

Einleitung

Das Gehirn ist aufgrund der Blut-Hirn-Schranke für Zellen des Immunsystems nicht zugänglich und besitzt eine eigene Population von Makrophagen, die Mikrogliazellen. Sie gehören zu den Gliazellen, welche von Rudolf Virchow als Zellen mit vorwiegend stützender Funktion beschrieben wurden und deshalb von ihm den Namen Glia (= griech. Leim) bekamen. Die Herkunft der Mikroglia war lange Zeit umstritten. Durch eine Vielzahl von Untersuchungen konnte jedoch bewiesen werden, dass Mikroglia zu den mononukleären Phagozyten zählen und demnach von Monozyten/Makrophagen abstammen. Ihre Funktionen und ihr Antigenpektrum gleicht denen der Makrophagen im Blut (Perry & Gordon, 1991). Sie unterscheiden sich jedoch in einem charakteristischen Einwärtskaliumstrom von den Makrophagen (Kettenmann *et al.*, 1990). Im Knochenmark konnten an einer Subpopulation von Zellen ähnliche elektrische Eigenschaften nachgewiesen werden, diese Zellen sind jedoch noch nicht charakterisiert und es ist unklar, ob eine Verwandtschaft zu den Mikroglia besteht (Banati *et al.*, 1991). In Kulturen von Zellen des Neopalliums neugeborener Mäuse findet man Vorläuferzellen, die sich morphologisch und immunhistochemisch nicht von den Astrozyten unterscheiden (Alliot *et al.*, 1991; Hao *et al.*, 1991). Nach Stimulation mit Wachstumsfaktoren entwickeln sich aus diesen Zellen Mikroglia. Eine entscheidende Rolle für die Entwicklung der Mikroglia spielen dabei die von den neuronalen Zellen sekretierten Wachstumsfaktoren (z.B. CSF-1), ohne diese Faktoren können sie sich nicht differenzieren (Richardson *et al.*, 1993).

1.1 Ontogenese der Mikroglia

Del Rio-Hortega postulierte bereits 1932 einen mesodermalen Ursprung für die Mikroglia, indem er durch Silbercarbonat im Mesoderm (Pia) Ursprungsgebiete der Mikroglia anfärbte. Die Einwanderung der Mikrogliazellen findet hauptsächlich vor der Bildung der Blut-Hirnschranke statt (Ling & Wong, 1993). Ein kleiner Teil der Mikroglia wandert jedoch noch 5-10 Tage postnatal (P) ins Gehirn ein (Imamoto & Leblond, 1978). Diese späte Wanderung der Mikroglia ist auf bestimmte Hirnareale wie das Cingulum und das Corpus callosum beschränkt. Die einwandernden Mikroglia haben ein etwa 10 µm großes Zellsoma und nahezu keine Zellausläufer, lediglich wenige, kurze Fortsätze. In akuten Hirnschnitten von Mäusen im Alter von P 5-10 kann diese Mikroglia population sehr leicht identifiziert werden, da diese Zellen aufgrund ihrer migratorischen Eigenschaften an die Schnittoberfläche wandern und dort als runde, mit Vesikeln gefüllte Zellen gut zu erkennen sind (Abb. 1). Diese Zellen sind für elektrophysiologische Untersuchungen leicht zugänglich und man findet sie in großer Zahl hauptsächlich in der supraventrikulären Region des Corpus callosum.

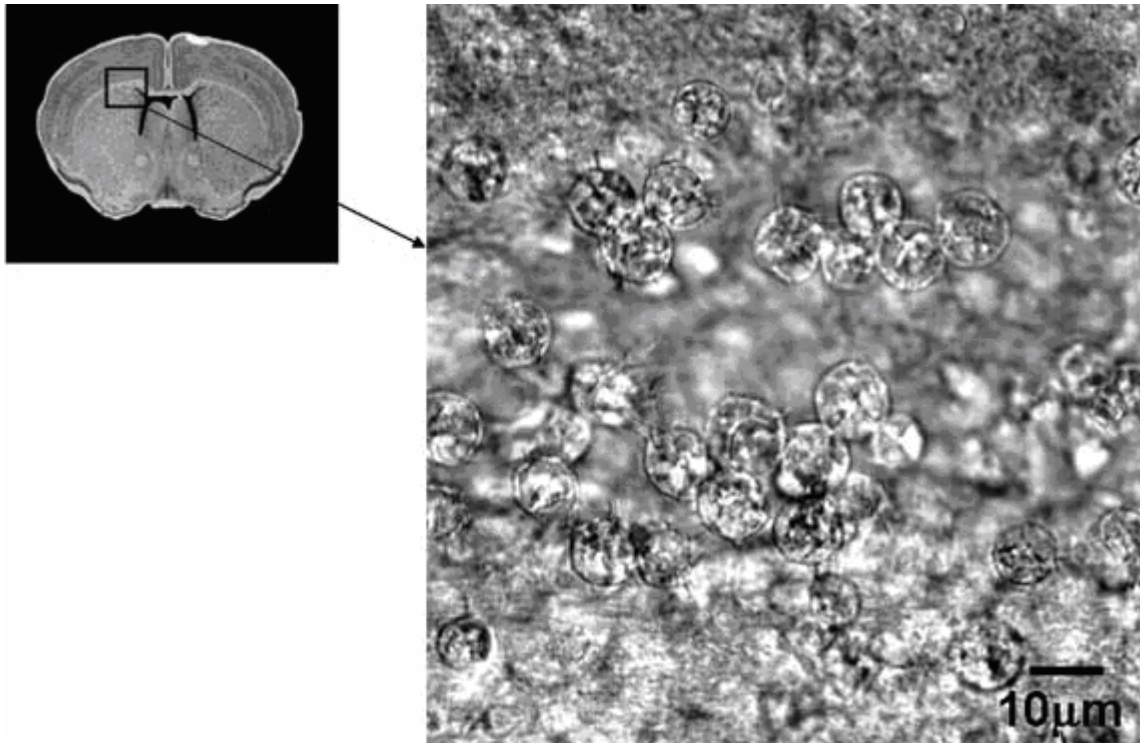


Abb. 1 Amöboide Mikroglia im Corpus callosum. Auf der linken Seite ist ein coronaler Hirnschnitt dargestellt, der Bereich der Corpus callosum oberhalb des Ventrikels ist auf der rechten Seite vergrößert dargestellt. Die amöboiden Mikroglia sind als große, runde Zellen auf der Schnittoberfläche zu erkennen.

Nachdem amöboide Mikroglia ihre endgültige Position im Gehirn gefunden haben, verringern sie stark ihr Zellsoma und bilden ausgeprägte Verzweigungen (auch bezeichnet als Rami) aus, die sich über ein Gebiet von bis zu 100 μm erstrecken können, man spricht dann von ruhenden bzw. ramifizierten Mikroglia (Abb. 2). Diese Zellen sind im Vergleich zu den amöboiden Mikroglia nicht mehr zur Migration fähig (Ling & Wong, 1993).

