

4 ERGEBNISSE

4.1 Die Rolle der Kv1.5 und Kv1.3 Kaliumkanäle in der Mikroglia

Die Aktivierung von Mikrogliazellen in Kultur zeichnet sich unter anderem durch die Induktion eines auswärtsrektifizierenden K^+ Stroms aus (Norenberg *et al.*, 1992). Um zu untersuchen ob und in wieweit die beiden Kaliumkanäle, Kv1.5 und Kv1.3, an der Expression dieses Stroms beteiligt sind, wurden Mikrogliazellen durch Inkubation mit LPS-aktiviert. Die so behandelten Zellen wurden mittels Ganzzellableitung elektrophysiologisch charakterisiert.

Um zu ermitteln inwieweit Kv1.5 bzw. Kv1.3 Kanäle an der Expression des Kaliumauswärtsstroms beteiligt sind, und ob diese Kanäle die Eigenschaften aktivierter Mikroglia wie Proliferation oder NO-Freisetzung beeinflussen, sollte die Expression dieser Kanäle blockiert werden. Durch Verwendung von kanalspezifischen Antisense-Oligonukleotiden (AO), wurde die Expression von Kv1.5 oder Kv1.3 Kanälen reduziert. Um unspezifische Effekte der Oligonukleotide auszuschließen, wurde zusätzlich die Sense Sequenz der Kv1.5 mRNA verwendet, welche nicht an die mRNA binden kann.

Außerdem wurden Mikroglia von einem Kv1.5 Knockout Tier (Kv1.5^{-/-}) verwendet um zum einen die Ergebnisse des AO Kv1.5 Versuchs zu stützen, zum anderen *in vivo* Versuche zu ermöglichen. Kv1.3 Knockout-Mäuse existieren zwar, konnten aber leider nicht zur Verfügung gestellt werden.

4.1.1 Die Expression von Kv1.5 und Kv1.3 RNA

Da bisher noch nicht genau geklärt ist, welche Kv-Kanäle in Mikroglia exprimiert werden, sollte zunächst mittels Reversen Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) ermittelt werden ob und welche Kv mRNA in Mikroglia exprimiert wird, und ob durch Aktivierung der Mikroglia mit LPS für 24 h eine erhöhte Expression von Kv1.5 bzw. Kv1.3 mRNA induziert wird.

Kv1.5 und Kv1.3 RNA konnte sowohl in nichtaktivierten als auch in LPS-aktivierten Mikroglia-Kulturen (129SVEV) nachgewiesen werden (Abb. 13 A-C, links jeweils Spur 1 und 2). Dabei war das Kv1.5 Signal jedoch wesentlich schwächer als das von Kv1.3. Für Kv1.5 mRNA und Protein wurde eine extrem kurze Halbwertszeit von 0,5 bzw. 4 h ermittelt (Takimoto *et al.*, 1993), möglicherweise war deshalb weniger Kv1.5 RNA in den Extrakten vorhanden.

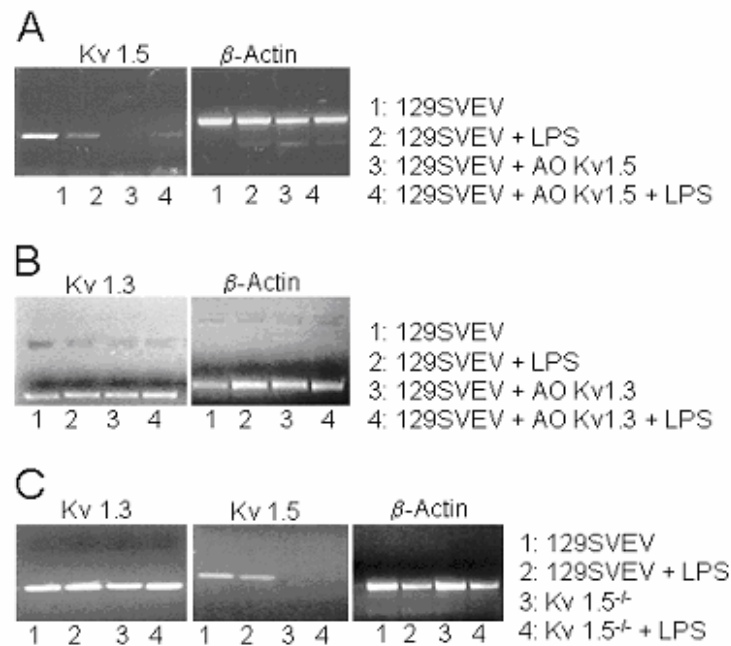


Abb. 13 Expression von Kv1.5 (A), Kv1.3 (B) und β -Aktin (C) Transkripten in LPS-aktivierten und nichtaktivierten Mikroglia

In den Kv1.5^{-/-} Mikroglia konnten keine Kv1.5 Transkripte amplifiziert werden (Abb. 13 C, Mitte, Spur 3 und 4). β -Aktin wurde jeweils als interner Standard verwendet (Abb. 13).

Zusätzlich sollte untersucht werden, ob die Reduktion der Expression von Kv1.5 oder Kv1.3 Kanälen durch Behandlung mit Antisense-Oligonukleotiden 12 h vor und während der LPS Aktivierung zu einer veränderten Expression der jeweiligen RNA (Kv1.5 bzw. Kv1.3) führt. Durch Behandlung der Mikroglia mit AO Kv1.5 konnte dessen Expression deutlich reduziert werden (Abb. 13 A, links, Spur 3 und 4) Behandlung mit AO Kv1.3 ergab hingegen keine erkennbare Reduktion der Expression. Dies könnte ebenfalls durch die bereits erwähnte extrem kurze Halbwertszeit der Kv1.5 RNA erklärt werden. Da das Expressionslevel von Kv1.5 bereits in den Kontrollzellen niedriger war als das von Kv1.3, hat die Behandlung mit Antisense-Oligonukleotiden natürlich auch unterschiedlich starke Effekte.

4.1.2 Einfluss des Kv1.5 und Kv1.3 Kanals auf den LPS induzierten auswärtsrektifizierenden K⁺ Strom

Da bisher unklar ist ob ein Zusammenhang zwischen Membranpotential und der Expression von Kaliumauswärtsströmen besteht, solle dies im Folgenden geklärt werden. Nach Ausbildung der "Ganzzell-Konfiguration" (siehe 3.1.7) wurde das Membranpotential durch Applikation eines Strompulses gemessen. In Abb. 14 sind die Mittelwerte der gemessenen Membranpotentiale graphisch, in den Tabellen die zugehörigen Werte dargestellt. Da die gemessenen Werte von unterschiedlichen

Mikroglia-Präparationen stammen, die in ihrem Aktivierungsgrad variieren, wurden immer nur die aus der gleichen Messreihe erhaltenen Werte miteinander verglichen. Das Membranpotential der mit Antisense-Oligonukleotid Kv1.5 behandelten Zellen (129SVEV AO Kv1.5) ist mit $-59,6 \pm 1,9$ mV signifikant negativer als das der unbehandelten Kontrollzellen (129SVEV; $-51,5 \pm 1,9$ mV; Abb. 14 ; Tab.5 im Anhang). Die Membranpotentiale der mit AO Kv1.3 behandelten Zellen (129SVEV AO Kv1.3) bzw. die der Kv1.5^{-/-} Zellen unterschieden sich nicht signifikant von denen der Kontrollzellen (Abb. 14 und C; Tab.6 ; Tab.7 im Anhang). Inkubation der Zellen mit SO Kv1.5 (129SVEV SO Kv1.5) hat keinen Effekt auf das Membranpotential (Abb. 14). Nach LPS-Aktivierung für 24 h (100 ng/ml) ist eine deutliche Depolarisierung des Membranpotentials der 129SVEV Zellen messbar (Abb. 14; Tab.5 im Anhang), wie bereits in anderen Arbeiten beschrieben (Pyo *et al.*, 1997; Chung *et al.*, 1998).

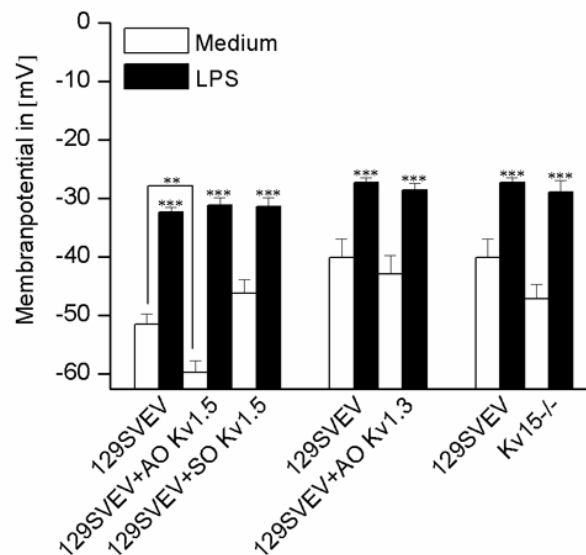


Abb. 14 Membranpotential von kultivierten Mikrogliazellen mit und ohne LPS-Behandlung, in denen entweder die Kv1.5 oder Kv1.3-Kanal Expression mit Antisense-Oligonukleotiden geblockt wurde, oder der Kv1.5 Kanal ausgeknockt war.

Das Membranpotential von AO Kv1.5 oder AO Kv1.3 behandelten, aktivierten Mikroglia bzw. Kv1.5^{-/-} Mikroglia unterschied sich nicht von dem der (Abb.5; Tab. 5-7 im Anhang) aktivierten Kontrollzellen (129SVEV LPS). Behandlung der Zellen mit SO Kv1.5 hatte keinen Effekt auf das Membranpotentials (Abb. 5 A; Tab.5 im Anhang). Die Behandlung der aktivierten Mikroglia mit kanalspezifischen Antisense-Oligonukleotiden bzw. der Knockout des Kv1.5 Kanals hatten keinen signifikanten Effekt auf das Membranpotential. Ob Kv1.5 bzw. Kv1.3 an der Expression des LPS-aktivierten Kaliumauswärtstroms beteiligt sind sollte durch Aktivierung des Stroms durch Applikation von depolarisierenden Spannungssprüngen überprüft werden. Zusätzlich wurden hyperpolarisierende Spannungssprünge appliziert, um eventuelle Veränderungen des Einwärtsstroms zu messen (Spannungsprotokoll1, vgl. Abb. 7). Die gemessenen Membranströme von LPS-aktivierten und nichtaktivierten Mikrogliazellen sind exemplarisch in Abb. 15 dargestellt.

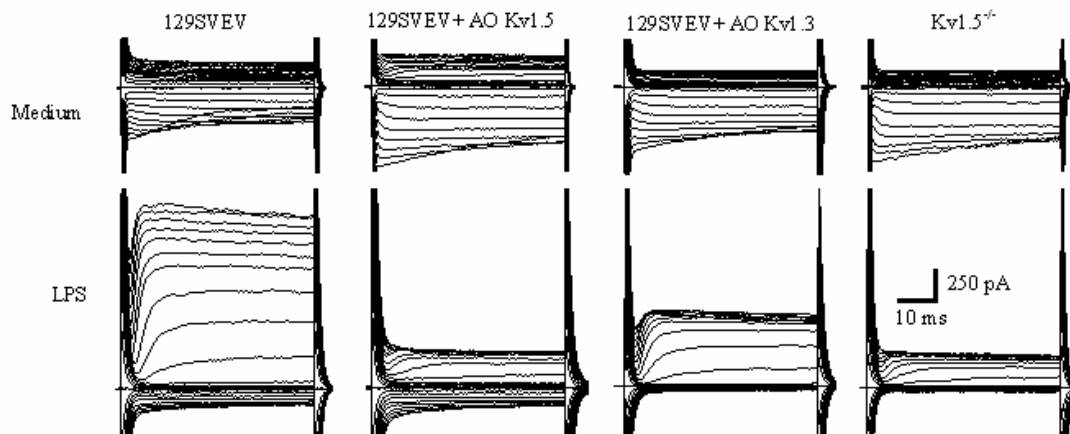


Abb. 15 Stromprofile von Kontrollzellen 129SVEV (links); Kv1.5 Antisense-Oligonukleotid behandelten Zellen (Mitte, links); Kv1.3 Antisense-Oligonukleotid behandelten Zellen (Mitte, rechts) und Kv1.5 Knock-out Mikroglia Zellen (Kv1.5^{-/-}rechts). Die oberen Stromprofile sind jeweils von Zellen die nicht mit LPS inkubiert wurden, die unteren Profile von LPS-behandelten Zellen.

Der deutlich ausgeprägte Einwärtsstrom (IR) von kultivierten Mikroglia ohne LPS-Behandlung (Abb. 15 obere Reihe) aktiviert bei Potentialen negativ von -80 mV. Bei Anlegen depolarisierender Potentiale wurde kein bzw. in einzelnen Fällen ein sehr geringer Auswärtsstrom registriert. Durch Behandlung der Zellen mit LPS ändert sich das Stromprofil der Mikroglia dahingehend, dass der IR deutlich reduziert wird und bei Potentialen positiver als -70 mV ein verzögert aktivierender Auswärtsstrom (*delayed rectifier* DR) gemessen werden kann (Abb. 15 untere Reihe). Um zu ermitteln, ob Kv1.5 bzw. Kv1.3 Kanäle an der Ausprägung diese Auswärtsstroms beteiligt sind sollte das Stromprofil von LPS-aktivierten Mikroglia erstellt werden, in denen diese Kanäle jeweils spezifisch durch Antisense-Oligonukleotide geblockt wurden oder der Kv1.5 Kanal ausgenockt wurde.

