.

Die erste Linie der Immunabwehr im ZNS stellt die sogenannte Blut-Hirn-Schranke dar, welche aus Endothelzellen und den Astrozytenendfüßen gebildet wird. Einmal durch inflammatorische Zytokine aktiviert, produzieren Endothelzellen und Astrozyten eine Reihe von Chemokinen. Die Stimulation kultivierter Endothelzellen mit den Zytokinen IL-1 α , IL-1 β , TNF- α oder IL-4 führt zur Expression der Chemokine CCL2 und CCL3 (Garcia-Zepeda et al., 1996). IL-1 induziert die Synthese von CCL3 und CCL5 (Chuluyan et al., 1995). Weiterhin produzieren Endothelzellen nach Stimulation mit dem Zytokin Interferon- γ die CXC-Chemokine CXCL10 und CXCL9 (Piali et al., 1998). Die ausgeschütteten Chemokine unterstützen die Einwanderung von primären Immunzellen wie T Lymphozyten, Monozyten und Neutrophilen durch die Blut-Hirn-Schranke in das ZNS. Eine intra-hippocampale Injektion von humanen rekombinanten Chemokinen in eine Maus bestätigte die Rolle von Chemokinen bei der Leukozyten Migration ins Gehirngewebe: CCL2, CXCL10 und CCL5 wirken anlockend auf Monozyten (Bell et al., 1996), CXCL8 und CXCL2 auf polymorphkernigen Leukozyten, was mit dem Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke bei einer Inflammation verbunden ist (Bell et al., 1996). Neben diesen Chemokinen exprimieren Endothelzellen auch verschiedene

Chemokinrezeptoren wie DARC (Horuk et al., 1997), CXCR4 (Lavi et al., 1997) und CCR5 (Rottman et al., 1997).

Astrozyten produzieren unter anderem die Chemokine CXCL8 (Aloisi et al., 1992), CCL5 (Barnes et al., 1996) und CCL2 (Ransohoff et al., 1993) als Antwort auf eine Stimulation mit den Zytokinen IL-1 oder TNF- α . Es wird spekuliert, daß die Expression von Chemokinen eine Komponente in dem Programm der Astrozytenaktivierung darstellt. In einem Demyelinisierungsmodell der Maus produzieren Astrozyten CXCL10 („interferon-inducible protein“, IP-10), welches ein potentes T-Zellen chemoattraktives Chemokin darstellt (Lane et al., 1998). Nach einer fokalen oder globalen Ischämie wird CCL2 anfänglich von Astrozyten in der Umgebung des ischämischen Gewebes exprimiert und später ebenfalls von eingewanderten Makrophagen und von aktivierten Mikrogliazellen produziert (Gourmala et al., 1997). Auch CCL2 führt zur Infiltration von Leukozyten. Astrozyten besitzen eine Reihe von Chemokinrezeptoren, wie CCR1 (Tanabe et al., 1997a) und CXCR4 (Tanabe et al., 1997b), deren Aktivierung zur Migration von Astrozyten führt.

Daß Chemokine und ihre Rezeptoren nicht nur eine Rolle unter pathologischen, sondern auch unter physiologischen Bedingungen spielen, wird besonders deutlich am Beispiel der Neurone (Asensio & Campbell, 1999; Bacon & Harrison, 2000). Werden hippocampale Neurone mit 1 μ g/ml CXCL8 behandelt, so findet man eine 200% bessere Überlebensrate im Vergleich zu unbehandelten Neuronenkulturen (Araujo & Cotman, 1993). Weiterhin gibt es Hinweise darauf, daß Chemokine und ihre Rezeptoren auch in der Entwicklung des ZNS Funktionen besitzen: Gentsch veränderte Mäuse, die entweder das Chemokin CXCL12 (Ma et al., 1998; Nagasawa et al., 1996) oder dessen Rezeptor CXCR4 (Ma et al., 1998; Zou et al., 1998) nicht exprimieren, sterben kurz nach der Geburt und zeigen im Vergleich zu Wildtyp Mäusen eine veränderte Entwicklung des Kleinhirns. Der Ligand CXCL12 wird vor allem von Astrozyten produziert und CXCR4 von Neuronen, wobei die Expression des Rezeptors jedoch im adulten Gehirn kaum nachweisbar ist.