In Hirnschnitten von adulten Tieren sind die ramifizierten Mikroglia nur durch eine vorherige Färbung mit dem fluoreszenzmarkierten Lektin der Tomate bzw. durch Verwendung von transgenen Tieren in denen EGFP unter Mikroglia-spezifischen Promotoren (ionized calcium-binding adaptor molecule-1 [*iba-1*], chemokine C-X3-C motif receptor 1 [*CX3CR 1*]) exprimiert wird zu erkennen.

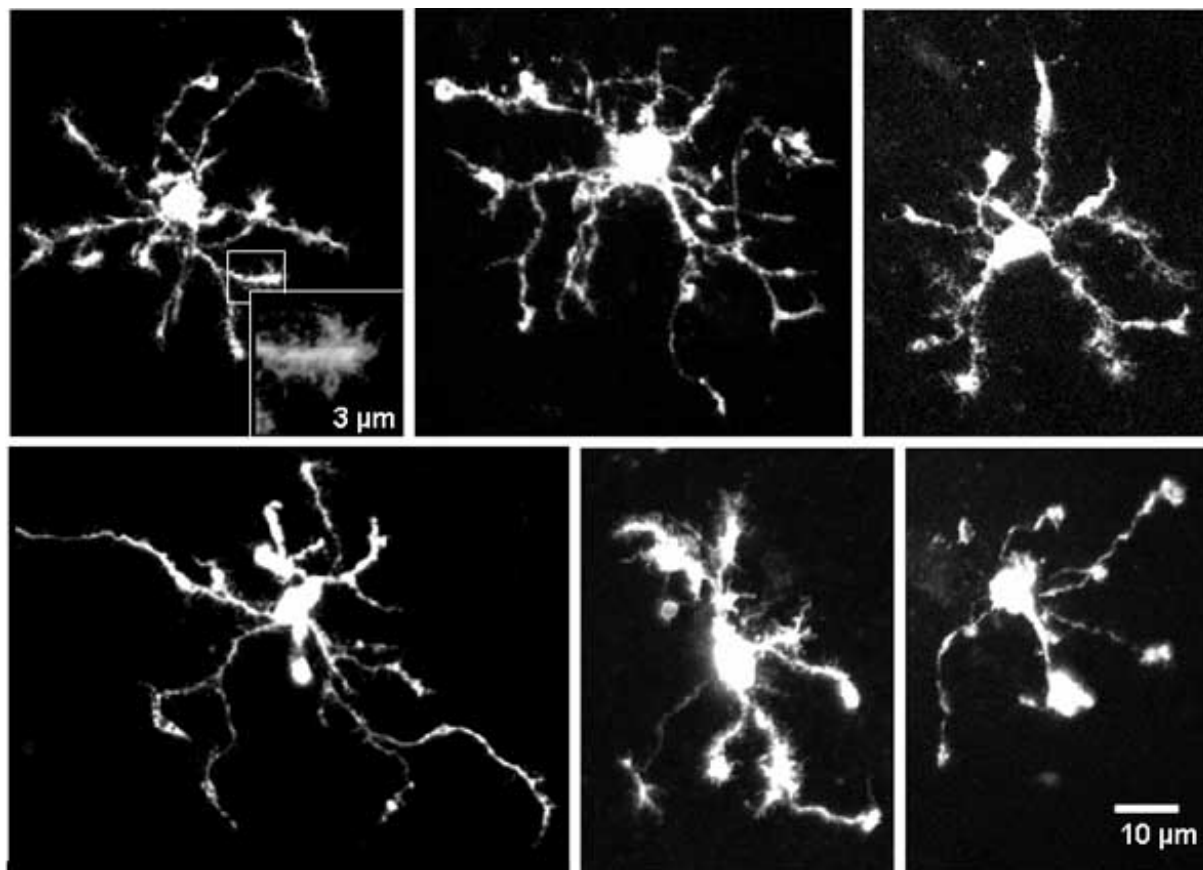


Abb. 2 Morphologie der ramifizierten Mikroglia im adulten Hirn. Die Mikroglia wurden über die Patch-Pipette mit Lucifer-Gelb gefärbt und nach Fixierung des Gewebes mit einem konfokalen Laserscanningmikroskop abgebildet.. (Boucsein, 2000)

In der vorliegenden Arbeit wurden zur Untersuchung der Neurotransmitter-Rezeptor-Expression kultivierte Mikroglia aus Primärkulturen, sowie amöboide und ramifizierte Mikroglia im Hirnschnitt untersucht.

1.2 Funktion der Mikroglia

Mikroglia bevölkern das gesamte Gehirn sowie das Rückenmark. Während der Entwicklung des Gehirns phagozytieren die einwandernden, amöboiden Mikroglia die durch programmierten Zelltod selektierten neuronalen Zellen. Sie sind dabei auch in der Lage, gezielt Apoptose in Neuronen auszulösen, z.B. in Purkinje-Zellen durch *respiratory burst* (Marin-Teva *et al.*, 2004) oder in der Retina durch Aktivierung des Neurotrophin Rezeptors p57 via Sekretion von Nervenwachstumsfaktor (*Nerve Growth Factor*, NGF) (Frade & Barde, 1998). Es gibt Hinweise, dass Mikrogliazellen lebende Zellen umschließen können und dadurch in diesen Zellen den programmierten Zelltod auslösen (Mallat *et al.*, 2005). Außerdem beeinflussen sie die Migration, das Wachstum von Axonen (Streit, 2001) und die Differenzierung von Neuronen (Jonakait *et al.*, 1996).

Im adulten, gesunden Gehirn sind die phagozytischen Eigenschaften der Mikroglia extrem reduziert und streng reguliert. Eine Mikroglia „wacht“ jeweils über ein dreidimensionales Hirnareal (ca. 50000 μm^3) und die darin enthaltenen Zellen (Streit, 2005). Sie produzieren diverse neurotrophe Faktoren wie z.B. Interleukin-1 (IL-1) und IL-3 (Yao *et al.*, 1992), *nerve growth factor* (NGF) und *brain derived fibroblast growth factor* (bFGF) und unterstützen dadurch die umliegenden Neurone (Giulian *et al.*, 1986; Araujo & Cotman, 1992; Shimojo *et al.*, 1991). Durch den Kontakt mit neuronalen Faktoren wie dem Membranprotein OX-2 (CD200) kann die Mikroglia in einem ruhenden Zustand gehalten werden (Hoek *et al.*, 2000). Neurotrophine wie NGF, *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) und Neurotrophin-3 (NT-3) scheinen die Sekretion von neurotoxischen Stoffen wie Stickstoffmonoxid (*nitric oxide* NO) in Mikroglia zu inhibieren (Nakajima *et al.*, 1998). In Co-Kulturen von Neuronen und Mikrogliazellen war die Produktion von Tumornekrosefaktor α (TNF- α) und NO reduziert verglichen mit Monokulturen von Mikrogliazellen (Chang & Liu, 2000).

Durch Zweiphotonenmikroskopie am lebenden Tier konnte gezeigt werden, dass die ruhende Mikroglia permanent mit Hilfe ihrer Fortsätze ihre unmittelbare Umgebung abtastet und Gewebestandteile aufnimmt. Die Fortsätze der Mikroglia haben außerdem direkten Kontakt zu astrozytären und neuronalen Zellkörpern sowie zu Blutgefäßen (Nimmerjahn *et al.*, 2005).

