

5 DISKUSSION

5.1 CG – 4 – Zellkultur

Die CG – 4 – Zellreihe wurde entsprechend der von Louis (Louis et al. 1992a) beschriebenen Zellreihe kultiviert. CG – 4 – Zellen sind zwar relativ stabile und wenig anfällige Zellen, werden aber mit zunehmender Anzahl der Passagennummer älter und können morphologisch schon das Vorläuferstadium verlassen. Dies läßt sich auch anhand von Färbungen mit den Oligodendro – zytenmarkern A₂B₅ und GalC feststellen.

Uns lagen CG – 4 – Zellen mit einem Alter von 51 Passagen vor. In diesem Stadium sind die Zellen bipolar und lassen sich von A₂B₅ – Antikörpern, nicht aber von GalC – Antikörpern anfärben. Dies kennzeichnet ein unreifes Stadium, vergleichbar mit dem Reifestadium der OPC. Die Zellen wurden auch weiterpassagiert und für die Studien eingesetzt, allerdings nur solange keine morphologischen Veränderungen auftraten, die das Ergebnis der Rezeptorquantifizierung eventuell beeinflusst hätten. Diese zeigten sich erst ab Passage 65 – 70. So konnte sichergestellt werden, dass die CG – 4 – Zellen, die verwendet wurden, alle die gleichen Eigenschaften aufwiesen. Es wurden bei wenigen Passagen der reifen CG – 4 – Zellen, welche in N₂B₃ – Medium kultiviert worden waren, Umwandlungen zu Astrozyten – Typ – 2 festgestellt. Diese Passagen wurden mit GFAP – Primer kontrolliert, um falsch – positive Ergebnisse durch Astrozyten zu vermeiden.

5.2 Methodik zum Nachweis der Chemokinrezeptoren

5.2.1 Molekulare Ebene

In diesem Teil der Arbeit wurden CG – 4 – Zellen lysiert und die mRNA wurde extrahiert. Über Polymerasekettenreaktion (PCR) und DNA – Sequenzierung konnten verschiedene Chemokinrezeptoren nachgewiesen werden.

Einen zentralen Arbeitsschritt zum Nachweis der Rezeptoren durch molekularbiologische Analyse stellte die mRNA – Isolierung dar. Diese Methode ist insofern von besonderer Bedeutung, da hier die für alle weiteren Arbeitsschritte essentielle mRNA aus den CG – 4 –

Zellen extrahiert wird. Um Verunreinigungen zu vermeiden, wurde vor jeder Reaktion mit der Reversen Transkriptase eine Probe entnommen, welche als sogenannte Negativkontrolle im nächsten Arbeitsschritt (PCR) ein negatives Ergebnis darstellen sollte, um damit die Reinheit der CG – 4 – Zell – mRNA zu bestätigen. Als Primer bedienten wir uns des β – Actin, welches als so genanntes „house – keeping – gene“ verwendet wurde.

So konnte sichergestellt werden, dass nur CG – 4 – Zellen auf Chemokinrezeptoren untersucht wurden. Da aufgrund der Methodik keine statistisch relevanten Daten erhoben werden konnten, wurden die Ergebnisse dreimal verifiziert und anschließend als positiv gewertet.

5.2.2 Proteinebene

Eine weitere Möglichkeit, Chemokinrezeptoren auf CG – 4 – Zellen nachzuweisen, stellte die Immunfluoreszenzfärbung dar. Es existiert nicht für jeden Rezeptor ein Antikörper, weshalb wir nur die CCR1, CCR3, CXCR2, CXCR4 (Fusin) und CX3CR1 untersuchen konnten.

Die spezifische Anfärbbarkeit wurde ebenfalls durch eine Negativkontrolle gesichert, welche nur mit dem fluoreszierenden Sekundärantikörper behandelt wurde. Somit hatte der Sekundärantikörper keinen spezifischen Rezeptor wie den Primärantikörper, und eine unspezifische Bindung des Sekundärantikörpers konnte kontrolliert werden.

Leider gelang die Färbung mit dem Fusinantikörper nicht, die Negativkontrolle zeigte positive Ergebnisse, was für eine unspezifische Bindung des Sekundärantikörpers spricht. Änderungen der Inkubationszeiten mit dem Sekundärantikörper, Änderungen der Fixationsmethodik oder intensiveres Waschen der zu färbenden Zellen nach Behandlung mit dem Sekundärantikörper konnten das positive Ergebnis der Negativkontrolle nicht beeinflussen.