Durch Reduktion der Expression von Kv1.5 oder Kv1.3 Kanälen bzw. Knockout des Kv1.5 Kanals konnte, verglichen mit der Kontrolle (Abb. 15, links unten) eine deutliche Verminderung der nach LPS-Stimulation exprimierten Auswärtsströme gemessen werden (Abb. 15, unten). Um einen Überblick über alle untersuchten Zellen zu erhalten, wurden die erstellten Stromspannungskurven gemittelt (Abb. 16). In Abbildung 16 A wird deutlich, dass die Reduktion der Expression des Kv1.5 Kanals durch AO Kv1.5 eine nahezu völlige Blockierung des Kaliumauswärtsstroms in LPS-aktivierten Mikroglia zur Folge hat, da die Stromspannungskurve der AO Kv1.5 (129SVEV LPS+ AO Kv1.5) behandelten Zellen nahezu deckungsgleich ist mit der von nichtaktivierten 129SVEV Zellen. Mikroglia bei denen der Kv1.5 Kanal ausgeknockt wurde (Kv1.5^{-/-}), zeigen ebenfalls eine deutliche Reduktion in der Expression der Auswärtsstroms (Abb. 16 C). Demnach scheint der Kv1.5 Kanal an der Expression des Kaliumauswärtsstroms nach LPS-Aktivierung maßgeblich beteiligt zu sein. Die Reduktion der Expression des Kv1.3 Kanals scheint ebenfalls einen starken Effekt auf den LPS induzierten Kaliumauswärtsstrom zu haben, da auch hier eine deutliche

Reduktion erkennbar ist (Abb. 16 B). Da der exprimierte Auswärtsstrom der Mikroglia in dieser Versuchsreihe jedoch insgesamt etwas kleiner war, verglichen mit den anderen Versuchsreihen, erscheint der Effekt etwas kleiner.

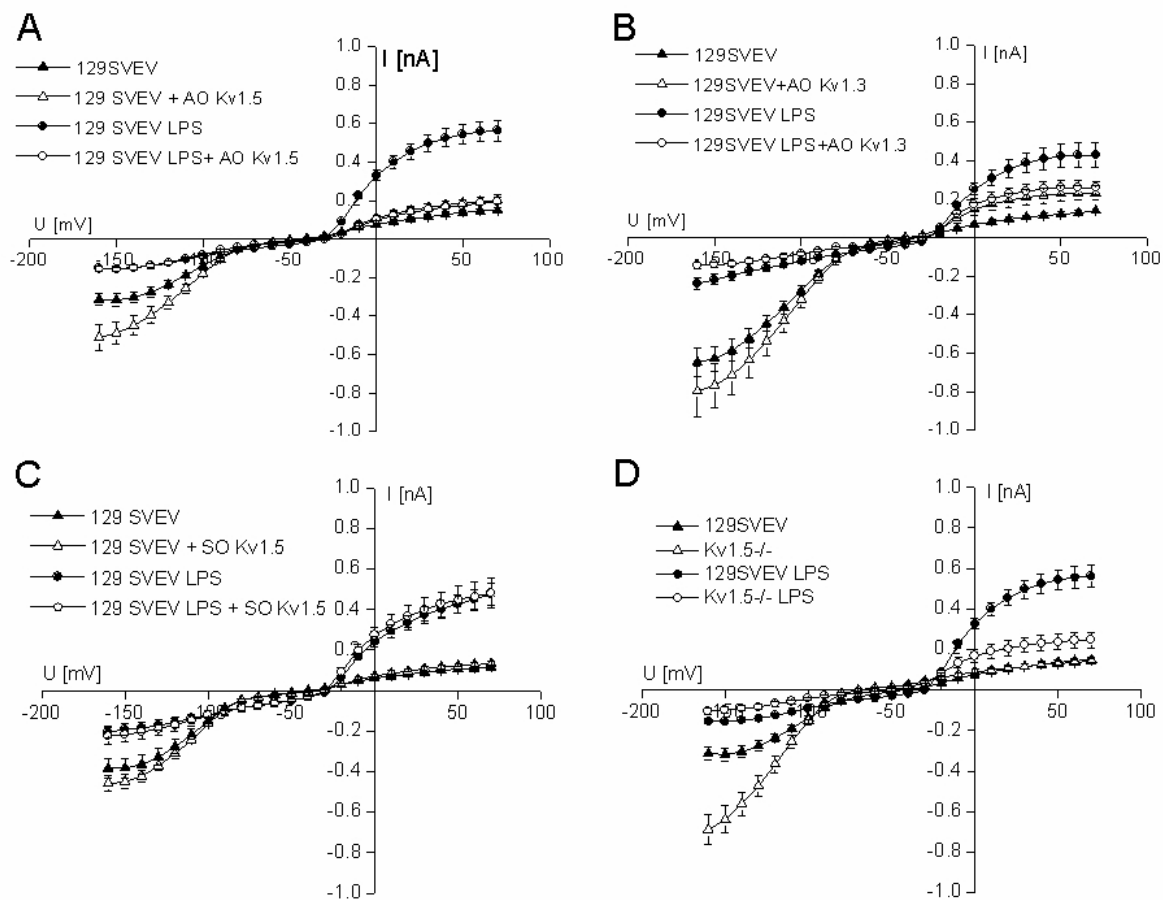


Abb. 16 Reduktion der Kaliumauswärtströme durch Blockierung der Expression von Kv1.3 bzw. Kv1.5 durch Antisense Oligonukleotide oder Knockout des Kv1.5 Proteins. Die gemittelten Stromspannungskurven \pm SEM von LPS-aktivierten und nichtaktivierten 129SVEV Zellen mit und ohne AO Kv1.5 (A), AO Kv1.3 (B), SO Kv1.5 (C) Behandlung, und von Kv1.5 Knockout (Kv1.5^{-/-}) Mikroglia (D) ist dargestellt.

Aufgrund der variablen Zellgrößen der kultivierten Mikroglia, sowie der deutlichen Morphologie-Änderung nach Aktivierung (vgl. 1.1) wurden aus den gemessenen Werten die Leitwerte (pS) der einzelnen Zellen berechnet (vgl. 3.4.3) und auf die Kapazität (pF) der jeweiligen Zelle bezogen. Die dadurch erhaltenen Stromdichten (pS/pF) konnten dann verglichen und signifikante Unterschiede ermittelt werden (Abb. 17). In den Tabellen 9. und 10. im Anhang sind die zu Abb. 17 gehörenden Zahlenwerte dargestellt, zusätzlich sind die Stromdichten der passiven Leitfähigkeiten bei -60 mV in Tabelle 8 angegeben. Die passiven Leitfähigkeiten der nicht mit LPS-aktivierten Zellen wiesen keine signifikanten Unterschiede auf. Bei den LPS-aktivierten Zellen unterschied sich nur die Leitfähigkeit, der mit AO Kv1.5 inkubierten Zellen (129SVEV / AO Kv1.5 LPS) signifikant von der der Kontrollzellen (129SVEV / LPS).

Da die untersuchten Mikrogliazellen ohne LPS-Aktivierung keine Kaliumauswärtsströme, sondern nur Kaliumeinwärtsströme exprimieren sollte die Reduktion der Expression von Kv1.5 bzw. Kv1.3 Kanälen keine Veränderungen in nichtaktivierten Zellen hervorrufen. Dies wird in Abb. 17 A und B ersichtlich. Die weißen Balken stellen dabei jeweils die bei -160 mV gemessenen Stromdichten dar, bei diesem stark hyperpolarisierenden Potential sind nur einwärtsrektifizierende Kaliumkanäle geöffnet (vgl. 1.5.1).

Dabei sind sowohl bei Behandlung mit AO Kv1.5 (Abb. 17 A) als auch mit AO Kv1.3 (Abb. 17 B) bzw. unter Verwendung von Kv1.5^{-/-} Mikroglia keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu den unbehandelten Zellen messbar. Behandlung der Zellen mit SO Kv1.5 (Abb. 17 A) erzeugte ebenfalls keinen signifikanten Effekt. Die schwarzen Balken stellen die Stromdichten bei +70 mV dar. Bei diesem stark depolarisierenden Potential sind nur auswärtsrektifizierende Kaliumkanäle geöffnet, es konnten jedoch keine Ströme gemessen werden, bei den dargestellten Werten handelt es sich lediglich um passive Leitfähigkeiten.

In Abb. 17 D-F sind die Stromdichten von LPS-aktivierten Zellen dargestellt. Daraus wird zunächst ersichtlich, dass es zu einer Veränderung im Strommuster der Kontrollzellen (129SVEV) durch die LPS-Aktivierung gekommen ist, d.h. bei +70 mV (schwarze Balken) hat sich die Stromdichte der LPS-aktivierten Zellen etwa verdreifacht (vgl. Tab.10 im Anhang), während bei -160 mV nur noch ein Drittel der Kontrollzell-Stromdichte vorhanden ist (vgl. Tab.9 im Anhang). Die Kontrollzellen exprimieren jetzt nur noch vermindert Kaliumeinwärtsströme, dafür aber Kaliumauswärtsströme. Betrachtet man dagegen Zellen, in denen die Expression des Kv1.5 bzw. Kv1.3 Kanals reduziert wurde (Abb. 17D und E) ist diese Veränderung zwar für die Kaliumeinwärtsströme zu beobachten, jedoch nicht für die Kaliumauswärtsströme.

Bei den AO Kv1.5 behandelten Mikroglia (129SVEV LPS + AO Kv1.5) war eine signifikante Reduktion der Stromdichte um 73,9% messbar, verglichen mit den Kontrollen (129SVEV LPS; Abb. 17 D). Ähnliches ist auch bei den Kv1.5^{-/-} Zellen zu beobachten, die Expression des Auswärtsstroms bleibt nahezu völlig aus (Reduktion um 69,9% verglichen mit 129SVEV LPS).

Zusätzlich konnte bei beiden Modellen, d.h. bei 129SVEV LPS + AO Kv1.5 sowie Kv1.5^{-/-} Mikroglia eine signifikante Reduktion des Einwärtsstroms ermittelt werden.

Blockiert man die Expression des Kv1.3 Kanals ist ebenfalls eine deutliche Reduktion des Kaliumauswärtstroms um 54,6% messbar (Abb. 17 F). Demnach scheint auch dieser Kanal an der Ausprägung des Kaliumauswärtstroms beteiligt zu sein. Eine signifikante Veränderung des Einwärtsstroms konnte hier jedoch nicht, wie bei AO Kv1.5 bzw. Kv1.5^{-/-} beobachtet werden.

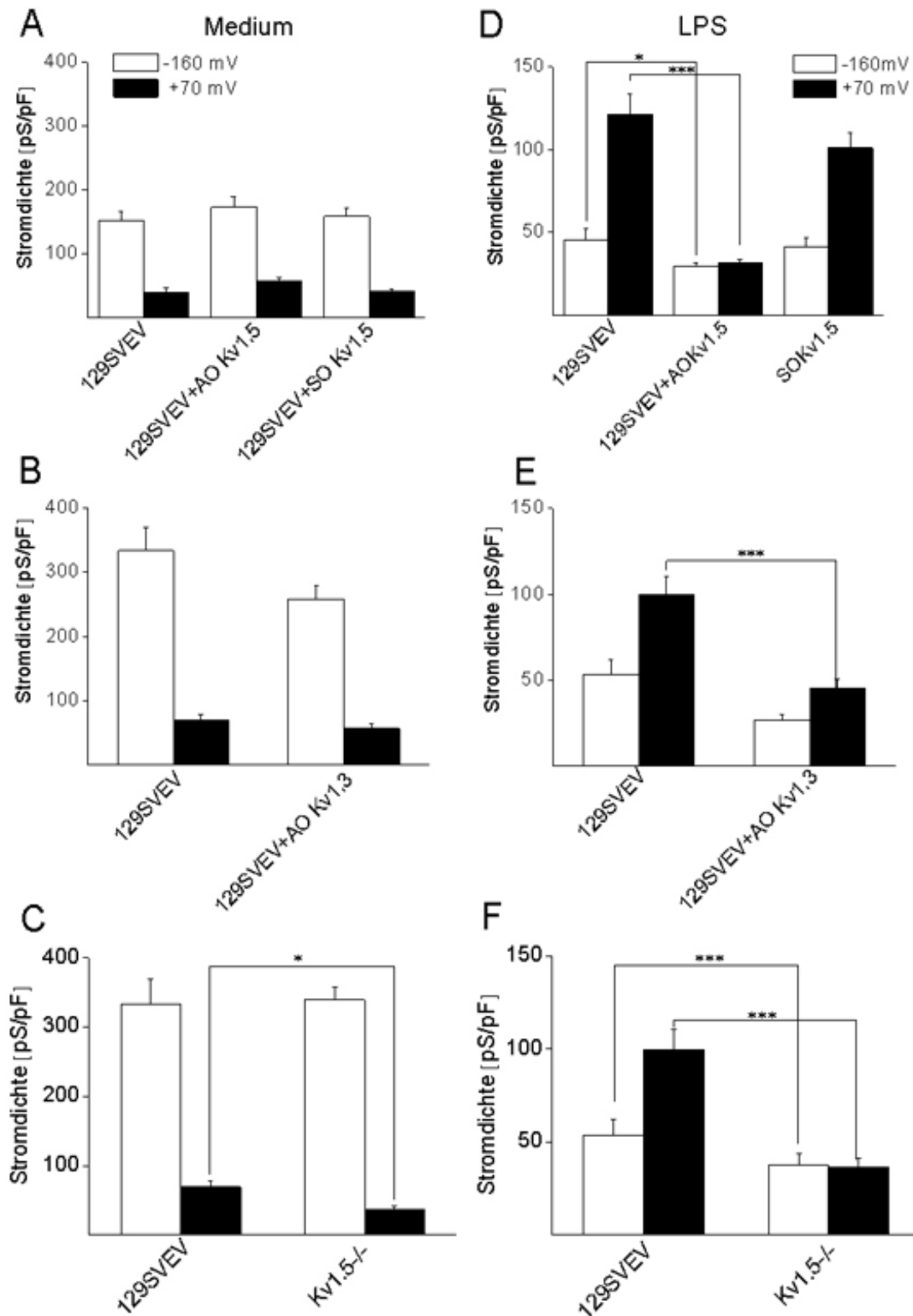


Abb. 17 Darstellung der Stromdichten [pS/pF] aus den Tabellen 8 -10 mit Angabe der Signifikanz. Die Mittelwerte \pm SEM der Stromdichten von LPS-aktivierten und nichtaktivierten Kontrollzellen (129SVEV) mit und ohne AO Kv1.5 (A, D), AO Kv1.3 (B, E), SO Kv1.5 (A, D) Behandlung, und von Kv1.5 Knockout (Kv1.5^{-/-}) Mikroglia (C, F) ist dargestellt.