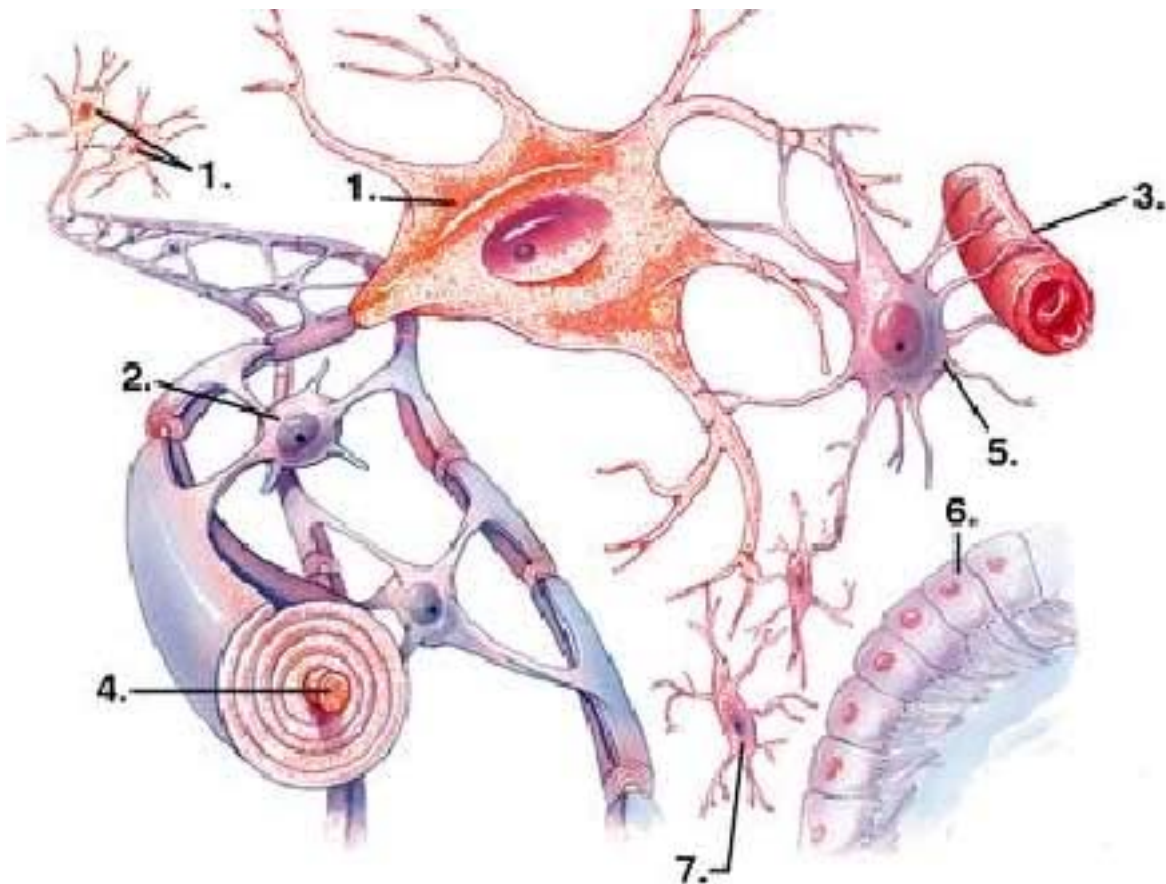


Abb. 3 Interaktion der Mikroglia mit anderen Zellen des ZNS. 1. Neurone, 2. Oligodendrozyten, 3. Blutgefäße, 4. Axon, 5. Astrozyten, 6. Ependymzellen, 7. Mikroglia. http://faculty.southwest.tn.edu/rburkett/A&P1_Nrvs_Sys_Lab.htm

Durch diese enge Interaktion mit den umliegenden Zellen sind die Mikroglia in der Lage sofort zu reagieren, sollten pathologische Veränderungen auftreten. Sie können dann sehr schnell vom ruhenden in einen aktivierten Zustand übergehen. Eine gezielte Verletzung von Blutgefäßen löste eine sofortige Reaktion der Mikroglia, in Form einer gerichteten Bewegung der Fortsätze hin zum Verletzungsareal aus (Nimmerjahn *et al.*, 2005).

Durch die Hochregulation von phagozytischen Funktionen, Änderungen der Morphologie und Expression einer Reihe von Effektormolekülen können Mikroglia spezifisch und adäquat auf die jeweilige pathologische Veränderung reagieren. Die Vielfalt der Maßnahmen reicht dabei von Phagozytose von toten Zellen und Sekretion neurotrophischer Faktoren über das Auslösen einer Entzündung bis hin zur Aktivierung von Lymphozyten (Town *et al.*, 2005). Aktivierte Mikroglia wandeln sich zu Antigen-präsentierenden Zellen um, die in der Lage sind zu proliferieren, migrieren und phagozytieren. Die Sekretion von proinflammatorischen Substanzen, wie TNF- α , IL-1 β , Prostaglandinen, Chemokinen, reaktiven Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS), NO und Proteasen kann induziert werden (Aloisi, 2001). Des Weiteren exprimieren aktivierte Mikroglia im Unterschied zur ruhenden Form einen Kaliumauswärtsstrom (Prinz *et al.*, 1999; Draheim *et al.*, 1999; Boucsein *et al.*, 2000) dessen Verbindung zu zellulären Prozessen wie NO-Freisetzung oder Proliferation bisher noch weitgehend ungeklärt ist und der u. a. Gegenstand der folgenden Arbeit sein soll. Da Mikrogliazellen in jede pathologische Veränderung des Gehirns involviert sind, ist es für das Verständnis und für die Entwicklung neuer Behandlungsstrategien unerlässlich die Kommunikation zwischen Neuronen und Mikrogliazellen sowie die nachgeschalteten Signalwege zu verstehen.

1.3 Die Aktivierung der Mikrogliazellen

Da Mikroglia als Immunzellen in der Lage sein müssen auf sehr vielfältige Umweltveränderungen zu reagieren, ist es nicht verwunderlich, dass ein großes Spektrum an Aktivierungsmechanismen vorhanden ist. Im folgenden Abschnitt sollen nur die, für diese Arbeit relevanten Signalwege genauer beschrieben werden. Die Mikroglia kann noch durch eine Reihe weiterer Faktoren, wie z.B. Komplementfaktoren, Zytokine, Chemokine und Bestandteile der extrazellulären Matrix aktiviert werden.

Auf Lipopolysaccharid (LPS), einem Bestandteil der Zellmembran von Gram-negativen Bakterien, reagieren Mikroglia in Kultur nach etwa 18 h mit einem charakteristischen Kaliumauswärtsstrom. Des Weiteren kommt es zu einer stark erhöhten Expression von Vimentin und F-Aktin. Die Zellen formieren zunächst lange Lamellipodien, diese ziehen den Zellkörper hinter sich her, nach wenigen Stunden verkürzen sich diese Fortsätze wieder und die Zelle geht in eine runde und flache Morphologie über (Abb. 4).