Das Chemokin CX3CL1 und dessen Rezeptor CX3CR1 wird im ZNS stärker exprimiert, als im Immunsystem oder in der Peripherie (Bazan et al., 1997). Während CX3CL1 in der Maus von Mikrogliazellen produziert wird (Pan et al., 1997), gelten in Ratte (Harrison et al., 1998), Affe und Mensch (Schwaeble et al., 1998) Neurone als die Quelle dieses Chemokins, während in diesen Spezies Mikrogliazellen den Rezeptor für CX3CL1 exprimieren (Pan et al., 1997; Harrison et al., 1998). Es ist bekannt, daß CX3CL1 die

Migration von Mikrogliazellen stimuliert, was man durch anti-CX3CL1 Antikörper blockieren konnte (Harrison et al., 1998). Diese Ergebnisse zusammen mit der Beobachtung, daß nach einer Rückenmarksverletzung die Expression von CX3CL1 erhöht ist, lassen vermuten, daß CX3CL1 eine Rolle in der Zell-Zell Interaktion zwischen Neuronen und Mikrogliazellen spielt.

Chemokine besitzen eine chemotaktische Wirkung auf kultivierte Mikrogliazellen (Peterson et al., 1997). Dies könnte bedeuten, daß Chemokine wichtig für die frühe Anlockung von der Mikroglia zum Ort der Verletzung oder Entzündung sind. Eine HIV-Infektion des Gehirns durch zirkulierende HIV-infizierte Immunzellen wird hauptsächlich durch die Interaktion mit und durch die Infektion von Mikrogliazellen ermöglicht. Immunhistochemische Färbungen von humanen Gehirnschnitten (Lavi et al., 1997) zeigten eine Färbung für den T-Zell vermittelten HIV („T-tropic“) Korezeptor CXCR4 auf Mikrogliazellen. Die Makrophagen-vermittelte („M-tropic“) HIV-Infektion verwendet die Korezeptoren CCR3 und CCR5, die ebenfalls auf fötalen Mikrogliazellen gefunden worden sind (He et al., 1997).

Chemokine locken aber nicht nur Mikrogliazellen an, sondern Mikrogliazellen selbst produzieren eine Reihe von Chemokinen. Mikrogliazellen, die aus dem Kortex von HIV-Patienten isoliert wurden, produzieren zum Beispiel die Chemokine CCL3 und CCL4 (Schmidtmayerova et al., 1996). Diese Chemokine können wiederum attraktiv auf Leukozyten oder Astrozyten wirken.

1.3.6 CCL21

CCL21 (Synonyme: SLC, TCA4, 6CKine oder Exodus-2) besitzt neben den für die CC-Chemokine charakteristischen vier Cysteinen zwei weitere (Hedrick & Zlotnik, 1997). Die Sequenzen von CCL21 in der Maus und im Menschen sind hoch konserviert (Hedrick & Zlotnik, 1997). CCL21 wird konstitutiv in sekundären Lymphorganen, wie den Lymphknoten und der Milz exprimiert (Hedrick & Zlotnik, 1997; Hromas et al., 1997; Gunn et al., 1998), die wichtigsten Stellen für die Aktivierung von Lymphozyten. Es kontrolliert die Wanderung von naiven T-, B- und dendritischen Zellen in deren jeweiligen Zonen der sekundären Lymphorgane (Gunn et al., 1998; Gunn et al., 1999; Sallusto et al., 1999). Die gezielte genetische Ausschaltung von CCL21 oder dem korrespondierenden Rezeptor CCR7 resultiert in starken Defiziten dieser Migrationsfähigkeit und in einer

morphologischen Veränderung der Architektur von sekundären Lymphorganen (Gunn et al., 1998; Yoshida et al., 1998; Forster et al., 1999; Gunn et al., 1999).