4.1.3 Kinetische Charakteristika des Kaliumauswärtsstroms

Kv1.3 und Kv1.5 Kanäle unterscheiden sich in ihrem Aktivierungs- und Inaktivierungsverhalten. Um zu ermitteln, welche Kv-Kanäle in LPS-aktivierten Mikroglia exprimiert werden, sollten die kinetischen Eigenschaften bestimmt werden. Außerdem sollte so untersucht werden ob sich durch Blockierung von Kv1.5 bzw. Kv1.3 die kinetischen Eigenschaften verändern.

Aktivierung der Kv-Kanäle

Das Aktivierungsverhalten wurde durch Depolarisation für 500 ms von -70 mV bis auf +70 mV ausgehend von einem Haltepotential von -70 mV ermittelt (vgl. Abb. 18 A). Die erhaltenen Strom-Spannungskurven zeigen einen sigmoiden Verlauf und können durch die Boltzmann-Verteilung (vgl. 3.4.3) beschrieben werden. Dazu wurde aus den erhaltenen Messwerten die Leitfähigkeit berechnet, jeweils auf den Maximalwert normiert und über der Spannung aufgetragen. Die für die unterschiedlich behandelten Mikroglia-Kulturen (mit und ohne AO Kv1.5 oder AO Kv1.3) bzw. für Kv1.5^{-/-} Mikroglia erhaltenen Kurven wurden jeweils an eine Boltzmann-Funktion ($g/g_{MAX} = 1/(1 + \exp((V - V_{1/2})/k))$) angepasst und die Aktivierungsparameter aus der Gleichung abgelesen. Dabei liefert $V_{1/2}$ den Spannungswert, bei dem genau die Hälfte der Kanäle geöffnet ist. Der Wert k ist ein Maß für die Steilheit der Kurve und damit für die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung. Je steiler die Kurve, desto mehr Kanäle werden bei einer gegebenen Spannung aktiviert.

Durch frühere Untersuchungen konnte ermittelt werden, dass Kv1.5 Kanäle bei etwa -14 mV ($k = 12$ mV), Kv1.3 Kanäle jedoch schon bei -26 mV ($k = 7$ mV) halbmaximal aktiviert sind. Diese Werte wurden mit Hilfe von Zelllinien (NIH/3T3, L929) ermittelt, welche jeweils mit Kv1.5 oder Kv1.3 transfiziert wurden (Grissmer *et al.*, 1994).

Bei Mikroglia in Gewebeprints konnte für Kv1.5 Kanäle eine halbmaximale Aktivierung von -10,3 mV ($k = 13,9$ mV) und für Kv1.3 Kanäle von -27,1 mV ($k = 3$ mV) ermittelt werden (Kotecha & Schlichter, 1999). Bei murinen Mikroglia in Kultur, die durch TGF- β aktiviert wurden, konnte eine halbmaximale Aktivierung bei -27 mV ($k = 4,6$ mV) gemessen werden. Die Aktivierungsparameter der auswärts-rectifizierenden Kanäle wurden in den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuchen nur bei LPS-aktivierten Mikroglia bestimmt, da nur in diese Zellen Ströme durch solche Kanäle exprimierten.

In Abbildung 18 A ist eine exemplarische Ableitung von 129SVEV Mikroglia zur Bestimmung der Aktivierungskinetik dargestellt. Erstmals aktiviert der Kanal bei einem Potential von -30 mV, mit zunehmender Depolarisation vergrößern sich die Stromwerte.

In Abbildung 18 C sind die gemittelten und normierten Strom-Spannungskurven der verschiedenen Versuchsansätze dargestellt. Daraus wird ersichtlich, dass sich die Aktivierungseigenschaften durch Blockierung von Kv1.5 oder Kv1.3, bzw. durch den Knockout des Kv1.5 Kanals nicht signifikant ändern.

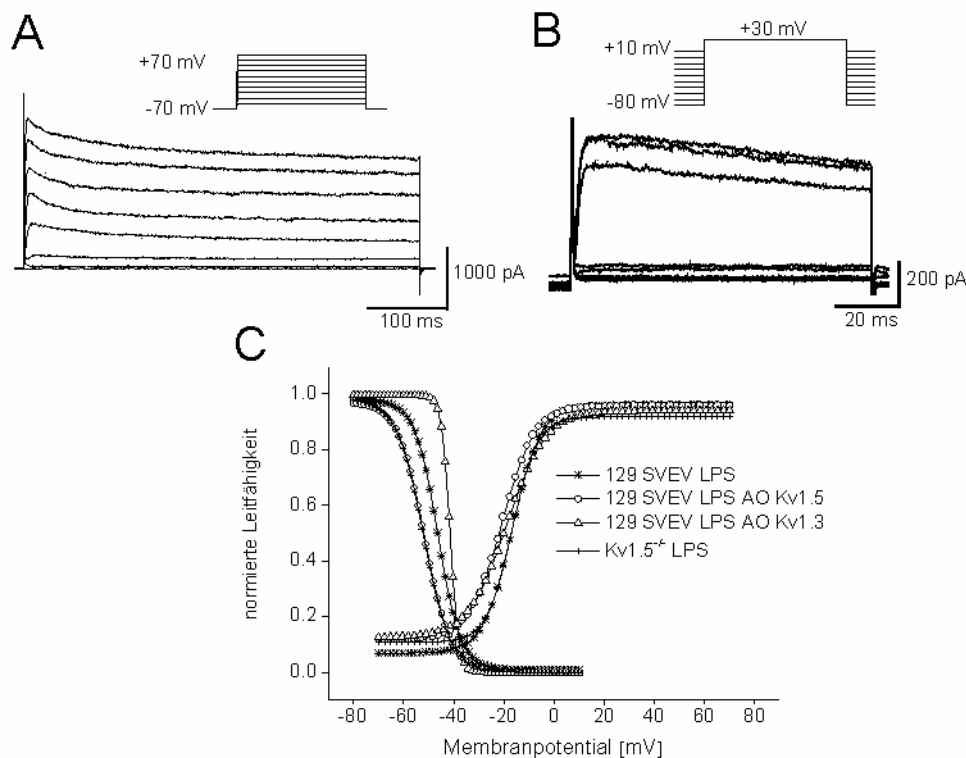


Abb. 18 Aktivierungs- und Inaktivierungsverhalten des LPS-induzierten Kaliumauswärtsstroms. **(A)** Aktivierung des Stroms durch Depolarisation von -70 mV bis auf +70 mV, in 20 mV Schritten, ausgehend von einem Haltepotential von -70 mV, mit jeweils 1 min Pause zwischen den Spannungssprüngen. Dargestellt ist die Ableitung von einer LPS-aktivierten 129SVEV Mikroglia. **(B)** Inaktivierung des, durch wiederholte Depolarisation auf +30 mV ausgelösten Stroms bei stufenweiser Änderung des Haltepotentials von -80 mV auf +10 mV. Dargestellt ist die Ableitung von einer LPS-aktivierten 129SVEV Mikroglia **(C)** Anpassung der Mittelwerte der normalisierten Stromamplituden an eine Boltzmann-Verteilung (durchbrochene Linie). Die dargestellte Boltzmann-Verteilung ist nur eine beispielhafte Darstellung, für jede Strom-Spannungskennlinie wurde eine einzelne Kurve berechnet.

Bei 129SVEV Mikroglia lag $V_{1/2}$ bei $-16,7 \pm 1,2$ mV ($n = 10$; Abb. 18 B) mit einer Steigung von $k = 5,6 \pm 0,6$ mV. Die mit AO Kv1.5 bzw. AO Kv1.3 behandelten LPS-aktivierten 129SVEV Zellen wiesen ein halbmaximales Aktivierungspotential von $-20,7 \pm 2,2$ mV ($n = 9$; $k = 6,4 \pm 1,2$ mV) bzw. $-18,8 \pm 2,1$ mV ($n = 9$; $k = 7,7 \pm 1,4$ mV) auf. Bei Kv1.5^{-/-} Mikroglia lag $V_{1/2}$ bei $-16,7 \pm 2,1$ mV ($n = 11$; $k = 4,9 \pm 1,3$ mV). Die ermittelten Werte liegen damit zwischen den für Mikroglia in Gewebeprints bzw. in Kultur berechneten.

Ein weiteres Merkmal der Kv-Kanäle ist die spannungsabhängige Inaktivierung. Die durch Depolarisation aktivierten Kanäle schließen bereits wieder, während die Depolarisation noch anhält. Diese Inaktivierung findet mit zeitlicher Verzögerung von wenigen Millisekunden nach ihrer Aktivierung statt. Die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung soll im Gleichgewichtszustand (*steady-state*) bestimmt werden. Durch Sprünge zu unterschiedlichen Potentialen werden die Kanäle unterschiedlich

stark inaktiviert. Zur Ermittlung der halbmaximalen Inaktivierung der untersuchten Kaliumauswärtströme wurden die Mikroglia von unterschiedlichen Haltepotentialen ausgehend auf +30 mV depolarisiert. Durch dieses Protokoll werden Ströme ausgelöst, deren Amplitude durch das Ausmaß der Inaktivierung im vorhergehenden Haltepotential bestimmt wird (Abb. 18B).

Die in der Literatur angegebenen Werte für die *steady-state* Inaktivierung lagen für den Kv1.5 Kanal bei -29,4 mV ($k = 8,8$ mV), für den Kv1.3 Kanal bei -38,2 mV ($k = 9,1$ mV; (Kotecha & Schlichter, 1999). In kultivierten, TGF- β stimulierten Mikroglia lag die *steady-state* Inaktivierung bei -38 mV, $k = 4,3$ mV (Schilling *et al.*, 2000). Die *steady-state* Inaktivierung von den, im Rahmen dieser Arbeit untersuchten LPS-aktivierten Mikroglia (129SVEV LPS) unterschied sich mit einem Wert von $-46,3 \pm 1,84$ mV ($k = 4,52 \pm 1,29$ mV; $n = 3$;) nicht signifikant von den mit AO Kv1.5 ($-42,5 \pm 1,9$ mV; $k = 2,7 \pm 1,7$ mV; $n = 3$) bzw. AO Kv1.3 ($-41,4 \pm 3,9$ mV; $k = 1,69 \pm 4,65$ mV; $n = 3$) behandelten, ebenfalls LPS-aktivierten Mikroglia (Abb. 18C). Kv1.5^{-/-} Mikroglia unterschieden sich mit einer halbmaximalen Inaktivierung bei $-52 \pm 3,2$ mV ($k = 5,3 \pm 0,9$ mV; $n = 3$) auch nicht signifikant von den untersuchten 129SVEV Mikroglia (Abb. 18C). Die erhaltenen Werte sind jedoch deutlich negativer als in der Literatur beschrieben. Für kultivierte, LPS-aktivierte Mikroglia wurde eine *steady-state* Inaktivierung von -48 mV, $k = 7,9$ ermittelt (Norenberg *et al.*, 1994).

Kumulative Inaktivierung

Kumulative Inaktivierung ist ein charakteristisches Merkmal von Kv1.3 Kanälen, Kv1.5 Kanäle weisen diese Eigenschaft nicht auf (Kotecha & Schlichter, 1999). Durch repetitive Depolarisation wird ein Verschluss der äußeren Kanalpore ausgelöst. Dieser kumulative Effekt ist stark von der Frequenz abhängig, mit welcher die Zelle depolarisiert wird, d.h. die Zeit zwischen den Depolarisationspulsen sollte möglichst kurz (1-10 s) sein. Um zu ermitteln, ob die in den untersuchten Zellen exprimierten Kaliumkanäle kumulative Inaktivierung zeigen und dadurch Kv1.3 oder Kv1.5 zugeordnet werden können, wurden die Mikroglia von einem Haltepotential von -100 mV mit einer Frequenz von 0,1 Hz wiederholt auf +20 mV depolarisiert (Abb. 19 A). Die erhaltenen Werte wurden auf den Maximalstrom normiert und in Abbildung 19 B über der Zeit aufgetragen. Dadurch konnte ermittelt werden, dass die, nach LPS-Aktivierung, exprimierten Kaliumkanäle kumulative Inaktivierung zeigen. In Abbildung 19 A ist eine exemplarische Ableitung einer LPS-aktivierten 129SVEV Mikroglia dargestellt, daran wird deutlich, dass die Amplitude lediglich nach der zweiten Depolarisation etwas reduziert ist, bei der 4-6 Depolarisation bleibt die Stromamplitude in etwa gleich. Dieses Verhalten konnte auch in den mit AO Kv1.5 oder AO Kv1.3 behandelten Zellen bzw. den Kv1.5^{-/-} Mikroglia beobachtet werden. Die Zusammenfassung der Ergebnisse in Abbildung 19 B zeigt, dass durch die Blockade von Kv1.5 oder Kv1.3 bzw. den Knockout des Kv1.5 Kanals keine signifikante Veränderung der kumulativen Eigenschaften hervorgerufen werden konnte.