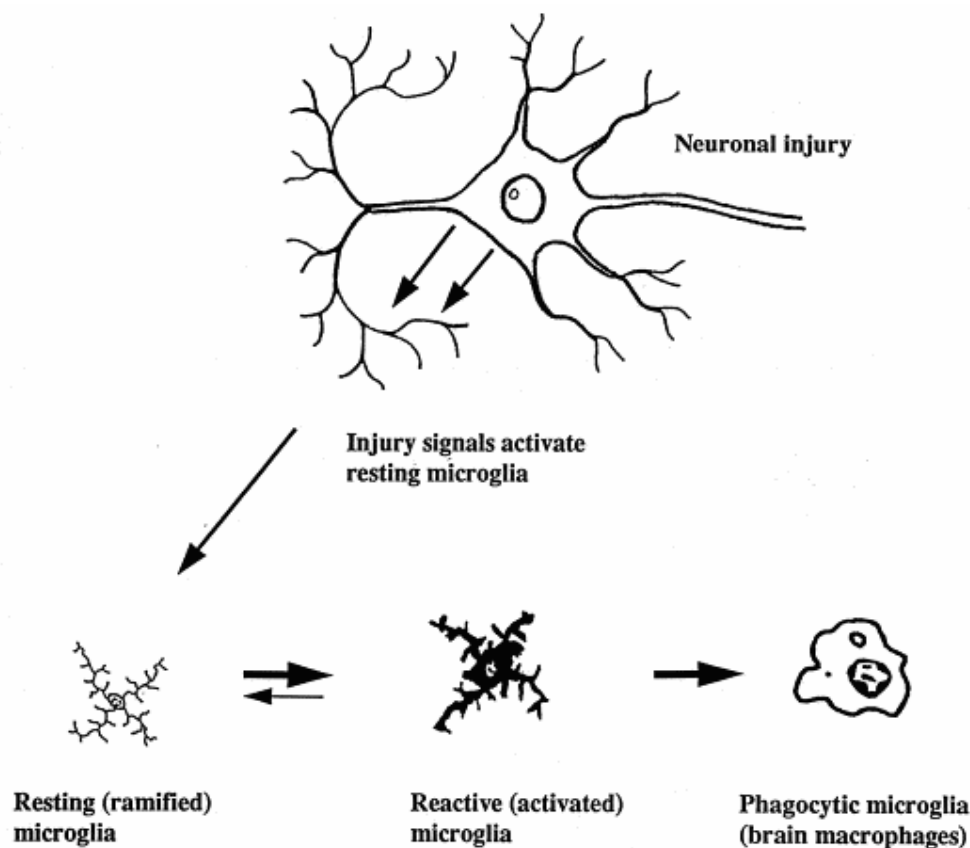


Abb. 4 Funktionelle Plastizität der Mikroglia. Geschädigte Neuronen (*neuronal injury*) senden Signale (*injury signals*) an ramifizierte Mikroglia (*ramified microglia*), wodurch diese in einen aktivierten Zustand übergehen (*reactive microglia*). Durch das Absterben von neuronalen Zellen können Mikroglia auch zu Phagozyten (*phagocytic microglia*) transformieren und totes Gewebe aufnehmen. (Streit *et al.*, 1999)

Sie besitzen dann nur noch kurze Fortsätze die auch als Mikrospikes bezeichnet werden. Diese bestehen aus Bündeln von F-Aktin. Die Zellen sind nach Inkubation mit LPS in der Lage zu phagozytieren, was sich in einer verstärkten Expression des Fragment-kristallin (*fragment crystallisable, Fc*) -Rezeptors äußert. Außerdem kommt es zur Sekretion verschiedener Zytokine wie TNF- α , IL-1, oder IL-6 (Draheim *et al.*, 1999;Prinz *et al.*, 1999;Lee *et al.*, 1993). Durch die LPS-Aktivierung wird außerdem die induzierbare Form der NO-Synthase (*inducible nitric oxide synthase* iNOS) exprimiert wodurch es zur Bildung und Sekretion von NO kommt (Banati *et al.*, 1993;Colasanti *et al.*, 1995). Weiterhin kommt es zur Bildung von ROS (Banati *et al.*, 1993) mit Hilfe des Enzyms Nikotinamidadenindinukleotidphosphat-Oxidase (NADPH-Oxidase) (Shatwell & Segal, 1996).

1.4 Neurotransmitter-Rezeptoren auf Mikroglia

Mikroglia besitzen Rezeptoren für den wichtigsten exzitatorischen Neurotransmitter Glutamat sowie den wichtigsten inhibitorischen Transmitter γ -Aminobuttersäure (*gamma aminobutyric acid, GABA*). Die Expression von Typ I metabotropen Glutamat-rezeptoren (mGluR5) konnte auf Mikrogliazellen nachgewiesen werden (Biber *et al.*,

1999). Die Aktivierung dieses Rezeptors führte zu einem transienten Anstieg des zytosolischen Kalziumspiegels. Die Typ II metabotrope Glutamatrezeptoren mGluR4, mGluR6 und mGluR8 konnten auf Protein- und mRNA-Ebene ebenfalls detektiert werden (Taylor *et al.*, 2002). Die Aktivierung dieser Rezeptoren führte in Co-Kulturen aus Neuronen und mit Chromogranin A aktivierten Mikroglia zu einer Reduktion der apoptotischen Neurone (Taylor *et al.*, 2002).

Mikrogliazellen exprimieren ionotropen Glutamatrezeptoren GluR2-5 sowie die Kainatrezeptoren (KA) KA-1 und KA-2 (Noda *et al.*, 2000). Glutamat als auch Kainat Applikation verstärken die Freisetzung von TNF- α . Elektrophysiologische Untersuchungen zeigten, dass durch Applikation von Kainat, AMPA und Glutamat eine Ionenleitfähigkeit induziert werden konnte. Die Substitution der Na²⁺- mit Ca²⁺- Ionen ergab eine geringe Kalziumleitfähigkeit des Kanals, was auf die GluR2 Untereinheit hinweist, da diese die Kalziumpermeabilität des AMPA-Rezeptors kontrolliert (Noda *et al.*, 2000).

Mikroglia exprimieren GABA_B Rezeptoren *in vitro* und *in vivo* deren Aktivierung zu einem transienten Anstieg des intrazellulären Kalziumlevels, zu einer Reduktion der IL-6 und IL-12+p40 Freisetzung nach LPS-Stimulation, sowie zu einer transienten auswärtsrektifizierenden Kaliumleitfähigkeit führt. Immunhistochemisch konnte die Expression der 3 Spleißvarianten GABA_{B(1a)}, GABA_{B(1b)} und GABA_{B(1e)} nachgewiesen werden (Kuhn *et al.*, 2004). Mikrogliazellen sind in der Lage, Veränderungen der Neurotransmitter-Freisetzung wahrzunehmen. Applikation des GABA-Rezeptor-Blockers Bikukulin bewirkte eine Erhöhung der Mobilität der mikroglialen Fortsätze (Nimmerjahn *et al.*, 2005).