5.3 Expression von Chemokinrezeptoren

Im Laufe des letzten Jahrzehnts wurde intensiv an der Entdeckung von Chemokinen, ihren Eigenschaften und ihrer klinischen Relevanz geforscht. Sehr schnell nach ihrer Entdeckung wurden diese Signalmoleküle klassifiziert und ihre Anzahl wuchs sehr rasch. Entsprechend schnell forschte man auch an den dazugehörigen Rezeptoren und stellte fest, dass sehr viele Zellen des menschlichen Körpers, vorzugsweise Immunzellen, Chemokinrezeptoren besitzen und über Chemokine Informationen austauschen.

Wir untersuchten die Expression von Chemokinrezeptoren auf Oligodendrozytenvorläuferzellen anhand der Zellreihe CG – 4. Darüber hinaus forschten wir nach Unterschieden in der Expression von Chemokinrezeptoren während der Differenzierung durch Vergleich von jungen, unreifen CG – 4 – Zellen mit älteren, multipolaren und reiferen CG – 4 – Zellen.

Dass Oligodendrozytenvorläuferzellen Chemokinrezeptoren exprimieren, konnten schon Nguyen und Stangel 2001 (CXCR1 und CXCR2), sowie Tsai 2002 (CXCR2) nachweisen.

Neben diesen schon bekannten Ergebnissen waren die Zellen positiv für CCR1, CCR3, CCR7, CXCR4 und CX3CR1. Als einziger Unterschied zwischen reiferen und unreifen Zellen zeigte sich eine fehlende Expression von CXCR1 bei reiferen CG – 4 – Zellen.

Nun stellt sich die Frage, wie relevant diese Ergebnisse vor dem Hintergrund der Tatsache sind, dass lediglich mit einer in – vitro erzeugten Zelllinie gearbeitet wurde. Dazu wurde in unserer Arbeitsgruppe ein ähnlicher Versuchsaufbau mit postnatal frisch gewonnenen OPC aus der Sprague – Dawley – Ratte durchgeführt.

Anhand von noch nicht veröffentlichten Ergebnissen von Franziska Zobel (Klinikum Benjamin Franklin, Freie Universität Berlin, Abt. Neurologie) konnten die Expressionsmuster verglichen werden. So exprimieren diese OPC die Chemokinrezeptoren CCR3, CCR7, CCR10, CXCR2, CXCR4, CX3CR1. Aus diesen Daten ist ersichtlich, dass CG – 4 – Zellen sich in der Expression von drei Rezeptoren, nämlich CCR1, CXCR1 und CCR10 von den OPC unterscheiden. Es gibt Übereinstimmungen in den fünf Rezeptoren CCR3, CCR7, CXCR2, CXCR4 und CX3CR1. Diese Ergebnisse bestätigen die CG – 4 – Zellreihe als ein Modell, welches zur Untersuchung von Oligodendrozytenvorläuferzellen im Hinblick auf Chemokinrezeptoren zumindest teilweise geeignet ist. Dies ist für weitere Untersuchungen von großer Bedeutung, da die Handhabung der Zelllinie wesentlich einfacher ist im Vergleich zum Umgang mit Primärzellen.

5.4. Relevanz von Chemokinrezeptoren auf Oligodendrozytenvorläuferzellen vor dem Hintergrund der erzielten Ergebnisse

Proliferation, Migration und Differenzierung sind die essentiellen Schritte in der Entstehung von Myelin durch OPC. Doch der exakte Mechanismus, auf welche Weise OPC zu den Axonen geleitet werden und diese myelinisieren, ist noch nicht vollständig erschlossen. Verschiedene Moleküle scheinen auf diesen Prozess Einfluss zu nehmen, wie z.B. Wachstumsfaktoren, Integrine oder extrazelluläre Matrixproteine (Decker et al. 2000; Milner et al. 1996; Spassky 2001). Auch Chemokine können auf OPC wirken.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass CG – 4 – Zellen die Chemokinrezeptoren CCR1, CCR3, CCR7, CXCR1, CXCR2, CXCR4 und CX3CR1 exprimieren. Auf welche Weise diese Rezeptoren die Myelinisierung beeinflussen könnten, ist derzeit noch unklar. Über Aktivierung oder Blockierung der Rezeptoren durch die Liganden ist feststellbar, ob über diese Rezeptoren eine Regulierung der Myelinisierung vermittelt wird.