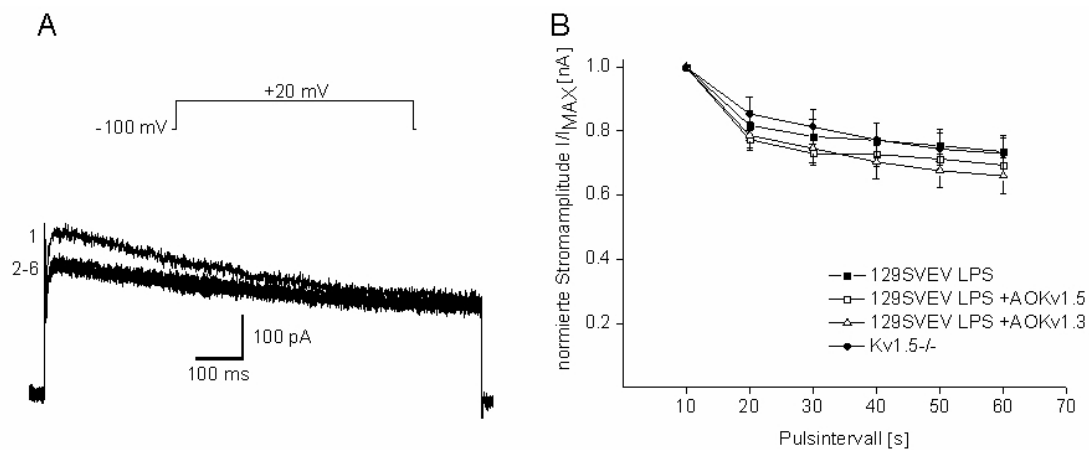


Abb. 19 Kumulative Inaktivierungseigenschaften der LPS-aktivierten Kv-Kanäle. Die Zellen wurden ausgehend von einem Haltepotential von -100 mV für 500 ms auf +20 mV geklemmt. Dieses Sprungprotokoll wurde mit einem Intervall von 10 s 6 Mal appliziert. (A) zeigt eine exemplarische Ableitung der Ströme einer LPS-aktivierten 129SVEV Mikroglia. Die Sprungintervalle sind durch die Zahlen 1-6 angegeben. Der gemessene Strom wurde jeweils auf den Maximalstrom normiert. Die erhaltenen Mittelwerte \pm SEM wurden über den entsprechenden Interpulsintervallen aufgetragen und in B dargestellt.

Anhand dieser Ergebnisse kann man den exprimierten Kanal nicht eindeutig zuordnen, da zwar eine leichte Inaktivierung zu beobachten ist, diese jedoch sehr gering ist im Vergleich zu den in der Literatur angegebenen Werten, wo bereits nach der zweiten bis vierten Depolarisation nur noch etwa die Hälfte der maximalen Stromamplitude vorhanden ist (Grissmer *et al.*, 1994; Kotecha & Schlichter, 1999). Für einen nur durch Kv1.3 Kanäle exprimierten Strom sollte eine deutlich stärkere Inaktivierung messbar sein. Bei einer alleinigen Expression von Kv1.5 Kanälen sollte keine Inaktivierung stattfinden.

4.1.4 Der Kv1.5 Kanal reguliert die NO-Freisetzung

LPS-Stimulation induziert in Mikrogliazellen die Produktion und Freisetzung von Stickstoffmonoxid, einem wichtigen Indikator der Aktivierung dieser Zellen. Um zu ermitteln, ob die Expression des Kv1.5 bzw. Kv1.3 Kanals einen Einfluss auf die NO-Freisetzung hat, wurde zum einen die Expression des NO-synthetisierenden Enzyms induzierbare NO-Synthase (iNOS) mit Hilfe der RT-PCR untersucht, zum anderen die NO-Freisetzung durch die Griess-Reagenz von AO Kv1.5 oder AO Kv1.3 behandelten Mikroglia bzw. von Kv1.5^{-/-} Mikroglia gemessen.

Mikrogliazellen, welche nicht mit LPS-aktiviert wurden, wiesen weder im Kontroll (129SVEV) - noch im Knockout (Kv1.5^{-/-}) - oder im AOKv1.5- bzw. AOKv1.3-Versuchsansatz eine Bande für iNOS auf (Abb. 20 A-C). Nach Aktivierung mit LPS für 24 h /100 ng/ml) konnte eine deutliche Bande in Kontrollzellen detektiert werden. In Kv1.5^{-/-} Mikroglia und in AO Kv1.5 behandelten Mikroglia war die Bande deutlich schwächer (Abb. 20 A und C). AO Kv1.3 behandelte, LPS-aktivierte Mikroglia zeigten dagegen eine deutliche iNOS -Bande (Abb. 20 B).

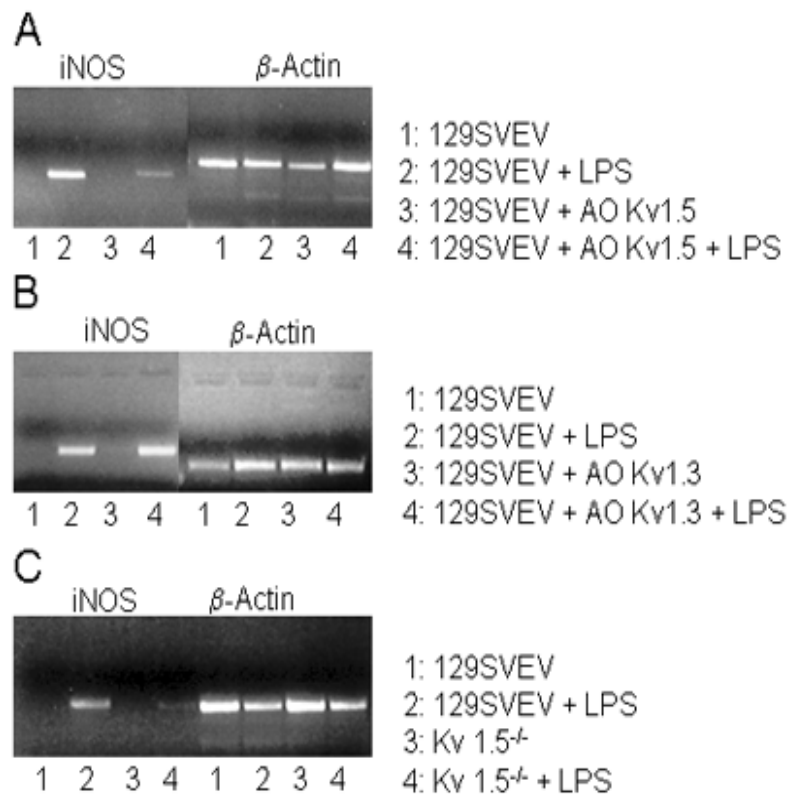


Abb. 20 Expression der induzierbaren NO-Synthase in LPS-aktivierten und nichtaktivierten Mikroglia, mit und ohne AO Kv1.5 oder Kv1.3 Behandlung bzw. in Kv1.5^{-/-} Mikroglia

Da bereits auf mRNA-Ebene ein Zusammenhang zwischen Kv 1.5 Kanal-Expression und iNOS-Expression gefunden werden konnte, sollte ermittelt werden, ob auch die NO-Freisetzung durch Blockierung der Kv 1.5 Kanäle reduziert werden kann. Dazu wurden die Mikroglia mit LPS-aktiviert und nach 24 h der NO-Gehalt im Medium dieser Zellen gemessen. Der NO-Gehalt der Antisense-Oligonukleotid behandelten Mikroglia wurde auf den Proteingehalt normiert, da es zu einer starken Erhöhung der Proliferationsrate kam (vgl. 4.1.5). Bei Kv1.5^{-/-} Mikroglia war die Proliferation nicht erhöht, deshalb wurden diese Werte nicht auf den Proteingehalt normiert.

In Kontrollzellen (129SVEV) konnte nach Inkubation mit LPS für 24 h NO-Freisetzung nachgewiesen werden. Durch die Reduktion der Kv1.5 Expression mit Antisense-Oligonukleotiden (129SVEV + AO Kv1.5) wurde die NO-Freisetzung signifikant um 34% reduziert (Abb. 21 A). Um diese Ergebnisse zu untermauern wurden auch Kv1.5 Knockout Mikroglia (Kv1.5^{-/-}) hinsichtlich der NO-Freisetzung untersucht. In den Überständen der Kv1.5^{-/-} Mikroglia konnte kein NO nachgewiesen werden (Abb. 21 B), d.h. die NO-Freisetzung war in diesen Zellen vollständig inhibiert. Die Knockout-Daten bestätigen die durch Behandlung mit AO Kv1.5 erzielten Ergebnisse. Da Antisense-Oligonukleotide nicht von allen Zellen aufgenommen werden und selbst in den Zellen, die es aufnehmen meist nicht zu einer totalen Inhibition der Expression des gewünschten Proteins führen, konnte hier keine 100% ige Blockierung der NO-Freisetzung erreicht werden.

Da auch die Expression des NO synthetisierenden Enzyms in beiden Versuchsansätzen reduziert ist, muss ein funktioneller Zusammenhang zwischen Kv1.5 Expression und NO-Freisetzung bestehen. Der Nachweis, dass Oligonukleotide keine unspezifischen Effekte auf die NO-Freisetzung haben wurde mit Hilfe eines Sense-Oligonukleotids erbracht, welches nicht an die RNA binden kann (SO Kv1.5 Abb. 21 A).

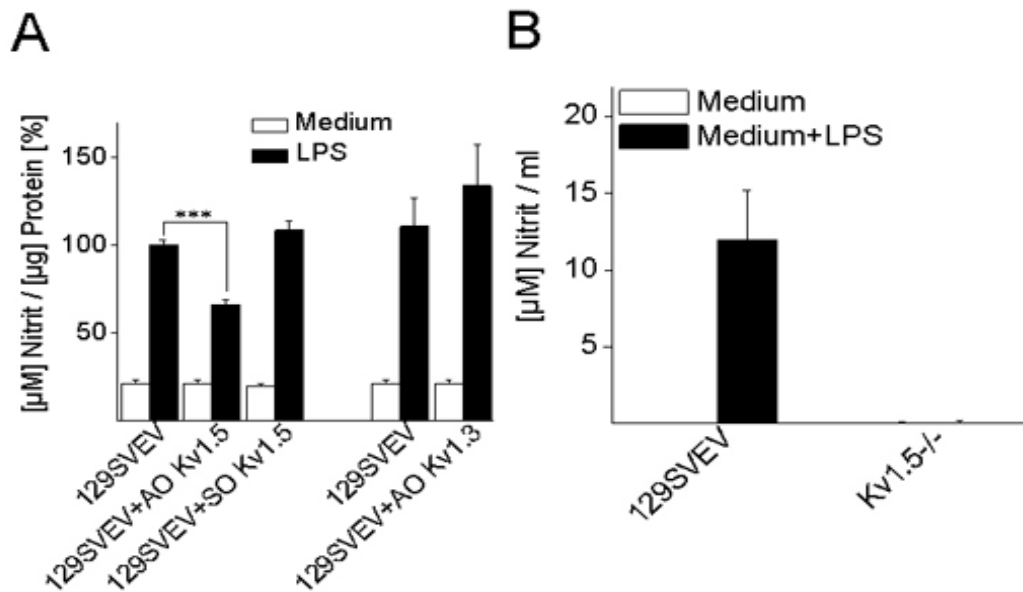


Abb. 21 Stickstoffmonoxid-Freisetzung in Mikroglia. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM der NO-Freisetzung normalisiert auf den Proteingehalt von LPS-aktivierten (schwarze Balken) und nichtaktivierten (weiße Balken) 129SVEV Zellen mit und ohne AO Kv1.5, AO Kv1.3, SO Kv1.5 Behandlung (A). Die Werte der LPS-aktivierten 129SVEV-Zellen wurden jeweils auf 100 % gesetzt. (B) zeigt die NO-Freisetzung von Kv1.5 Knockout (Kv1.5^{-/-}) Mikroglia in $\mu\text{M}/\text{ml}$. (*) Diese Werte wurden freundlicherweise von Dr. K. Färber zur Verfügung gestellt.

Die Reduktion der Kv1.3 Expression zeigte keinen Effekt auf die NO-Freisetzung (129SVEV+AO Kv1.3; Abb. 21 A). Da auch keine Reduktion von iNOS nachgewiesen werden konnte, scheint dieser Kanal keinen Einfluss auf die NO-Freisetzung zu haben.

4.1.5 Kv1.5 und Kv1.3 Kanäle modulieren die Proliferation in Mikroglia

LPS-Stimulation aktiviert kultivierte Mikroglia und reduziert die Proliferationsrate um 40-60% (Ganter *et al.*, 1992). Da LPS auch die Expression eines Auswärtskaliumstroms induziert, sollte untersucht werden, ob möglicherweise ein Zusammenhang zwischen Proliferation und Kv 1.5 bzw. Kv1.3 Kanalexpression besteht. Um den Effekt des Kv1.5 Kanals auf die Proliferation von Mikrogliazellen zu untersuchen, wurde die Proliferationsrate unter Verwendung des BrdU-Assays ermittelt. Die Proliferationsrate von unbehandelten Kontrollzellen wurde auf 100 % gesetzt.

In Kontrollzellen (129SVEV) wurde die Proliferationsrate wie bereits in der Literatur beschrieben (Ganter *et al.*, 1992) durch LPS-Behandlung um 32,3% reduziert (n=21;

Abb. 22, schwarzer Balken). Durch Reduktion der Kv1.5 Expression mit Hilfe von Antisense-Oligonukleotiden konnte die Proliferation in LPS behandelten (129SVEV+AO Kv1.5, schwarzer Balken) als auch in unbehandelten Mikroglia (129SVEV+AO Kv1.5, weißer Balken) signifikant erhöht werden ($119,7 \pm 3,1\%$ bzw. $119 \pm 2,6\%$; $n = 22$), verglichen mit den Kontrollzellen. Demnach scheint der Kv1.5 Kanal Einfluss auf die Regulation des Zellzyklus zu haben. Um diese Ergebnisse zu untermauern wurden auch Kv1.5 Knockout-Mikroglia hinsichtlich ihrer proliferativen Eigenschaften untersucht. Im Vergleich zu den Kontrollzellen wiesen die unbehandelten Kv1.5^{-/-} Mikroglia jedoch keine erhöhte Proliferationsrate auf (129SVEV und Kv1.5^{-/-}, weiße Balken).