Des Weiteren besitzen Mikroglia purinerge Rezeptoren zur Bindung von Adenosin-triphosphat (ATP), welches ebenfalls ein wichtiges neuronales, und vor allem gliales (Astrozyten) Signalmolekül darstellt und bei jeder pathologischen Veränderung im Gehirn von sterbenden Zellen freigesetzt wird. Mikrogliazellen exprimieren sowohl metabotrope (P2Y) als auch ionotrope (P2X) purinerge Rezeptoren *in vitro* und *in situ*. Mit Hilfe von Patch-Clamp Untersuchungen konnte die Expression des Rezeptorsubtyps P2X7 nachgewiesen werden (Boucein *et al.*, 2003). Da die Mikrogliazellen auf alle P2Y Agonisten (Uridin-5'-triphosphat [UTP], Uridin-5'-bisphosphat [UDP], 2-Methyl-thio-adenosin-5'-triphosphat [2MeSATP]) reagierten, scheint mehr als nur ein P2Y-Rezeptorsubtyp exprimiert zu werden. 2MeSATP ist ein spezifischer P2Y1 Agonist, UTP aktiviert nur P2Y2/P2Y4 Subtypen und UDP bindet spezifisch an P2Y6 Rezeptoren (Boucein *et al.*, 2003). ATP-Stimulation beeinflusst die Aktivierung der Mikroglia nach LPS-Stimulation und reduziert die Freisetzung von IL-6, IL-12, TNF- α und MIP-1 α (Boucein *et al.*, 2003). ATP und ADP sind in der Lage, Chemotaxis zu induzieren (Honda & Kohsaka, 2001). Die spezifische Aktivierung des P2Y7 Rezeptors induziert die Freisetzung von IL-1 β und Plasminogen (Honda & Kohsaka, 2001; Ferrari *et al.*, 1997).

Mikroglia exprimieren demnach Rezeptoren für drei sehr wichtige Transmitter im ZNS, und deren Stimulation moduliert wichtige immunologische Funktionen der

Mikroglia (Reduktion der Zytokin-Freisetzung, Migration etc.). Demnach ist die Kenntnis darüber, welche Transmitter-Rezeptoren Mikroglia besitzen und welche Funktionen durch diese gesteuert werden enorm wichtig für das Verständnis der Funktionsweise dieser Zellen im gesunden, aber auch im kranken Gehirn, da bei diversen neurologischen Erkrankungen Neurotransmitter wie z.B. Dopamin bei Parkinson eine entscheidende Rolle spielen. Über die Wirkung von Dopamin und andere wichtige Neurotransmitter wie Noradrenalin, Histamin und Serotonin auf Mikroglia ist jedoch noch sehr wenig bekannt. Im Rahmen dieser Arbeit soll ermittelt werden ob Mikroglia funktionelle Rezeptoren für diese Neurotransmitter exprimieren und welche Reaktionen durch Stimulation dieser Rezeptoren ausgelöst werden.

Im Folgenden sollen die bisherigen Erkenntnisse über die Wirkung dieser Transmitter auf Mikroglia und vor allem deren Bedeutung im ZNS zusammengefasst werden. Dopamin und Noradrenalin zählen mit Adrenalin zu den Katecholaminen, welche vorwiegend bei Stress in erhöhtem Maße freigesetzt werden. Da gestresste Tiere weniger resistent gegenüber viralen Infektionen sind, werden möglicherweise Immunzellen wie die Mikroglia durch die erhöhte Neurotransmitter-Freisetzung beeinflusst. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Stimulation von Mikroglia mit Katecholaminen die Freisetzung von NO signifikant reduziert. NO-Freisetzung ist ein wichtiger Abwehrmechanismus bei viralen Infektionen. Bei Parkinson, einer der häufigsten chronischen, neurodegenerativen Erkrankungen, bei der ein Mangel an Dopamin zu Störungen der Motorik führt, scheinen aktivierte Mikroglia eine entscheidende Rolle zu spielen. Die Ursache dieser Erkrankung ist das Absterben von Neuronen in der Substantia nigra. Diese Neuronen sterben vermutlich aufgrund von erhöhter Freisetzung neurotoxischer Stoffe wie NO oder reaktiven Sauerstoffspezies durch aktivierte Mikroglia. Unklar ist jedoch ob die Mikroglia die Ursache dieser Erkrankung bildet oder das Krankheitsbild nur zusätzlich verschlechtert. Da bereits für andere Transmitter wie ATP oder Glutamat ermittelt werden konnte, dass diese die neurotoxischen Funktionen der aktivierten Mikroglia eher attenuieren (Taylor *et al.*, 2002; Boucsein *et al.*, 2003), führt möglicherweise eine Reduktion der Dopaminkonzentration, wie bei Parkinson, zum Wegfall des attenuierenden Effekts und damit zu einer Aktivierung der Mikroglia.

Zur Expression von Dopamin-Rezeptoren in Mikroglia ist bisher wenig bekannt. Lymphozyten und Makrophagen exprimieren Dopamin-Rezeptoren (Ricci & Amenta, 1994; Ricci *et al.*, 1994; Santambrogio *et al.*, 1993; Hasko *et al.*, 2002). Die Dopamin (D) -Rezeptoren unterteilen sich in zwei Hauptgruppen, die D1- und die D2-ähnlichen Rezeptoren (Jaber *et al.*, 1996). Zu den D1-ähnlichen Rezeptoren zählen D1 und D5, zu den D2-ähnlichen Rezeptoren gehören D2, D3 und D4. Astrozyten exprimieren alle Subtypen der Dopamin-Rezeptoren (Miyazaki *et al.*, 2004).

Die Expression von α -, β_1 - und β_2 -adrenergen Rezeptoren auf der Mikroglia konnte mittels PCR nachgewiesen werden (Mori *et al.*, 2002). Stimulation der Zellen mit Noradrenalin bzw. einem β_2 -adrenergen Rezeptoragonisten induzierten einen Anstieg des intrazellulären zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat (*cyclic-3',5' adenosine*

monophosphate cAMP) Levels (Mori *et al.*, 2002;Prinz *et al.*, 2001). Die Aktivierung von β_2 -adrenergen Rezeptoren führte zu einer Inhibition der LPS-induzierten IL-12+p40 Freisetzung (Prinz *et al.*, 2001). Die Expression von β_3 -adrenergen Rezeptoren konnte nicht nachgewiesen werden (Tanaka *et al.*, 2002).

Der Nachweis von Histamin-Rezeptoren auf der Mikroglia konnte bisher noch nicht erbracht werden und ist deshalb ebenfalls Gegenstand dieser Arbeit. Die Expression des Histamin- synthetisierenden Enzyms, Histidindekarboxylase (*histidine decarboxylase* HDC) konnte in einer mikroglialen Zelllinie nachgewiesen werden (Katoh *et al.*, 2001). LPS-Stimulation führte zu einer massiven Erhöhung des HDC-Expressionslevels.

Über die Wirkung von Serotonin auf Mikroglia ist nur sehr wenig bekannt. Es konnte nachgewiesen werden, dass Mikroglia 5-HT₇ Rezeptoren exprimieren, deren Stimulation zu einem Anstieg des intrazellulären cAMP-Spiegels und einer erhöhten Expression von IL-6 mRNA führte (Mahe *et al.*, 2005). Serotonin-Applikation bewirkte außerdem die Reduktion der Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies aus aktivierten Mikroglia (Huether *et al.*, 1997).