CX3CR1 vermittelt über seinen Liganden Fraktalkin Zelladhäsion und scheint Einfluss auf die strukturelle Integrität des ZNS zu haben (Meucci et al. 2000). Fraktalkin kommt ubiquitär im ZNS vor und wird auch von Neuronen produziert, und da CG – 4 – Zellen CX3CR1 exprimieren, könnte somit über diesen Rezeptor eine regionale Orientierung der Zellen gewährleistet werden, dass heißt, sie könnten gezielt an den Ort der Myelinisierung geleitet werden. Ob Fraktalkin einen solchen promigratorischen Effekt hat, müssen künftige Untersuchungen zeigen.

Das Chemokin CXCL12/ SDF – 1 hat große Bedeutung in der embryonalen Entwicklung des ZNS, insbesondere des Kleinhirns (Zou et al. 1998). In dieser Arbeit wurde der entsprechende Rezeptor CXCR4 auch auf CG – 4 – Zellen nachgewiesen. Es ist durchaus möglich, dass CXCL12/ SDF – 1 auch in der Embryonalphase auf OPC wirkt, um zur Reifung des Gehirns beizutragen. Ob promyelinisierende Signale während der Entwicklung des ZNS über CXCR4 vermittelt werden, ist allerdings unklar. Im adulten ZNS wird CXCR4 auf Mikroglia, Astrozyten, Neuronen und Endothelzellen exprimiert (zusammengefasst in Bajetto, 2002). Sowohl unreife CG – 4 – Zellen, als auch solche, welche MBP – positiv sind, exprimieren den Rezeptor. Welche Rolle CXCL12/SDF – 1 im gesunden adulten Gehirn spielt, ist noch unklar, CXCR4 wird allerdings vermehrt exprimiert bei der SIV – Enzephalitis (Westmoreland et al. 1998). Ob CXCR4 auch Einfluss auf Erkrankungen wie die Multiple Sklerose hat, konnte bisher nicht geklärt werden.

Auch der Rezeptor CXCR2 wird auf CG – 4 – Zellen exprimiert (Nguyen und Stangel, 2001), sowohl auf unreifen, als auch auf reifen. Es wird vermutet, dass der entsprechende Ligand CXCL1/GRO - 1 α zusammen mit PDGF in die lokale Kontrolle der OPC – Proliferation einbezogen ist (Robinson und Franic 2001). Offenbar wirkt CXCL1 als Unterstützung für das Mitogen PDGF, welches in vitro Proliferation und Migration von OPC fördert und auch eine protektive Funktion hat (Pringle et al. 1992). In einer anderen Studie inhibiert CXCL1 die PDGF – gesteuerte Migration und gewährleistet damit eine räumliche und zeitliche Orientierung der OPC (Tsai et al. 2002).

Die Bedeutung von Chemokinen ist allerdings viel größer unter pathologischen Bedingungen. Sowohl in der MS als auch im entsprechenden Tiermodell EAE wurden Chemokine nachgewiesen: CCL2/MCP – 1, CCL8/MCP – 2, CCL7/MCP – 3, CCL5/RANTES,

CXCL9/Mig, CXCL10/IP – 10, CCL3/MIP – 1 α , CCL4/MIP – 1 β und CXCL1/GRO – 1 α (McManus et al. 1998; Simpson et al. 1998; Simpson et al. 2000; Filipovic et al. 2003). Auch an der Inflammation beteiligt zu sein scheinen CCL19/ELC, CCL21/SLC (Columba – Cabezas et al. 2003; Alt et al. 2002) und CXCL8/IL – 8 (Alter et al. 2003). Ein erhöhtes Vorkommen von CX3CL1/ Fraktalkin wurde ebenfalls beobachtet (Mizuno et al. 2003).

Entsprechend den an der Entzündung beteiligten Chemokinen könnten CG – 4 – Zellen durch die hier nachgewiesenen Rezeptoren die Chemokine CCL3/MIP – 1 α (CCR1), CCL8/MCP – 2(CCR3), CCL7/MCP – 3 (CCR1, CCR3), CCL5/RANTES (CCR1, CCR3), CXCL1/GRO – 1 α (CXCR2), CCL21/SLC und CCL19/ELC (CCR7) und CX3CL1/Fraktalkin (CX3CR1) binden. Diese Chemokine sind geeignete Kandidaten, um proremyelinisierende Effekte auf CG – 4 – Zellen zu untersuchen.

Chemokine haben an der Entzündung bei Multipler Sklerose einen großen Anteil und es wurde schon versucht, in diesen Prozess einzugreifen. So konnte im Tierexperiment über Blockierung des Chemokins CXCL10/ IP – 10 eine CD4+ T – Zell – und Makrophageninvasion aus dem Blut reduziert werden (Liu und Keirstead 2001). Es wurde in diesem Zusammenhang auch eine Verringerung der Progression der Demyelinisierung beobachtet.