Durch LPS-Aktivierung konnte aber keine signifikante Reduktion der Proliferationsrate in Kv1.5^{-/-} Mikroglia herbeigeführt werden. Das bedeutet, dass LPS-aktivierte Kv1.5^{-/-} Mikroglia (Kv1.5^{-/-}; Abb. 22 schwarzer Balken), verglichen mit ebenfalls aktivierten Kontrollzellen (129SVEV; Abb. 22 schwarzer Balken), eine erhöhte Proliferationsrate aufweisen, diese liegt mit 92,9% (Abb. 22) nahe dem Wert der nichtaktivierten Kontrollzellen (129SVEV; Abb. 22 weißer Balken) bzw. der nichtaktivierten Kv1.5^{-/-} Mikroglia.

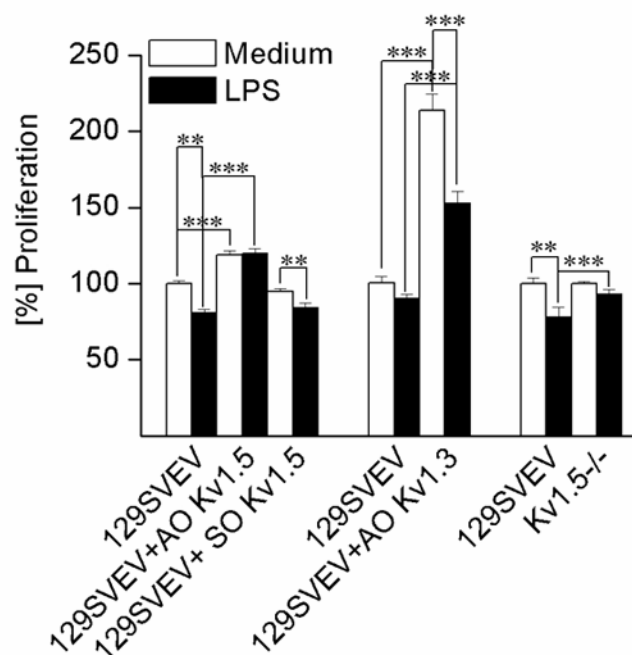


Abb. 22 Proliferation von Mikrogliazellen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM der Proliferationsrate von LPS-aktivierten (schwarze Balken) und nichtaktivierten (weiße Balken) 129SVEV Zellen mit und ohne AO Kv1.5, AO Kv1.3, SO Kv1.5 Behandlung bzw. von Kv1.5^{-/-} Mikroglia. Die Proliferation der Kontrollzellen ohne LPS wurde jeweils auf 100% gesetzt. (*) Diese Werte wurden freundlicherweise von Dr. K. Färber zur Verfügung gestellt.

Demnach bewirkt der Knockout des Kv1.5 Kanals zwar keine Erhöhung der Proliferationsrate in unstimulierten Mikroglia, wie die akute Blockierung der Expression des Kv1.5 Kanals, jedoch kann durch Aktivierung der Mikroglia durch LPS wie bei

AO Kv1.5 behandelten Zellen keine Reduktion der Proliferation herbeigeführt werden. Die Reduktion der Expression des Kv1.3 Kanals verdoppelte die Proliferationsrate von nicht mit LPS behandelten Zellen (129SVEV+AO Kv1.3; $213,9 \pm 10,5\%$; $n = 12$; Abb. 22 weißer Balken). Eine leichte, aber signifikante Reduktion der Proliferationsrate (28,8%) durch LPS konnte in den mit AO Kv1.3 behandelten Zellen jedoch beobachtet werden ($152,5 \pm 8\%$; Abb. 22 schwarzer Balken). Demnach scheint der Kv1.3 Kanal zwar ebenfalls an der Regulation des Zellzyklus beteiligt zu sein, jedoch in einem anderen Maß als der Kv1.5 Kanal.

Die Behandlung der Mikroglia mit SO Kv1.5 in Kombination mit LPS oder allein bewirkte keine Veränderung der Proliferationsrate (Abb. 22). Unspezifische Effekte der Oligonukleotide können demnach ausgeschlossen werden.

4.1.6 Induktion der Proliferation von Mikroglia durch Fazialisnerv-Axotomie in Kv1.5^{-/-} Tieren

Da in kultivierten Mikroglia (*in vitro*) ein Effekt der Kv1.5 Expression auf die Proliferation gefunden werden konnte, sollte auch am lebenden Tier (*in vivo*) nachgewiesen werden, ob ein Zusammenhang besteht. Im gesunden Gehirn sind Mikroglia ramifiziert und proliferieren nicht. Demnach musste ein Schädigungsmodell gewählt werden, bei welchem vor allem die Proliferation der Mikroglia aktiviert wird. Deshalb wurde die Fazialisnerv-Axotomie (Blinzinger & Kreutzberg, 1968) gewählt, da dadurch die Proliferation von Mikrogliazellen im Fazialiskern der behandelten Hirnhälfte induziert wird. Die Proliferationsrate der Mikroglia erreicht ihre Plateauphase 3 Tage postoperativ (Raivich *et al.*, 1994). Der Vorteil von diesem Modell ist, dass die Blut-Hirn-Schranke intakt bleibt, es also nicht zu einer Verfälschung der Ergebnisse durch einwandernde Makrophagen aus dem Blut kommen kann.

Bei jeweils 6 adulten Knockout (Kv1.5^{-/-}) - und 6 Kontrolltieren (129SVEV) wurde der Fazialisnerv durchtrennt und nach 3 Tagen Gefrierschnitte des Fazialiskerns angefertigt. Mikroglia wurden durch Immunfärbung mit Iba-1 identifiziert, zusätzliche Immunfärbung mit Ki67, einem Marker für Proliferation, ermöglichte die Identifikation von proliferierenden Zellen (Abb. 23).

In Kontrolltieren (129SVEV) konnten sowohl Iba-1 als auch Ki67 positive Mikroglia im Fazialiskern nachgewiesen werden, demnach führte die Durchtrennung des Nervs wie erwartet zu einer Induktion der Proliferation der Mikroglia, d.h. 37,1% der Iba-1 gefärbten Mikroglia waren zusätzlich Ki67 positiv, während im Fazialiskern der nichtlädierten Seite keine Ki67 Färbung detektiert werden konnte.

In Gewebeschnitten der Kv1.5^{-/-} konnten, mit 59,7% doppelt positiven Mikroglia, nahezu 1,5 Mal so viele proliferierende Zellen ausgezählt werden (Abb. 23).

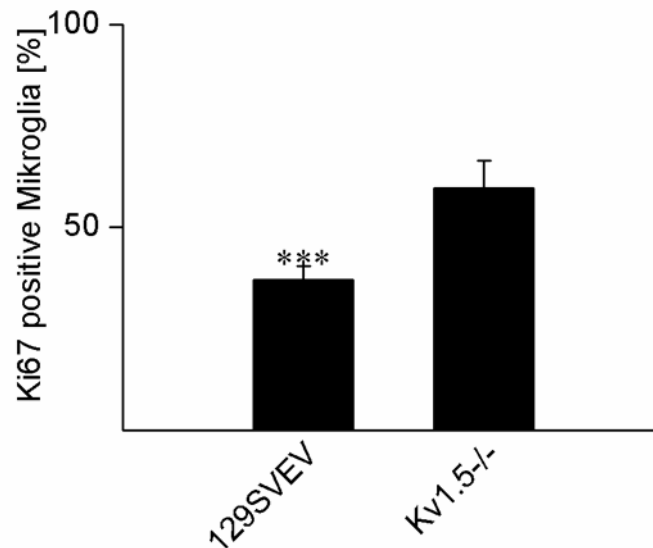


Abb. 23 Proliferation von Mikrogliazellen nach Fazialisnerv-Axotomie. Dargestellt sind die Mittelwerte der Anzahl proliferierender (Ki67 positiv) Mikroglia (Iba-1 positiv) im Fazialiskern von 129SVEV und Kv1.5^{-/-} Tieren nach Fazialisnerv-Axotomie. (*) Diese Werte wurden freundlicherweise von Dr. C. Nolte und Dr. K. Färber zur Verfügung gestellt.

Demnach konnte der *in vitro* gefundene Zusammenhang zwischen der Expression des Kv1.5 Kanals und der Proliferationsrate aktivierter Mikroglia auch *in vivo* nachgewiesen werden. Demnach konnte durch 3 verschiedene Modelle (AO Kv1.5-Behandlung von kultivierten Mikroglia, kultivierte Kv1.5^{-/-} Mikroglia, Fazialisnerv-Axotomie in Kv1.5^{-/-} Tieren) bewiesen werden, dass der Kv1.5 Kanal die Proliferation reguliert. Der Fazialiskern auf der kontralateralen Seite wies in Wildtyp- und Kv1.5^{-/-}-Tieren keine signifikante Ki67 Färbung auf, d.h. auf der unbehandelten Seite wurde keine Proliferation induziert.

Die Gesamtanzahl der Iba-1 positiven Zellen im Fazialiskern von Kv1.5^{-/-} und 129SVEV-Tieren war nicht signifikant unterschiedlich, sowohl auf behandelter, als auch auf unbehandelter Seite. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass in den Kv1.5^{-/-} Tieren möglicherweise weniger Mikroglia aktiviert wurden und in den Fazialiskern eingewandert sind, diese aber umso massiver proliferieren, demnach die Gesamtzellzahl nach Axotomie gleich ist.

Um zu ermitteln, ob der Knockout des Kv1.5 Kanals zu einer Veränderung der Mikroglia-Dichte im Gehirn führt, wurden noch in drei weiteren Hirnarealen die Iba-1 positiven Zellen ausgezählt. Im Hippokampus und dem Corpus callosum konnte kein Unterschied in der Mikroglia-Dichte zwischen Kv1.5^{-/-} und 129SVEV Tieren festgestellt werden. Nur im Striatum war die Zahl der Iba-1 positiven Zellen im Kv1.5^{-/-} Tier signifikant ($P=0.03$) vermindert ($26,97 \pm 1,43$ iba-1 positive Zellen), im Vergleich zur Kontrolle ($32,48 \pm 2,33$ iba-1 positive Zellen). Die Morphologie der Mikrogliazellen war in beiden Gruppen gleich, sowohl auf der behandelten als auch auf der unbehandelten Seite. Diese Ergebnisse wurden freundlicherweise von Dr. C. Nolte und Dr. K. Färber zur Verfügung gestellt.

4.2 Expression von Neurotransmitter-Rezeptoren auf Mikrogliazellen

Im vorangegangenen Teil der Arbeit sollte ermittelt werden, inwieweit Kaliumkanäle die Aktivierung der Mikroglia beeinflussen. Im Folgenden soll nun näher auf eine mögliche Interaktion zwischen Neuronen und Mikroglia eingegangen werden.

Damit Mikroglia und Neurone miteinander interagieren können, benötigen sie Mechanismen zur Signalübertragung. Neurone kommunizieren untereinander und mit anderen Zellen wie z.B. Astrozyten durch die Ausschüttung von Neurotransmittern. Mikroglia benötigen demnach, um ebenfalls neuronale Signale empfangen zu können Rezeptoren für diese Neurotransmitter. Einige dieser Rezeptoren (z.B. GABA, Glutamat) wurden bereits auf Mikroglia identifiziert (vgl. 1.4). Über die Expression von Rezeptoren für weitere bedeutende Neurotransmitter wie Dopamin, Noradrenalin, Histamin und Serotonin ist jedoch noch nichts bzw. wenig bekannt. Im Rahmen dieser Arbeit sollte deshalb zunächst durch RT-PCR Analyse untersucht werden, welche Rezeptoren in kultivierten Mikroglia (*in vitro*) exprimiert werden. Diese Rezeptoren sollten dann, falls vorhanden, *in vitro* mit Hilfe der Patch-Clamp-Analyse funktionell nachgewiesen werden. Eine genauere Charakterisierung der exprimierten Rezeptoren sollte durch Verwendung von spezifischen Agonisten für die einzelnen Subtypen ermöglicht werden, außerdem können so Wechselwirkungen mit anderen Rezeptoren ausgeschlossen werden, da z.B. Dopamin auch β -adrenerge Rezeptoren stimulieren kann (Hasko *et al.*, 2002).

Da jedoch die Interaktion zwischen Mikroglia und Neuronen von Interesse war, kultivierte Mikroglia sich jedoch in ihren Eigenschaften deutlich von ramifizierten Mikroglia im Gehirn unterscheiden und außerdem aus dem Zellverband herausgelöst untersucht werden, sollten auch Mikroglia im akuten Hirnschnitt (*in situ*) hinsichtlich der Expression von Neurotransmitter-Rezeptoren untersucht werden.

Dazu sollten 2 Mikroglia-Modelle, die einwandernden, in einer Vorstufe zur Aktivierung befindlichen, amöboiden und die ruhenden, ramifizierten Mikroglia hinsichtlich ihrer Rezeptor-Expression untersucht werden. Amöboide Mikroglia sind in einem aktivierten Zustand, d.h. sie sind in der Lage zu phagozytieren und migrieren, ramifizierte Mikroglia weisen diese Eigenschaften nicht auf. Möglicherweise gibt es auch Unterschiede im exprimierten Transmitter-Rezeptor-Repertoire und man kann anhand dieser Unterschiede Rückschlüsse auf die Funktion dieser Rezeptoren ziehen, d.h. ob diese Rezeptoren z.B. eine Rolle bei der Einwanderung und dem Finden der endgültigen Position der Mikroglia spielen.