CCL21 wurde zuerst als Ligand für den CC-Rezeptor-7 identifiziert. Soto und Mitarbeiter zeigten darüber hinaus die Affinität von CCL21 zu dem CXC-Rezeptor-3 (Soto et al., 1998). Sie klonierten und charakterisierten den homologen CXCR3 Rezeptor in der Maus (mCXCR3), und testeten eine große Anzahl von Chemokinen (CXCL1, CXCL8, CXCL9, CXCL10, CCL1, CCL16, CCL17, CCL18, CCL19, CCL20, CCL21, CCL22, CCL24, CCL25) auf die Fähigkeit, einen Anstieg in der intrazellulären Kalziumkonzentration in CXCR3-transfizierten Mauszellen auszulösen. Lediglich CXCL9, CXCL10 und CCL21 riefen diesen hervor. Dadurch konnte ein neuer Ligand für diesen Rezeptor, das jüngst beschriebene CC-Chemokin CCL21, identifiziert werden (Hedrick & Zlotnik, 1997; Soto et al., 1998). Es wurde erstmals gezeigt, daß ein CC-Chemokin spezifisch an einen CXC-Rezeptor binden kann (Soto et al., 1998). Weiterhin konnte demonstriert werden, daß CCL21 ein Ligand für CCR7 darstellt (Campbell et al., 1998; Yoshida et al., 1998). Wie andere Liganden dieses Rezeptors besitzt CCL21 angiostatische Eigenschaften (Soto et al., 1998). Desensitivierungsexperimente ergaben, daß CXCL9 und CXCL10 (bekannte Liganden des CXCR3 Rezeptors) die Antwort auf CCL21 aufheben (Loetscher et al., 1996; Soto et al., 1998). Aus diesen Daten ergibt sich, daß die Affinität von CXCL9 für CXCR3 am Höchsten und für CXCL10 und CCL21 geringer ist. Interessanter Weise bewirkt humanes CCL21 in transfizierten Zellen der Maus und des Menschen keinen Anstieg in der intrazellulären Kalziumkonzentration (Jenh et al., 1999). Maus-CCL21 konnte in humanen CXCR3 transfizierten Zellen eine schwache Änderung in der intrazellulären Kalziumkonzentration verursachen. CCL21 scheint ein Beispiel für ein Chemokin zu sein, dessen Rezeptoreigenschaften spezifisch für Spezies sind, das heißt, Maus CCL21 kann an CCR7 und CXCR3 binden, humanes CCL21 jedoch bindet nur an CCR7. Da CCL21 von Maus und Mensch auf dem Aminosäureniveau zu 70% identisch sind, könnten die Unterschiede zwischen den Spezies durch die variierenden Bereiche in der Peptidsequenz erklärt werden (Hedrick & Zlotnik, 1997; Hromas et al., 1997). Möglicherweise ist die Rezeptorbindungsdomäne der beiden Spezies unterschiedlich. Im Gegensatz dazu ist das CXCR3 Protein von Maus und Mensch zu 86% identisch, wobei man die meisten Unterschiede am Aminoterminus findet (Soto et al., 1998).

Biber und Mitarbeiter (2001) konnten zeigen, daß verletzte Neurone *in vitro* und *in vivo* den CXCR3 Liganden CCL21 produzieren. Bereits sechs Stunden nach Verschließung der mittleren cerebralen Arterie („middle cerebral arterial occlusion“, MCAO) konnte CCL21

nachgewiesen werden. Diese Expression hält weitere 96 Stunden an. Durch die Kombination einer *in situ* Hybridisierung mit einer immunhistochemischen Färbung von Neurofilament konnte gezeigt werden, daß CCL21 in Neuronen des Kortex vorhanden ist. Wurden die Schnitte mit einem Antikörper für den Astrozyten-Marker GFAP gefärbt, konnte keine Kolo-kalisierung festgestellt werden.