Da Neurotransmitter demnach Eigenschaften von aktivierten Mikroglia modulieren können und möglicherweise einer Aktivierung der Mikroglia vorbeugen können, ist die genaue Kenntnis des exprimierten Rezeptorspektrums und deren Funktion außerordentlich wichtig für das Verständnis dieser Zellen, vor allem auch im Hinblick auf deren Aktivierung bei pathologischen Veränderungen im ZNS.

1.5 Ionenkanäle der Mikroglia

Ionenkanäle sind integrale Membranproteine, die die Lipiddoppelschicht durchspannen um eine Pore zu bilden, durch die bestimmte Ionen fließen können. Sie bestimmen die elektrischen Eigenschaften von Membranen. Mikrogliazellen exprimieren Ionenkanäle die selektiv K⁺, H⁺, Na⁺, Ca²⁺ oder Cl⁻ leiten.

Das Expressionsmuster der jeweiligen Ionenkanäle hängt dabei vom Aktivierungszustand der Mikroglia ab (Eder, 1998). Es wird angenommen, dass die Aktivierung der Mikroglia in zwei Stufen stattfindet, wobei die erste Stufe durch die Expression von Kaliumeinwärtsströmen, die zweite Stufe durch die Induktion von Kaliumauswärtsströmen charakterisiert ist. Durch die Expression der jeweiligen Ströme scheint maßgeblich das Membranpotential der Mikroglia zu beeinflussen, welches vermutlich weitere zelluläre Prozesse, wie den Anstieg des intrazellulären Kalziumspiegels reguliert (Farber & Kettenmann, 2005). Demnach scheinen Ionenkanäle wichtige Funktionen der Zelle zu regulieren. Durch die Expression bzw. Aktivierung unterschiedlicher Ionenkanäle sind Mikroglia vermutlich in der Lage schnell und präzise auf unterschiedlichste Veränderungen ihrer Umgebung zu reagieren.

1.5.1 Kalium-Kanäle

Kaliumkanäle bilden eine sehr große Ionenkanalfamilie, die alle selektiv Kaliumionen vor Natriumionen leiten, was durch ein gemeinsames Strukturmotiv (TVGYG) bestimmt wird. Kaliumkanäle sind Tetramere, d.h. vier Untereinheiten bilden die Ionenpore (Sansom *et al.*, 2002).

Einwärtsrektifizierende spannungsabhängige Kaliumkanäle

Diese Kanäle sind konstitutiv in Mikrogliazellen exprimiert und werden bei hyperpolarisierenden Membranspannungen negativ von -80 mV geöffnet und zeigen eine zeit- und spannungsabhängige Inaktivierung. Die Stromamplitude wird mit zunehmender Hyperpolarisation größer, die Inaktivierung wird schneller und stärker. Einwärtsgleichrichtende K⁺-Ströme konnten in allen untersuchten unstimulierten, kultivierten Mikroglia nachgewiesen werden. Die Ströme durch diese Kanäle sind nach den bisherigen Untersuchungen nur einwärtsgerichtet und werden deshalb auch als *inward rectifier* (IR) bezeichnet. Die Kanäle werden durch die externe K⁺-Konzentration beeinflusst, d.h. eine Erhöhung der externen K⁺-Konzentration verschiebt das Umkehrpotential in die positive Richtung (Kettenmann *et al.*, 1990; Eder *et al.*, 1995). Applikation von 1 mM Ba²⁺ führt zu einer reversiblen Blockade des Einwärtsstroms (Kettenmann *et al.*, 1990). Einzelkanalmessungen ergaben eine Leitfähigkeit von 30 pS (Kettenmann *et al.*, 1990). Bei starker Hyperpolarisation kommt es zu einem zeitlich korrelierten Stromabfall, der auf eine zeit- und spannungsabhängige Inhibition durch extrazelluläre Na⁺-Ionen zurückzuführen ist (Norenberg *et al.*, 1994). Bei Aktivierung der Mikroglia durch LPS kommt es zu einer Reduktion der einwärtsgerichteten K⁺ Ströme (Norenberg *et al.*, 1994), (Draheim *et al.*, 1999). Ramifizierte Mikroglia im akuten Hirnschnitt exprimieren im Gegensatz zu kultivierten Zellen keine einwärtsrektifizierenden K⁺ -Ströme (Boucsein *et al.*, 2000). Die durch Behandlung mit Astrozyten-konditioniertem Medium (ACM) oder transformierendem Wachstumsfaktor β (*transforming growth factor* β , TGF- β) "deaktivierten" Mikroglia in Kultur, weisen einwärtsrektifizierende K⁺-Ströme auf (Eder *et al.*, 1997; Schilling *et al.*, 2000), sind also nicht mit ramifizierten Mikroglia im Hirnschnitt vergleichbar. Im Gegensatz dazu ähneln infiltrierende, amöboide Mikroglia in koronalen Hirnschnitten im Strommuster den kultivierten Zellen (Brockhaus *et al.*, 1996). Bisherigen Untersuchungen zufolge sind die, in Mikrogliazellen exprimierten, einwärtsgleichrichtenden Kaliumkanäle durch die Kir 2.1 mRNA codiert (Schilling *et al.*, 2000). Die funktionelle Bedeutung dieser Kanäle ist noch weitgehend unbekannt. Sie spielen jedoch eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung des Membranpotentials, da eine Blockade durch Barium zu einer Depolarisation des Potentials führt (Visentin *et al.*, 1995; Chung *et al.*, 1999). Die Blockade der Einwärtsgleichrichter verminderte außerdem die Proliferationsrate in kultivierten Mikroglia (Schlichter *et al.*, 1996). Durch LPS wird ebenfalls der Kaliumeinwärtsstrom und die Proliferation reduziert (Schilling *et al.*, 2000).

Auswärtsrektifizierende spannungsabhängige Kaliumkanäle

Mikroglia exprimieren verzögert aktivierende auswärtsgerichtete Kaliumkanäle (*delayed rectifier* DR). Diese Kanäle aktivieren spannungsabhängig und werden deshalb auch als *voltage activated K⁺ channels* (Kv) bezeichnet. Ein solcher Kaliumkanal besteht aus vier α -Untereinheiten, die die Kanalpore bilden (Liman *et al.*, 1992), daran können sich noch auf zytoplasmatischer Seite 4 β -Untereinheiten anlagern. Jede α -Untereinheit besteht aus sechs Transmembrandomänen (S1-S6) (Abb. 5). In S4 befindet sich eine Region aus positiv geladenen Aminosäureresten, welche bei Depolarisation der Membranspannung ihre Konformation ändert (Spannungssensor) und dadurch die Kanalpore öffnet (Sansom *et al.*, 2002).