Außerdem kann so auch ermittelt werden, ob kultivierte Mikroglia in ihren Expressions- und Reaktionsmuster eher den amöboiden oder den ramifizierten Mikroglia ähneln. Dieses Wissen kann für zukünftige Untersuchungen genutzt werden, d.h. inwieweit Daten die an kultivierten Mikroglia erfasst wurden überhaupt auf Mikroglia im Gehirn übertragbar sind.

Die Expression dieser Rezeptoren wurde, wie gesagt, zum einen *in vitro*, d.h. in Primärkulturen von murinen Mikroglia untersucht (Abb. 24 A), zum anderen *in situ*, d.h. im akuten Hirnschnitt von 5-10 Tage alten Mäusen wurden amöboide (Abb. 24 B) bzw. adulter Mäuse ramifizierte Mikroglia (Abb. 24 C) untersucht. Die Identifikation der Zellen in Kultur war ohne jegliche Färbung möglich, da es sich um nahezu reine Mikroglia-Kulturen (95% Mikroglia) handelte.

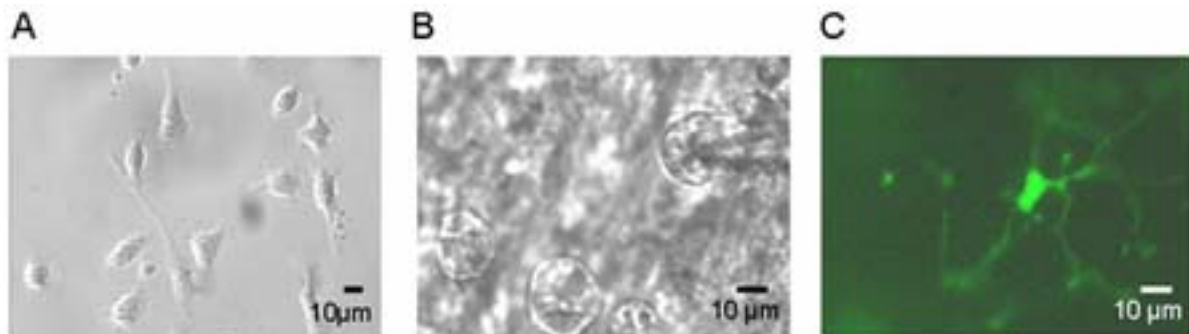


Abb. 24 Darstellung der verwendeten Modelle zur Identifikation von Transmitter-Rezeptoren auf Mikroglia. Im oberen Teil der Abbildung sind die morphologischen, im unteren Teil die elektrophysiologischen Charakteristika der verwendeten Mikroglia dargestellt. (A) Die Abbildung zeigt kultivierte Mikrogliazellen. In (B) sind amöboide Mikroglia im akuten Hirnschnitt dargestellt. Abbildung (C) zeigt eine EGFP- exprimierende Mikroglia im akuten Hirnschnitt, gut zu erkennen sind die langen und verzweigten Fortsätze.

Die amöboiden Mikroglia waren aufgrund ihrer spezifischen Verteilung im Hirnschnitt (hauptsächlich im Corpus callosum) und der charakteristischen Morphologie (große runde Zellen, mit Großen Vesikeln, Abb. 24 B) leicht zu erkennen. Die ramifizierten Mikroglia konnten anhand ihrer EGFP Expression identifiziert werden (Abb. 24 C), da für diese Versuche ein transgenes Tier verwendet wurde, welches EGFP unter dem Mikroglia-spezifischen Promotor des *iba-1* Proteins exprimiert. Die Zellen wurden willkürlich im Bereich des Cortex und des Hippokampus ausgewählt. Die Applikation der Neurotransmitter erfolgte über die Badperfusion.

Vergleich der Stromprofile

Mikrogliazellen exprimieren prominente, spannungsabhängige Kaliumströme wie unter 1.5.1 beschrieben. Da diese Ströme Auskunft darüber geben können, ob die Zelle in einem aktivierten oder ruhenden Zustand ist, wurden zu Beginn jeder Messung zunächst de- und hyperpolarisierende Spannungssprünge appliziert, um die spannungsaktivierten Kanäle zu öffnen. In Abbildung 25 sind jeweils exemplarische Ableitungen der Ströme von kultivierten (A), amöboiden (B) und ramifizierten Mikroglia (C) dargestellt.

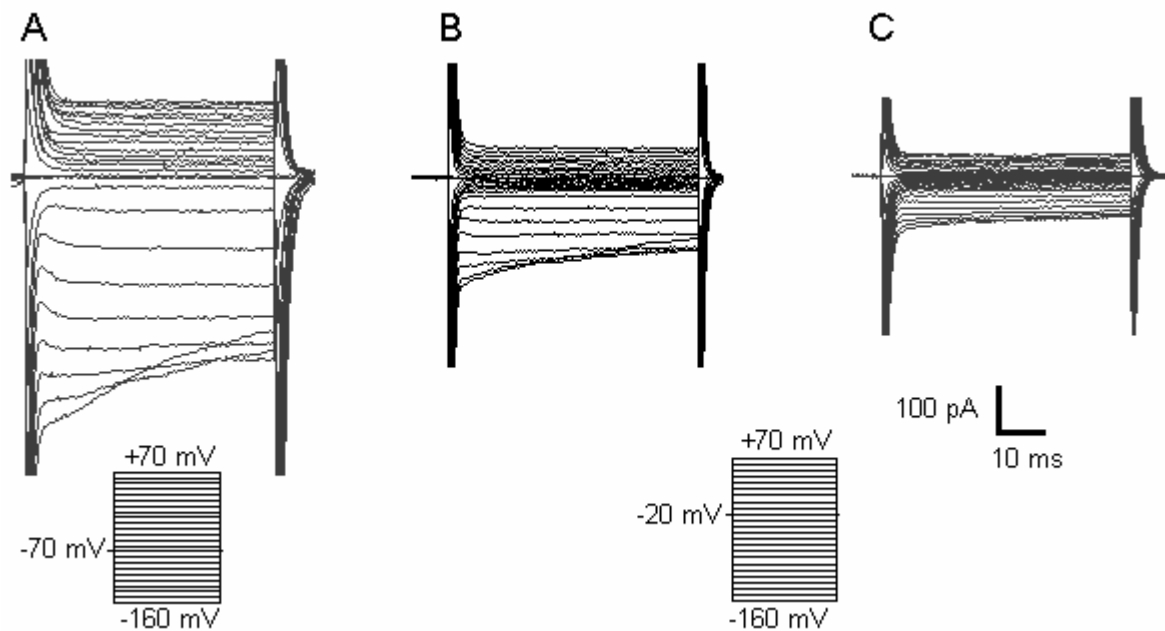


Abb. 25 Charakteristische Stromprofile von kultivierten (A), amöboiden (B) und ramifizierten Mikroglia (C). Die Stromprofile wurden durch Applikation von de- und hyperpolarisierenden Spannungssprüngen erstellt, bei kultivierten Mikroglia ausgehend von einem Haltepotential von -70 mV, bei amöboiden und ramifizierten Mikroglia im Hirnschnitt ausgehend von -20 mV, wie in den Spannungsprotokollen unter den Ableitungen dargestellt.

Die kultivierten Mikroglia exprimieren, wie in der Literatur beschrieben (Eder, 1998), sehr ausgeprägte, spannungsaktivierte, einwärtsrektifizierende Ströme, die bei Potentialen negativer als -80 mV aktiviert werden (Abb. 25 A). Gut zu erkennen ist auch die mit zunehmender Hyperpolarisierung stärker werdende Inaktivierung der Einwärtsströme, ebenfalls ein charakteristisches Merkmal der in Mikroglia exprimierten Kanäle (vgl. 1.5.1). Amöboide Mikroglia ähneln in ihrem Strommuster den kultivierten Zellen (Abb. 25 A, B), die Amplituden der Einwärtsströme sind jedoch wesentlich kleiner. Die ramifizierten Mikroglia exprimieren nur noch sehr geringe Einwärtsströme (Abb. 25 A, B, C). Ein gemeinsames Merkmal von allen drei Mikroglia-Modellen ist jedoch das völlige Fehlen von spannungsaktivierten Auswärtsströmen. Die aus den Ableitungen resultierenden Strom-Spannungskurven der verschiedenen Mikroglia-Modelle sind in Abb. 26 dargestellt.

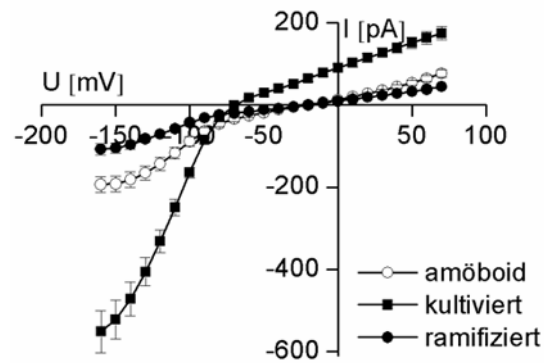


Abb. 26 Darstellung der Strom-Spannungskurven von kultivierten, amöboiden und ramifizierten Mikrogliazellen. Die Kurven wurden durch Mittelung (\pm SEM) aller untersuchten Zellen erstellt.

Kultivierte Mikroglia weisen bei einer Spannung von -160 mV einen Strom von $551,42 \pm 51,13$ pA ($n = 44$) auf, amöboide Mikroglia hingegen nur $193,55 \pm 19,28$ pA ($n = 37$), ramifizierte Mikroglia $107,96 \pm 13,92$ pA ($n = 34$). Demnach exprimieren kultivierte Mikroglia etwa 3 Mal bzw. 5 Mal so große Einwärtsströme wie amöboide bzw. ramifizierte Mikroglia, was möglicherweise auf eine vermehrte Expression von einwärts-rectifizierenden Kanälen zurückgeführt werden kann. Die bei $+70$ mV gemessenen, passiven Ströme waren bei den kultivierten Mikroglia ebenfalls deutlich erhöht, und lagen bei $174,91$ pA $\pm 16,53$. Die amöboiden Mikroglia wiesen bei $+70$ mV einen passiven Strom von $76,41$ pA $\pm 9,31$, die ramifizierten Mikroglia von $44,65$ pA ± 3 auf.

Aus den exprimierten Strömen kann man schlussfolgern, dass es sich bei den untersuchten Mikroglia-Populationen um drei unterschiedliche Aktivierungszustände der Mikroglia handelt. Zum einen ramifizierte Mikroglia, die nur sehr geringe einwärts-rectifizierende Kaliumleitfähigkeiten aufweisen, zum anderen bereits in unterschiedlichen Stufen des Aktivierungsprozess befindliche amöboide und kultivierte Mikroglia, mit erhöhter einwärtsrectifizierender Kaliumleitfähigkeit.

Vergleich der Membranpotentiale

In Makrophagen und Mikroglia sind einwärtsrectifizierende Kaliumströme an der Einstellung eines negativen Ruhemembranpotentials der Zellen beteiligt, da durch Blockierung der Kanäle eine Depolarisation ausgelöst werden konnte (Visentin *et al.*, 1995; Chung *et al.*, 1999). Sollte dies zutreffen, müssten amöboide und ramifizierte Mikroglia ein wesentlich positiveres Membranpotential als kultivierte Mikroglia aufweisen, da sie deutlich kleinere Einwärtsströme exprimieren. In Abbildung 27 sind die Mittelwerte der gemessenen Membranpotentiale dargestellt.

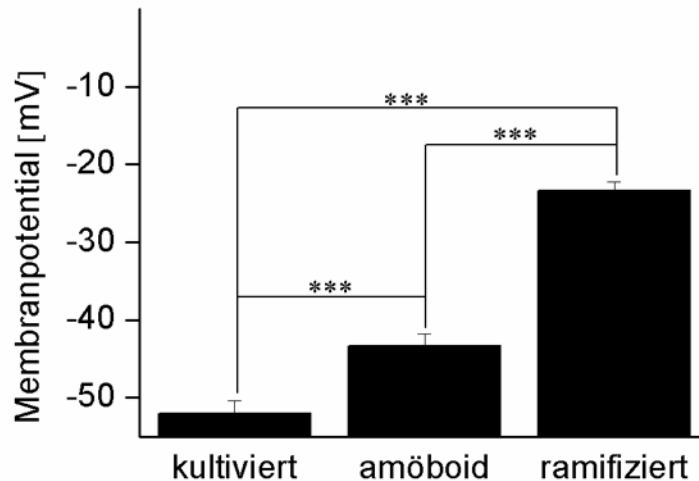


Abb. 27 Membranpotentiale der Mikroglia der verschiedenen Modelle. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM der Membranpotentiale von kultivierten, amöboiden und ramifizierten Mikroglia.

Kultivierte Zellen wiesen ein deutlich hyperpolarisiertes Membranpotential ($-52 \pm 1,64$ mV) auf als amöboide ($-43,4 \pm 1,55$) und ramifizierten Mikroglia ($-23,4 \pm 1,18$; Abb. 27). Alle drei Mikroglia-Modelle unterschieden sich signifikant in ihren Membranpotentialen. Ein direkter Zusammenhang zwischen Membranpotential und Aktivierungsgrad der Mikroglia konnte bisher noch nicht nachgewiesen werden, durch Aktivierung mit LPS konnte jedoch eine Depolarisierung des Membranpotentials, vermutlich aufgrund der Reduktion des Einwärtsstroms, beobachtet werden (vgl.4.1.2). Auch bei den LPS-aktivierten Mikroglia konnte beobachtet werden, dass die verstärkte Expression von spannungsaktivierten, einwärtsrekifizierenden Kanälen mit einem deutlich hyperpolarisierten Membranpotential einhergeht.