Nach unterschiedlichen Behandlungen, die einen neuronalen Zelltod verursachen, konnte in kultivierten Neuronen CCL21 mRNA gefunden werden, jedoch nicht in Astrozyten- oder Mikroglia-kulturen (Biber et al., 2001). Da CCL21 aber intrazelluläre Kalziumsignale und eine chemotaktische Reaktion in kultivierten Mikrogliazellen hervorruft, wurde für CCL21 eine Rolle von CCL21 im Neuronen-Mikroglia Kommunikationssystem vermutet. Da die mRNA von dem CXCR3-Rezeptor-3 in Mikrogliazellen nachgewiesen wurde, jedoch nicht die mRNA für den CXCR3-Rezeptor-7, liegt die Vermutung nahe, daß die mikrogliale Reaktion durch den CXCR3 vermittelt wird. Diese Annahmen konnten durch Desensibilisierungs Experimente mit CCL21 und dem korrespondierenden CXCR3 Liganden CXCL10 verstärkt werden.

Diese Ergebnisse zeigen, daß CCL21 möglicherweise ein spezifisches Signalmolekül darstellt, welches der Mikroglia eine neuronale Schädigung mitteilt. Ob dieses Signal auch zur Aktivierung der Mikroglia führt, und somit eventuell die Phagozytose der verletzten Neurone induziert, kann bisher nicht beantwortet werden.

1.4 Darstellung der Ziele

Mikroglia, die Makrophagen des Gehirns, werden während akuter sowie chronischer Gehirnerkrankungen aktiviert. Welche Signale dabei zur mikroglialen Aktivierung führen, ist im einzelnen bisher nicht bekannt, jedoch werden die Chemokine als mögliche Signalmoleküle diskutiert. In der vorliegenden Arbeit sollte die Rolle des Chemokins CCL21 und dessen Rezeptoren bei der mikroglialen Aktivierung untersucht werden. Folgende spezifischen Fragenkomplexe wurden in der vorliegenden Arbeit behandelt:

1) *Besitzen Mikroglia funktionelle Rezeptoren für das Chemokin CCL21?* In der Literatur ist beschrieben, dass CCL21 an die Rezeptoren CCR7 und CXCR3 binden kann. Ob Mikrogliazellen Rezeptoren für CCL21 besitzen, sollte anhand von elektrophysiologischen Experimenten an Mikrogliazellen in Kultur und im akuten Hirnschnitt untersucht werden. Mit Hilfe der mir zur Verfügung stehenden Rezeptor-Knockout-Mauslinien sollte der Einfluß von CCR7 oder CXCR3 an der möglichen CCL21 induzierten elektrophysiologischen Antwort untersucht werden.

2) *Werden typische Parameter der Mikrogliaaktivierung durch CCL21 beeinflusst?* Aktivierte Mikrogliazellen besitzen die Fähigkeit, zytotoxische Substanzen wie Stickstoffmonoxid und proinflammatorische Zytokine wie IL-6 oder TNF- α zu produzieren, und sie zeigen im Gegensatz zu ruhenden Zellen eine erhöhte Zellteilungsrate sowie migratorische Eigenschaften. Die Wirkung von CCL21 auf die Produktion von Stickstoffmonoxid sollte mittels Nitritnachweis mit Griess Reagenz untersucht werden. Eine veränderte Zytokinproduktion oder Zellteilung sollte mittels „Enzym-Linked-Immuno-Sorbent-Assay“ (ELISA) gezeigt werden. Die Untersuchung der Mikroglia-Migration nach CCL21 Stimulation sollte mit Hilfe eines Mikrochemotaxisassay erfolgen.

3) *Sind CCL21 und dessen Rezeptoren in pathologische Prozesse im ZNS involviert?* Zur Beantwortung dieser Frage sollten zwei tierexperimentelle Modelle verwendet werden, die Nervus facialis Axotomie und die entorhinale Kortexläsion. Eventuelle Veränderungen der Mikroglia in Kontrollmäusen sollten mit denen in Rezeptor-Knockout Mäusen anhand von immuno-histochemischen Experimenten verglichen werden. Ebenso sollten neuronale degenerative und regenerative Prozesse in diesen Modellen mittels Immunhistochemie überprüft werden.