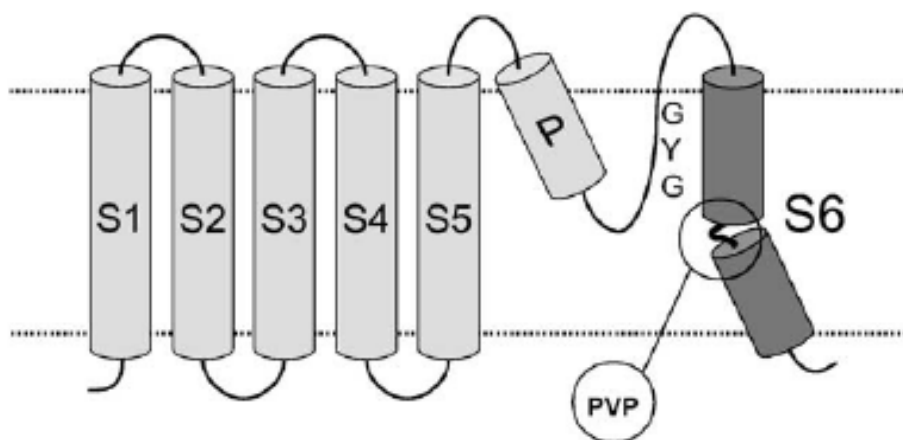


Abb. 5 Transmembrantopologie der Kv-Kanal-Untereinheiten. (Sansom *et al.*, 2002)

Die Transmembrandomänen S5 und S6 bilden die eigentliche Kanalpore (S5-P-S6) mit dem Prolin-Valin-Prolin (PVP) Motiv aus (Abb. 5). Dieses PVP-Motiv wirkt wie ein Gelenk (*hinge region*) und ermöglicht Konformationsänderungen. Mutationen im PVP-Motiv verändern die Spannungssensitivität der Kv-Kanäle (Li-Smerin *et al.*, 2000). Die Kv-Kanäle ähneln in ihren Eigenschaften den in *Drosophila melanogaster* beschriebenen Shaker Kanälen (Kamb *et al.*, 1987). Die schnelle Inaktivierung der Kv-Kanäle wird durch eine Region nahe dem N-Terminus, dem Inaktivierungspartikel, bewirkt (N-Typ-Inaktivierung) (Hoshi *et al.*, 1990; Hoshi *et al.*, 1991). Die langsame Inaktivierung wird durch Strukturen am C-Terminus bewirkt (C-Typinaktivierung). Die elektrophysiologischen und pharmakologischen Eigenschaften der homomeren Kanäle wurden durch Klonierung und funktionelle Expression bestimmt und korrelieren daher meist nicht mit den *in situ* vorkommenden Kaliumströmen. *In situ* werden diese Kanäle sowohl als Homo- als auch als Heterotetramere exprimiert und somit die Eigenschaften vermischt (Ruppertsberg *et al.*, 1990). Durch Assoziation von β -Untereinheiten werden zusätzlich die Inaktivierungseigenschaften verändert, α/β Kanäle inaktivieren sehr viel schneller als Kanäle ohne β -Untereinheit (Rettig *et al.*, 1994; Heinemann *et al.*, 1994).

Diese auswärtsrektifizierenden, spannungsabhängigen Kaliumkanäle werden nach bisherigen Untersuchungen nur in aktivierten Mikroglia exprimiert (Norenberg *et al.*, 1993;Norenberg *et al.*, 1992;Draheim *et al.*, 1999;Fischer *et al.*, 1995). Deshalb hat sich die Expression von K^+ -Auswärtsströmen als Aktivierungsparameter etabliert. Die Aktivierungsschwelle dieser Kanäle liegt bei -40 mV (Korotzer & Cotman, 1992;Norenberg *et al.*, 1993;Norenberg *et al.*, 1992;Norenberg *et al.*, 1994;Schlichter *et al.*, 1996;Visentin *et al.*, 1995). Bei Applikation von repetitiver Depolarisation ist eine Reduktion der Stromamplitude zu beobachten (Norenberg *et al.*, 1994). Durch Veränderung der extrazellulären K^+ -Konzentration, der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, Aktivierung der Proteinkinase C und Veränderung von extra- bzw. intrazellulärem pH-Wert kann der Auswärtstrom moduliert werden (Norenberg *et al.*, 1994;Visentin & Levi, 1997;Eder & Heinemann, 1996). Die auswärtsrektifizierenden Kaliumkanäle können durch 4-Aminopyridin (4-AP), Tetraethylammonium (TEA^+) (Eder *et al.*, 1995;Norenberg *et al.*, 1992;Norenberg *et al.*, 1994) sowie einige Peptidtoxine (Charybdotoxin, Kaliotoxin, Margatoxin, Noxiustoxin) geblockt werden (Eder *et al.*, 1995;Eder *et al.*, 1996).

Auf mRNA und Proteinebene konnte die Expression von Kv1.3 und Kv1.5 Kanälen in Mikroglia nachgewiesen werden (Pyo *et al.*, 1997;Jou *et al.*, 1998;Khanna *et al.*, 2001;Kotecha & Schlichter, 1999). Der in Mikrogliazellen exprimierte K^+ -Auswärtsstrom ähnelt in seinen kinetischen und pharmakologischen Eigenschaften dem Kv1.3 Kanal, dessen Expression auch auf RNA und Proteinebene nachgewiesen werden konnte. Durch den spezifischen Kv1.3 Kanal Blocker Margatoxin, welcher keinen Einfluss auf Kv1.5 Kanäle hat, konnte der nach LPS-Aktivierung exprimierte K^+ -Auswärtsstrom vollständig geblockt werden.

Funktionell scheinen diese Kanäle an der Aufrechterhaltung bzw. Wiederherstellung eines negativen Membranpotentials nach Depolarisation beteiligt zu sein (Norenberg *et al.*, 1992). Die Volumenregulation wird möglicherweise auch von auswärtsrektifizierenden Kaliumkanälen beeinflusst (Deutsch & Chen, 1993;DeCoursey *et al.*, 1984). Kv1.3 und Kv1.5 Kanäle sind außerdem an der Regulation der Proliferation beteiligt (Schlichter *et al.*, 1996).

G-Protein aktivierte Kaliumkanäle

Diese Kanäle können durch Perfusion mit Guanosintriphosphat (GTP)-gekoppeltes-Protein (G-Protein) aktivierenden Substanzen wie ATP, $C5a$, $TNF-\alpha$, Interferon- γ ($IFN\gamma$) oder epidermale Wachstumfaktor (*epidermal growth factor* EGF) aktiviert werden (Ilschner *et al.*, 1995). Diese Ströme weisen keinerlei zeitabhängige Aktivierung oder Inaktivierung auf (Ilschner *et al.*, 1996;Ilschner *et al.*, 1995). Durch Verwendung von Guanosin-5'-O-(3-thiotriphosphat)-Tetralithiumsalz $GTP\gamma S$ in der intrazellulären Lösung, einem konstanten Aktivator von G-Proteinen, konnte gezeigt werden, dass der exprimierte Kaliumeinwärtsstrom innerhalb von Minuten geblockt wurde. Gleichzeitig mit der Reduktion des Einwärtsstroms wurde ein Auswärtsstrom exprimiert (Ilschner *et al.*, 1995) Durch Inhibition der G-Proteine durch Pertus-

sistoxin (PTX) oder N-Ethylmaleimid können diese Ströme geblockt werden (Moller *et al.*, 1997). Die physiologische Bedeutung dieser Kanäle in der Mikroglia ist noch unklar.