4.2.1 RT-PCR Analyse zur Identifikation von Neurotransmitter-Rezeptoren in Mikroglia

Für die Untersuchung der Expression von Neurotransmitter-Rezeptoren auf Mikroglia sollte zunächst ermittelt werden, ob überhaupt eine Expression von mRNA der Rezeptoren für Dopamin, Histamin und Serotonin stattfindet. Die Expression von noradrenergen Rezeptoren konnte auf mRNA-Ebene bereits nachgewiesen werden (Tanaka *et al.*, 2002), und sollte hier deshalb nicht mehr untersucht werden. Da es 14 verschiedene Serotonin-Rezeptor-Subtypen gibt, die zum Teil auch durch alternatives Spleißen bzw. posttranslationale Modifikationen entstehen wurde im Rahmen dieser Arbeit keine RT-PCR Analyse dieser Rezeptoren durchgeführt. Außerdem konnte bereits die Expression von 5HT-7 Rezeptoren in Mikroglia nachgewiesen werden (Mahe *et al.*, 2005).

Mit Hilfe von sequenzspezifischen Primern (Tab.3) für die RNA von D1-D5 Dopamin- bzw. H1-H4 Histamin-Rezeptoren konnte die Expression von D1 und D5 (Abb. 28 A), sowie H1 und H2 (Abb. 28 B) in murinen Mikroglia nachgewiesen werden. Die Funktionalität der Primer wurde an Gesamthirn-RNA-Extrakten, sowie RNA aus Mikroglia der Ratte überprüft.

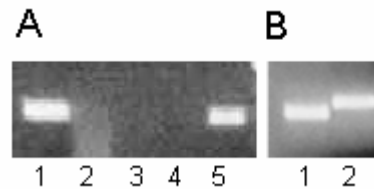


Abb. 28 RNA Expression von Dopamin- und Histamin-Rezeptoren in kultivierten, murinen Mikroglia. **(A)** Mikroglia exprimieren RNA für D1 (Spur1) und D5 (Spur2) Rezeptoren, D2, D3 und D4 (Spur 2-4) Rezeptor-RNA konnte nicht nachgewiesen werden. **(B)** Spur 1 zeigt die Expression der H1-Rezeptor RNA in Mikroglia, Spur 2 die Expression der H2-Rezeptor RNA. Banden für H3- und H4-Rezeptor-RNA konnten nicht detektiert werden.

Demnach exprimieren Mikroglia Rezeptoren für Dopamin und Histamin. Der Nachweis von RNA oder Protein ist jedoch noch kein Beweis für die funktionelle Expression dieser Rezeptoren, jedoch eine Voraussetzung dafür. Um diesen Beweis zu erbringen, sollten Mikroglia elektrophysiologisch hinsichtlich einer Reaktion auf die Applikation von Transmitter untersucht werden. Dies sollte zunächst an kultivierten Mikroglia durchgeführt werden.

4.2.2 Transmitter-Rezeptor-Expression von kultivierten Mikroglia

Die kultivierten Mikroglia wurden mit Hilfe der Patch-Clamp-Methode dahingehend untersucht, ob die Applikation von Neurotransmitter für 30 s über die Badperfusion eine Veränderung des Strommusters induziert. Dazu wurde ein Spannungsprotokoll appliziert, welches das Messen von langsamen Stromänderungen, ausgelöst durch Bindung von Liganden an Rezeptoren auf der Zellmembran und die daraus resultierende Öffnung von Kanälen, ermöglicht. Dazu wurden ausgehend von einem Haltepotential von -70 mV de- und hyperpolarisierende Spannungssprünge repetitiv im Abstand von 5 s appliziert und kontinuierlich aufgezeichnet. Hinzugekommene oder blockierte Ströme konnten dann durch Subtraktion der einzelnen Stromwerte und anschließender Auftragung gegen die entsprechende Klemmspannung ermittelt werden.

Dopaminerge Rezeptoren

Applikation von Dopamin (1 mM) löste zwei verschiedene Antworten in kultivierten Mikroglia aus, zum einen die Reduktion des Einwärtsstroms (*inward rectifier* IR), zum anderen die Induktion eines Auswärtsstroms (Abb. 29).

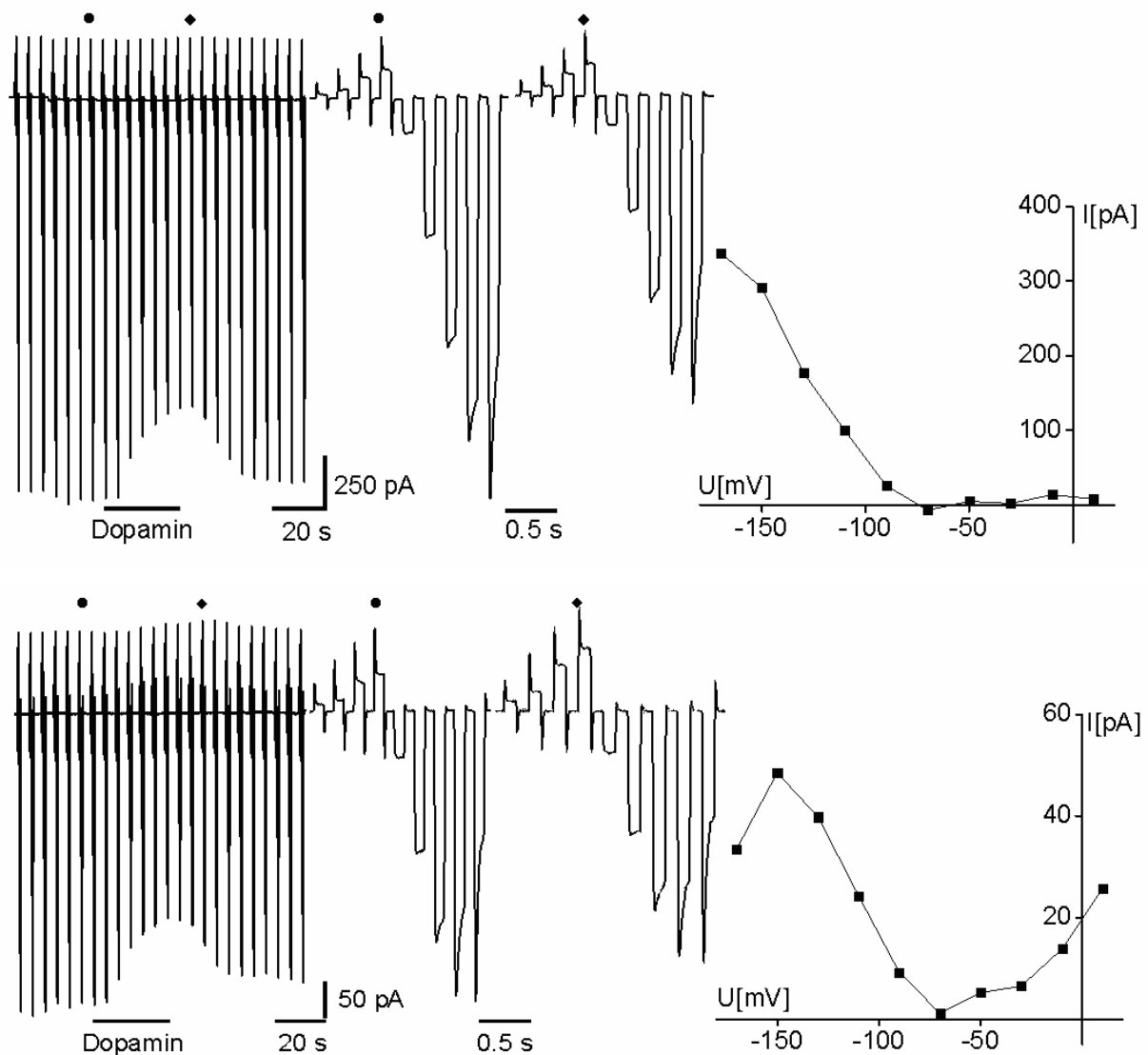


Abb. 29 Dopamin beeinflusst ein- und auswärtsrektifizierende Kaliumströme in Mikroglia. In einem stark kompensierten Zeitfenster ist auf der linken Seite die Stromantwort auf Dopamin dargestellt, in der Mitte sind die applizierten Spannungssprünge (Abb. 9) vor (●) und während des Peaks der Reaktion (◆) mit einer höheren Zeitauflösung dargestellt. Auf der rechten Seite ist die, aus der Differenz zwischen Kontroll- (●) und Reaktionsstromantwort (◆), resultierende Stromspannungskurve abgebildet (■). Im oberen Bild ist die Reduktion des Auswärtsstroms, im unteren die zusätzliche Induktion eines Auswärtsstroms dargestellt.

10 der 11 untersuchten Zellen reagierten nur mit einer IR Reduktion, in 4 Zellen wurde zusätzlich die Induktion eines Auswärtsstroms gemessen. Dopamin induzierte einen Auswärtsstrom von 18 ± 2 pA ($n = 4$); (gemessen bei +10 mV) (Abb. 27 A). Die Reduktion von IR betrug 60 pA \pm 10 pA ($n = 10$); Abb. 27 B; gemessen bei -150 mV). Das Umkehrpotential des induzierten Auswärtsstroms lag bei etwa -60 mV und damit nahe dem, für die verwendeten Lösungen, berechneten Kaliumgleichgewichtspotential von -80,1 mV. Demnach handelt es sich bei dem induzierten Strom wahrscheinlich um einen Kaliumstrom.

Durch die Verwendung von spezifischen Agonisten für Dopamin-Rezeptoren, sollte überprüft werden, ob Dopamin die ausgelöste Reaktion wirklich über Bindung an dopaminerge und nicht über adrenerge Rezeptoren induziert. (Hasko *et al.*, 2002) konnte nämlich zeigen, dass Dopamin die IL-12 p40 Produktion von Makrophagen über adrenerge Rezeptoren moduliert.

Außerdem sollten die Ergebnisse der RT-PCR überprüft werden. Es wurden die spezifischen Agonisten Dihydroxid (10 μM ; Kohli *et al.*, 1993) und (-)-Quinpirol (10 μM ; Sullivan *et al.*, 1998) verwendet. Dihydroxid bindet spezifisch an alle D1-ähnlichen Rezeptoren (D1, D5), Quinpirol an alle D2-ähnlichen Rezeptoren (D2, D3, D4). Applikation der Agonisten induzierte ähnliche Reaktionen wie Dopamin, d.h. sowohl die Reduktion von IR, als auch die Induktion eines Auswärtsstroms konnte gemessen werden (Abb. 30, 26).

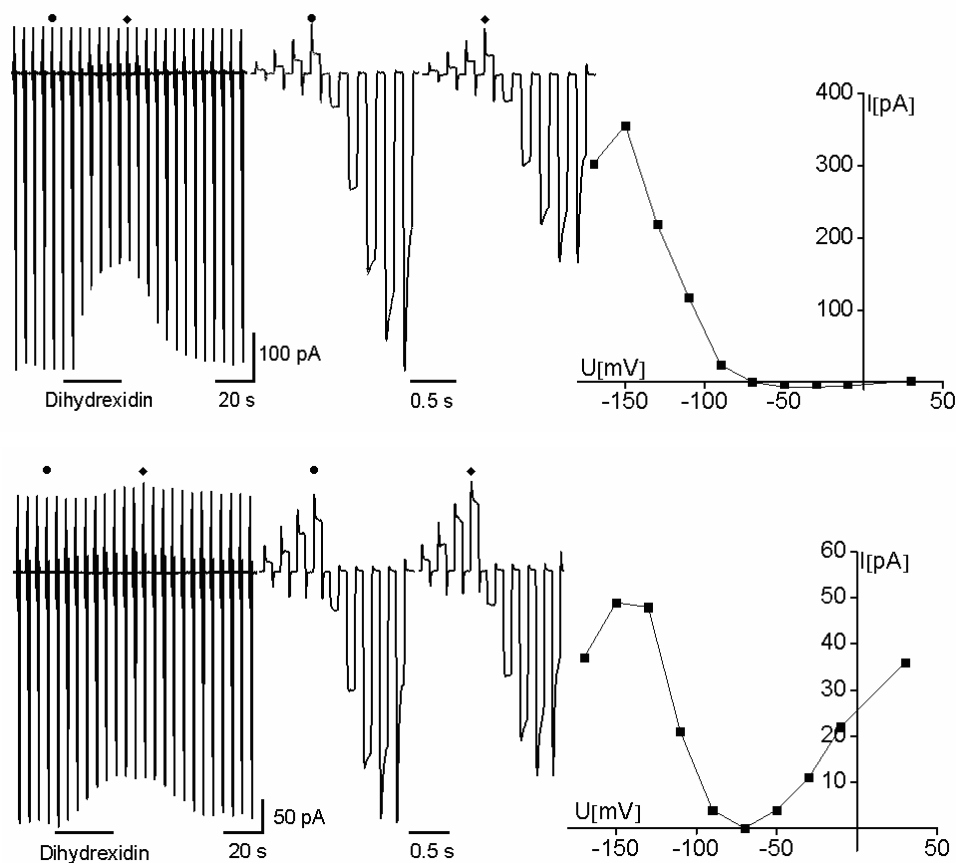


Abb. 30 Dihydroxid, ein D1-Agonist, moduliert ein- und auswärtsrektifizierende Kaliumströme in Mikroglia. Die Darstellung der Daten erfolgte wie in Abbildung 29 beschrieben. Im oberen Bild ist die Reduktion des Einwärtsstroms, im unteren die zusätzliche Induktion eines Auswärtsstroms dargestellt.

Im Gegensatz zu Dopamin stimulierten die spezifischen Agonisten Dihydroxid (in 2 der untersuchten 30 Zellen) und Quinpirol (2 der untersuchten 25 Zellen) in einigen Zellen Auswärtsströme ohne gleichzeitig IR zu reduzieren. Dihydroxid induzierte einen Auswärtstrom von $25,34 \pm 5,21$ pA ($n = 5$), Quinpirol von $57,47 \pm 15,79$ pA ($n = 7$). IR wurde durch Applikation von Dihydroxid um $91,72 \pm 18,68$ pA ($n = 20$) bzw.