Ein anderer Weg ist der, über Chemokine die Remyelinisierung zu beeinflussen. OPC wurden in MS – Läsionen beobachtet, bei denen später auch eine spontane Remyelinisierung auftrat (Scolding et al. 1998). Vielleicht ergeben sich hierdurch Möglichkeiten, in diesen Prozess aktiv einzugreifen. Obwohl die Entzündung ein destruktiver Prozess für Myelin ist, ist bekannt, dass Regenerationsmechanismen auch durch Entzündungszellen vermittelt werden. Im EAE – Modell konnte nachgewiesen werden, dass das Überleben und die Migration von transplantierten CG – 4 – Zellen durch die Inflammation gefördert wird (Tourbah et al.1997). So konnten auch in einem toxischen Demyelinisierungsmodell Makrophagen als Förderer einer erfolgreichen Remyelinisierung aufgezeigt werden (Kotter et al. 2001). Die Verbindung von Entzündung und Remyelinisierung ist noch nicht exakt definiert. Ähnlich TNF – α , welches über TNF – Rezeptor 1 auf Oligodendrozyten toxisch wirkt und über TNF – R2 auf OPC remyelinisierende Effekte besitzt (Arnett et al. 2002), vermitteln Chemokine nicht nur Entzündung, sondern können gleichzeitig Regeneration fördern. Auch IL – 1 β , ebenfalls ein inflammatorisches Zytokin, kann durch Induktion von IGF – 1 die Differenzierung von OPC fördern (Mason et al. 2001).

CCL2/MCP – 1, CCL8/MCP – 2, CCL7/MCP – 3 wurden sowohl in akuten, als auch in chronischen Läsionen beschrieben (McManus et al. 1998), CCL3/MIP - 1 α , CCL4/MIP – β und CCL5/RANTES wurden in chronisch – aktiven Läsionen gefunden (Simpson et al. 1998;

Balashov et al. 1999; Glabinski et al. 2003) und auch CXCL1/ GRO – 1 α konnte in chronischen MS – Läsionen nachgewiesen werden (Filipovic et al. 2002). Das Vorkommen von CCL19/ELC und CCL21/SLC konnte im chronischen EAE – Modell verifiziert werden (Alt et al. 2002; Columba – Cabezas et al. 2003).

So könnten aufgrund der entsprechend nachgewiesenen Rezeptoren CCL3/MIP – 1 α , CCL8/MCP – 2, CCL7/MCP – 3, CCL5/RANTES und CXCL1/GRO – 1 α auf OPC wirken.

CCL19/ELC und CCL21/SLC sind Liganden des Rezeptors CCR7, welcher sowohl auf unreifen als auch auf reiferen CG – 4 – Zellen exprimiert wurde. Ihre Rolle in der Vermittlung der Inflammation bei der MS ist noch recht wenig erforscht, offenbar scheinen sie die Migration von Entzündungszellen durch die Blut – Hirn – Schranke zu fördern. Bei der Meningitis konnten auch CCR7+T – Zellen nachgewiesen werden, welche über den Liquorraum zu den Meningen hin migrierten (Kivisakk et al. 2003). Eventuell könnten CCL19/ELC und CCL21/SLC ähnliche promigratorische Effekte auf OPC/ CG – 4 – Zellen haben.

CXCL1/GRO – 1 α scheint den physiologischen Myelinisierungsprozess zu beeinflussen, indem es auf embryonale OPC wirkt und mit dem entsprechenden Rezeptor CXCR2 die Migration der OPC inhibiert und damit möglicherweise die Myelinisierung einleitet (Robinson und Franic 2001; Tsai et al. 2002). Auf neonatalen OPC wurde CXCR2 gefunden (Nguyen und Stangel 2001), ebenso in einer Subpopulation von humanen OPC in vivo (Filipovic et al. 2003). Doch konnte CXCR2 nicht auf adulten OPC in MS – Läsionen nachgewiesen werden (Filipovic et al. 2003). Falls CXCR2 bei der Remyelinisierung eine Rolle spielt, könnte dies durchaus eine mögliche Ursache für die unvollständige Remyelinisierung darstellen. Allerdings konnte eine starke Expression von CXCR2 auf reiferen CG – 4 – Zellen nachgewiesen werden und es kann durchaus sein, dass CXCL1 eher positive Effekte auf die Differenzierung von OPC/ CG – 4 – Zellen hat. Filipovic hatte die O4 – positiven adulten OPC nicht auf die Expression von CXCR2 untersucht und falls der Rezeptor auf diesen exprimiert würde, so könnte CXCL1 in ein späteres Stadium der Remyelinisierung eingreifen und eher auf reifere Zellen wirken.