HERG-ähnliche K⁺-Kanäle

Dieser bisher nur in einer Mikroglia-Zelllinie (MLS-9) beschriebene Kanal zeigt große Ähnlichkeit mit dem von Neuronen exprimierten *human ether-a-go-go-related gene* (Herg) -ähnlichen Kanal (Zhou *et al.*, 1998). Dieser Kanal weist eine schnelle Inaktivierung auf. Da in mikroglialen Primärkulturen dieser Kanal bisher nicht gefunden werden konnte, soll hier nicht weiter auf diesen Kanaltyp eingegangen werden.

1.5.2 Kalzium-Kanäle

In Mikrogliazellen wurden bisher zwei Arten von Ca²⁺ Kanälen beschrieben, spannungsabhängige (Colton *et al.*, 1994) und durch Ca²⁺ - Freisetzung aktivierte (*calcium release activated channels* CRAC) Ca²⁺-Kanäle (Norenberg *et al.*, 1997). Die beiden Kanaltypen unterscheiden sich außerdem in der Einzelkanalleitfähigkeit und ihrer Pharmakologie. Mikroglia besitzen außerdem ionotrope Purinorezeptoren die permeabel für Ca²⁺ und monovalente Kationen sind (Jiang *et al.*, 2003). Die Untersuchung der physiologischen Bedeutung dieser Kanäle steht noch aus.

1.5.3 Chlorid-Kanäle

Spannungsabhängige Chlorid-Kanäle sind in der Ganzzellkonfiguration nicht nachweisbar und konnten nur durch Einzelkanalmessungen in murinen (Eder, 1998), bovinen (McLarnon *et al.*, 1995), humanen (McLarnon *et al.*, 1997) und Mikroglia der Ratte (Schlichter *et al.*, 1996; Visentin *et al.*, 1995) detektiert werden. Die Einzelkanalleitfähigkeit beträgt 280-325 pS, sie inaktivieren langsam, wobei mit steigender Depolarisation die Inaktivierung schneller wird, die Aktivierung ist unabhängig von der intrazellulären Kalziumkonzentration (McLarnon *et al.*, 1997). Spannungsunabhängige Chloridkanäle konnten in Mikroglia von Ratte (Schlichter *et al.*, 1996), (Visentin *et al.*, 1995) und Maus (Eder, 1998) nachgewiesen werden. Diese Kanäle scheinen durch Dehnung der Zellmembran z.B. bei einer hypoosmotischen Zellvolumenzunahme aktiviert zu werden (Eder, 1998). Der dehnungsaktivierte Kanal weist eine Auswärtsrektifizierung auf, zeigt keine zeit- oder spannungsabhängigen Änderungen in der Aktivierung oder Inaktivierung und weist ein ausgedehntes Rundown-Phänomen auf, dass auf die Erschöpfung der intrazellulären ATP-Speicher zurückzuführen ist (Eder, 1998). Dieser Kanal scheint eine wichtige Rolle bei der Proliferation (Schlichter *et al.*, 1996) und Ramifizierung (Eder, 1998) zu spielen.

2 ZIELSETZUNG DER DISSERTATION

Neurone sind sehr empfindliche Zellen, die schon durch kleinste Veränderungen ihrer Umwelt geschädigt werden können. Deshalb benötigen diese Zellen ein sehr präzises und schnell aktivierbares Immunsystem, die Mikroglia. Diese Zellen müssen zum einen bei pathologischen Veränderungen sofort reagieren können, zum anderen müssen ihre Immunfunktionen jedoch sehr strikt reguliert sein um unnötige Schädigungen der Neurone zu vermeiden.

Kaliumströme scheinen eine wichtige Rolle bei dieser Regulation zu spielen, da sich das Kaliumstromprofil der Mikroglia während der Aktivierung drastisch ändert. Ramifizierte Mikroglia weisen nur eine geringe Kaliumleitfähigkeit auf, werden die Zellen jedoch aktiviert, kommt es zunächst zu einer Hochregulation der einwärts-rectifizierenden Kaliumströme und in einem zweiten Schritt der Aktivierung zu einer Expression von auswärtsrectifizierenden Kaliumströmen, welche dann auch mit der Induktion von Immunfunktionen wie z.B.: Stickstoffmonoxidproduktion einhergeht. Ob ein Zusammenhang zwischen der Änderung des Stromprofils und der Aktivierung der Immunfunktionen besteht soll im Rahmen dieser Arbeit geklärt werden. Außerdem ist von Interesse, welche Kanalproteine den Kaliumauswärtsstrom exprimieren. Durch gezielte Blockierung der spannungsaktivierten, auswärtsrectifizierenden K⁺-Stroms in LPS aktivierten Mikroglia mit Antisense-Oligonukleotiden bzw. durch den Knockout eines Kanalproteins sollen zum einen mit Hilfe der Patch-Clamp- Methode die exprimierten Ströme charakterisiert werden, zum anderen durch immunologische Verfahren wie dem Nachweis von NO bzw. der Bestimmung der Proliferationsrate ermittelt werden, ob Zellfunktionen durch die Expression der Kanäle moduliert werden. Der Einfluss von Kaliumströmen auf die Proliferation soll außerdem *in vivo* unter Verwendung eines Tiermodells, der Fazialisaxotomie, untersucht werden.

Wie bereits zu Beginn erwähnt, kann die Aktivierung der Mikroglia zu einer Schädigung von Neuronen durch Freisetzung neurotoxischer Stoffe führen, Neurone müssen deshalb Möglichkeiten haben die Aktivierung von Mikroglia strikt zu regulieren. Diese Regulation erfolgt möglicherweise über Neurotransmitter, da z.B: Dopamin, Noradrenalin oder Serotonin die Freisetzung neurotoxischer Stoffe aktivierter Mikroglia attenuierten. Auch diese Regulation scheint über die Modulierung von Kaliumströmen stattzufinden, da die Applikation von Neurotransmittern wie GABA oder Glutamat einen auswärtsrectifizierenden Kaliumstrom in Mikroglia aktiviert. Deshalb sollte in dieser Arbeit untersucht werden ob auch Dopamin, Noradrenalin und Serotonin eine Stromänderung in Mikroglia induzieren. Zusätzlich sollte untersucht werden ob auch Histamin-Applikation Stromänderungen bewirkt, da ermittelt wurde, dass die Infusion von Histamin in die Substantia nigra zu einer Aktivierung von Mikroglia führte. Um zu ermitteln, ob die Reaktion auf Neurotransmittern vom jeweiligen Aktivierungszustand abhängt, sollten zum einen *in situ* sowohl ruhende Mikroglia als auch bereits im Aktivierungsprozess befindliche amöboide Mikroglia

zum anderen *in vitro* Mikroglia aus Primärkulturen als ebenfalls aktivierte Mikroglia hinsichtlich der Expression der Neurotransmitter-Rezeptoren untersucht werden. Der methodische Schwerpunkt der liegt dabei ebenfalls in der Anwendung der Patch-Clamp Technik. Durch den Einsatz von molekularbiologischen Methoden (RT-PCR) sollte zunächst ermittelt werden ob und welche Neurotransmitter-Rezeptoren in den Zellen überhaupt exprimiert werden.