Es gibt offenbar einen Unterschied im Expressionsmuster von Chemokinrezeptoren zwischen neonatalen OPC, adulten OPC in vivo und adulten OPC in vivo bei der MS. Darum ist es wichtig, hinsichtlich der Remyelinisierung auch die anderen Rezeptoren, die hier auf CG – 4 – Zellen nachgewiesen werden konnten, auf ihre Existenz auf adulten OPC zu überprüfen. Dass der Rezeptor CXCR2 auf adulten OPC bei MS – Patienten nicht gezeigt werden konnte, ist möglicherweise ein Hinweis darauf, dass Signalstoffe, die bei der Myelinisierung wichtig sein könnten, die Remyelinisierung nicht unbedingt in gleichem Maß beeinflussen. Umgekehrt

jedoch könnten auch Botenstoffe, die bei der Myelinisierung keine Rolle spielen, bei der Remyelinisierung von Wichtigkeit sein.

CX3CL1/Fraktalkin wäre ein solcher Kandidat. Obwohl an der Entzündungsreaktion nicht beteiligt, ist die Fraktalkinkonzentration bei der MS erhöht (Hughes et al. 2002). Wie bereits angeführt, vermittelt Fraktalkin Zelladhäsion und könnte durchaus in die Remyelinisierung eingreifen und OPC gezielt zu den fraktalkinproduzierenden Neuronen lenken, um Orte der Demyelinisierung wieder zu remyelinisieren.

CXCL8/IL – 8 wurde bisher in Zusammenhang mit der Alzheimererkrankung und Hirntraumata und – ischämien (zusammengefasst in Bajetto, 2002) gebracht, und scheint auch an der Migration von Entzündungszellen unter anderem während der MS durch die Blut – Hirn – Schranke beteiligt zu sein (Alter et al. 2003). Der dazugehörige Rezeptor CXCR1 wurde auf Neuronen (Puma et al. 2001) und OPC (Nguyen und Stangel 2001) gefunden. Doch vielleicht ist IL – 8 trotz seiner fehlenden Präsenz im entzündlichen Milieu der MS ein möglicher Aktivator der Remyelinisierung und gerade diese Abwesenheit von Signalmolekülen ist eine Erklärung dafür, dass die Remyelinisierung in der MS unvollständig ist (Franklin et al. 2002).

Inwieweit die hier nachgewiesenen Rezeptoren auch Einfluss auf die physiologische Myelinisierung haben könnten, sollte weiter untersucht werden. Ebenso interessant wäre es, festzustellen, ob z.B. Zytokine im Rahmen der MS wie bei Astrozyten und Mikroglia während der Inflammation die Rezeptordichte verändern könnten (Simpson et al. 2000), ob und welche Rezeptoren vermehrt gebildet würden, was darauf hindeuten könnte, dass Chemokine im Rahmen der Multiplen Sklerose auch auf Oligodendrozyten wirken.

In dieser Arbeit wurden zwei OPC – Modelle, A₂B₅ – positive CG – 4 – Zellen mit O4 – und MBP – positiven, reiferen CG – 4 – Zellen, qualitativ auf die Expression von Chemokinrezeptoren verglichen.

Doch bis auf den Unterschied in der Expression von CXCR1 konnten keine weiteren Unterschiede festgestellt werden. Mittels real – time – PCR könnte man feststellen, ob reifere CG – 4 – Zellen eine andere Expressionsdichte an Chemokinrezeptoren haben als unreife CG – 4 – Zellen.

Als weiterer Ausblick für Untersuchungen an Oligodendrozyten in Bezug auf die nachgewiesenen Rezeptoren ist es wichtig, die Funktionalität dieser Rezeptoren zu überprüfen. Da Chemokinrezeptoren G – Protein – gekoppelte Rezeptoren sind, kann eine Zellantwort über einen interzellulären Calciumanstieg nachgewiesen werden (Nguyen et al. 2003).

Da es sich um in – vitro – Ergebnisse handelt, wäre es von Vorteil, in vivo diese Ergebnisse zu verifizieren, denn damit wäre der endgültige Beweis von der Existenz von Chemokinrezeptoren

auf OPC bzw. auf Oligodendrozyten erbracht. In diesem Fall ist auch der Vergleich interessant, inwiefern sich adulte OPC von embryonalen/neonatalen OPC unterscheiden, welchen Einfluss die Inflammation auf die Chemokinrezeptoren der OPC hat, ob und welche Abweichungen es zu Zellen im nicht erkrankten Hirngewebe gibt.