(-)-Quinpirol um $110,56 \pm 22,99$ pA ($n=19$) reduziert (Abb. 27 A). Das Umkehrpotential der induzierten Auswärtsströme lag ebenfalls bei -60 mV, demnach handelt es sich wie bei Dopamin wahrscheinlich um Kaliumströme.

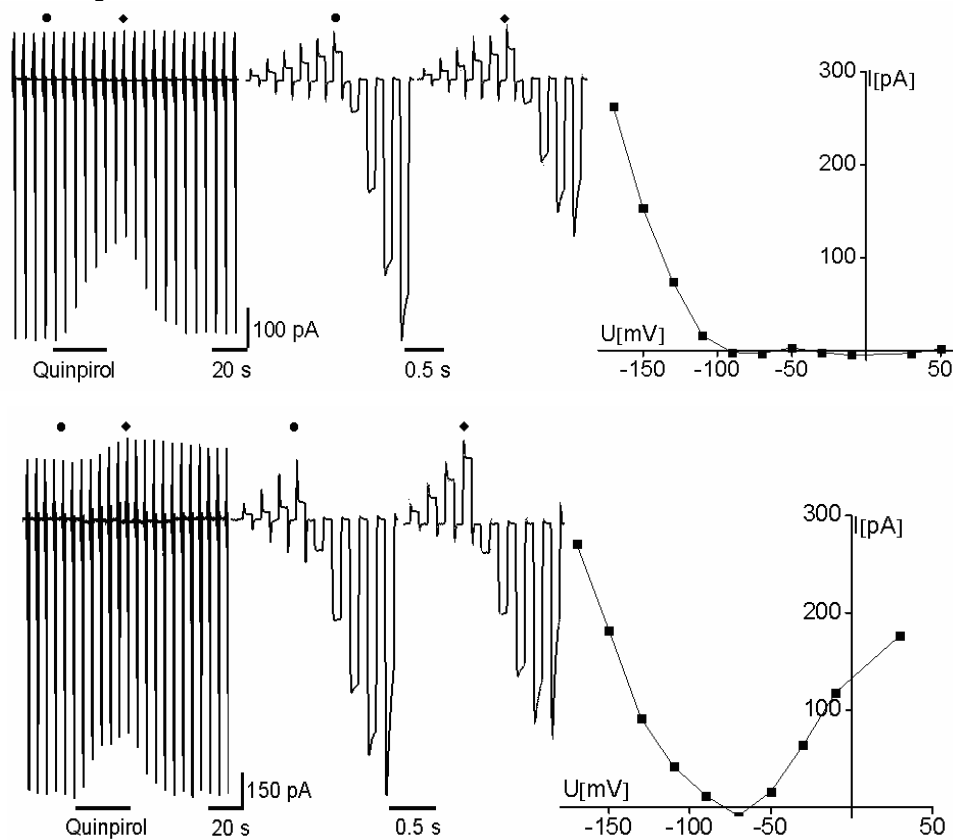


Abb. 31 Quinpirol, ein D2-Agonist, beeinflusst ein- und auswärtsrektifizierende Kaliumströme in kultivierten Mikroglia. Die Darstellung der Daten erfolgte wie in Abbildung 29 beschrieben. Im oberen Bild ist die Reduktion des Einwärtsstroms, im unteren die zusätzliche Induktion eines Auswärtsstroms dargestellt.

Um die durch Dopamin bzw. die spezifischen Agonisten induzierten Stromantworten vergleichen zu können, wurden die Mittelwerte der Stromänderungen in Abbildung 27 gemeinsam dargestellt.

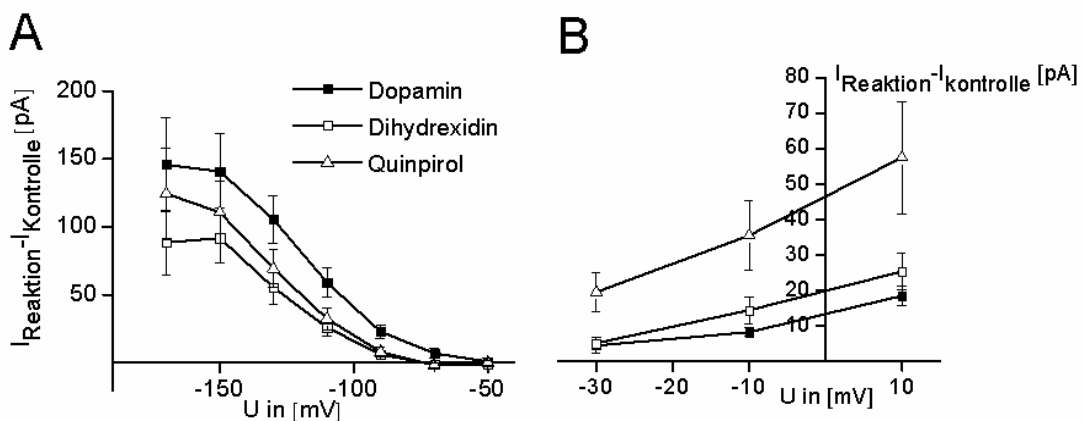


Abb. 32 Vergleich der durch Dopamin bzw. spezifische D1- und D2-ähnliche Rezeptor-Agonisten induzierten Stromantworten. Dargestellt sind die Mittelwerte (\pm SEM) der induzierten

Reduktion **(A)** des Einwärtsstroms bzw. der induzierten Induktion des Auswärtsstroms **(B)**. Zur Berechnung dieser Werte wurde die Differenz der Stromantworten vor und während der Stimulation gebildet, um den durch den Transmitter beeinflussten Strom zu ermitteln.

Dabei konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede in der Größe der induzierten Reaktion ermittelt werden, was darauf hindeutet, dass beide Rezeptoren zumindest im Hinblick auf die Regulation von Kaliumkanälen, an den gleichen Signaltransduktionsweg gekoppelt sind. Demnach exprimieren kultivierte Mikroglia, entgegen den Ergebnissen der RT-PCR, funktionelle D1- und D2-ähnliche Dopamin-Rezeptoren.

Noradrenerge Rezeptoren

Noradrenalin (1 mM) induzierte ähnliche Antworten in Mikroglia wie Dopamin. In 10 der untersuchten 13 Zellen wurde IR reduziert, in 6 der Zellen konnte ein Auswärtsstrom induziert werden (Abb. 33). Applikation von Noradrenalin erzeugte einen Auswärtsstrom bei +10 mV von $81,16 \pm 19,91$ pA ($n = 6$), der Einwärtsstroms hingegen wurde bei -170 mV um $116,36 \pm 35,87$ pA ($n = 9$) reduziert (Abb. 36).

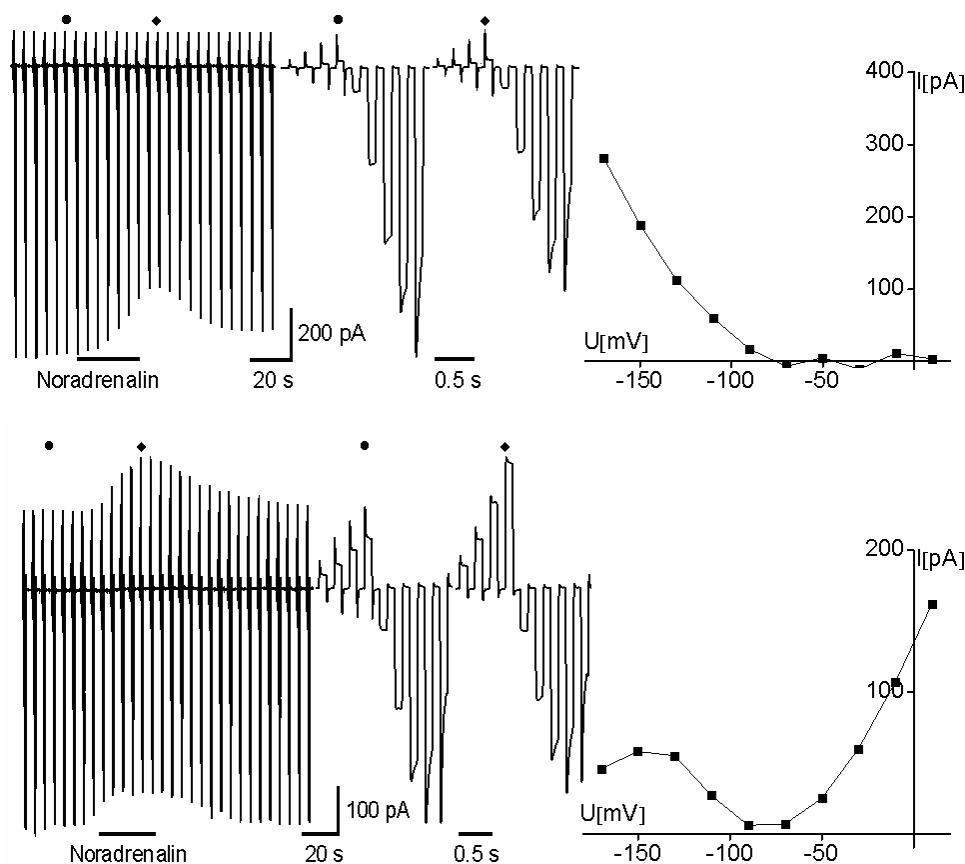


Abb. 33 Noradrenalin beeinflusst ein- und auswärtsrektifizierende Kaliumströme in kultivierten Mikroglia. Die Darstellung der Daten erfolgte wie in Abbildung 29 beschrieben. Im oberen Bild ist die Reduktion des Einwärtsstroms, im unteren die zusätzliche Induktion eines Auswärtsstroms dargestellt.

Auch für Noradrenalin sollte zum einen ausgeschlossen werden, dass es unspezifisch andere mikrogliale Rezeptoren stimuliert und außerdem ermittelt werden ob

die mittels RT-PCR identifizierte α - und β -adrenerge Rezeptoren (Mori *et al.*, 2002; Tanaka *et al.*, 2002) tatsächlich funktionell auf Mikroglia exprimiert werden. Dafür wurden die α - und β -adrenerge Rezeptor-Agonisten, Metaraminol (100 μ M, (Wang *et al.*, 1998) und Isoproterenol (50 μ M, (Muyderman *et al.*, 2001) verwendet. Durch Applikation von Metaraminol (Abb. 34) und Isoproterenol (Abb. 35) konnten ähnliche Reaktionen wie mit Noradrenalin beobachtet werden, sowohl die Reduktion der Einwärtsströme, als auch die Induktion von Auswärtsströmen.

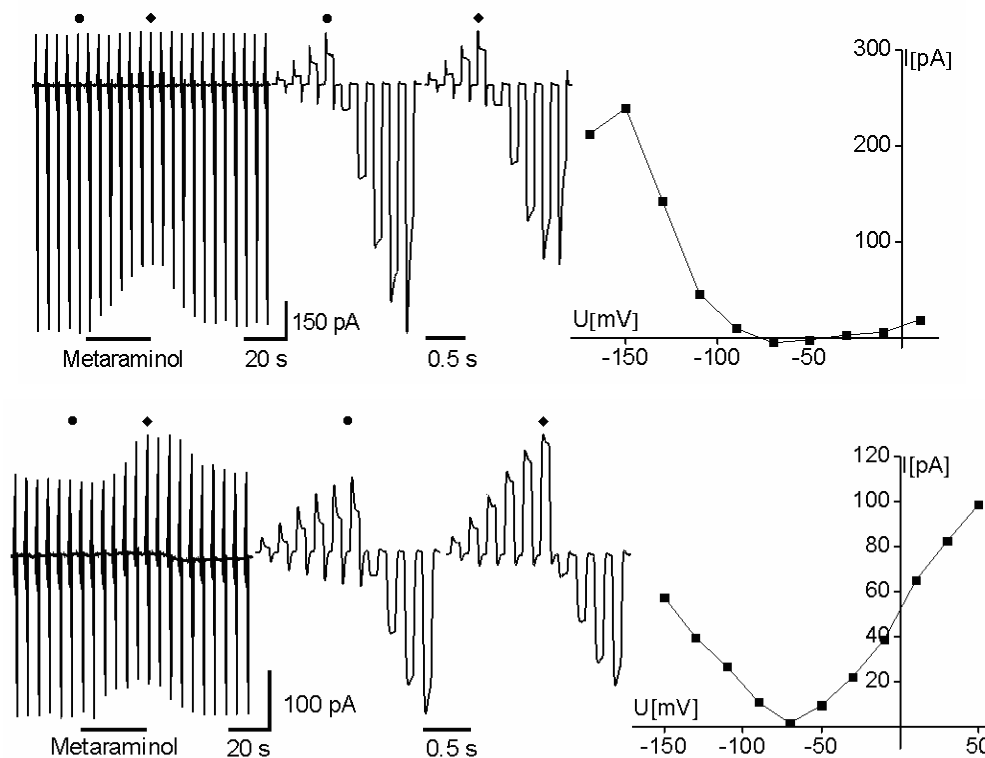


Abb. 34 Metaraminol, ein α -adrenerger Rezeptoragonist beeinflusst ein- und auswärtsrektifizierende Kaliumströme in kultivierten Mikroglia. Die Darstellung der Daten erfolgte wie in Abbildung 29 beschrieben. Im oberen Bild ist die Reduktion des Einwärtsstroms, im unteren die zusätzliche Induktion eines Auswärtsstroms dargestellt.

Der Einwärtsstrom wurde durch Metaraminol um $188,12 \pm 26,57$ pA ($n = 26$ von 53 untersuchten Zellen), durch Isoproterenol um $152,13 \pm 35,2$ pA ($n = 24$ von 48 untersuchten Zellen) reduziert. Der induzierte Auswärtsstrom betrug bei Metaraminol $39,24 \pm 8,53$ pA ($n = 4$) und bei Isoproterenol $46,91 \pm 12,51$ pA ($n = 4$; Abb. 36). Das Umkehrpotential des induzierten Auswärtsstroms lag etwa bei -60 mV.

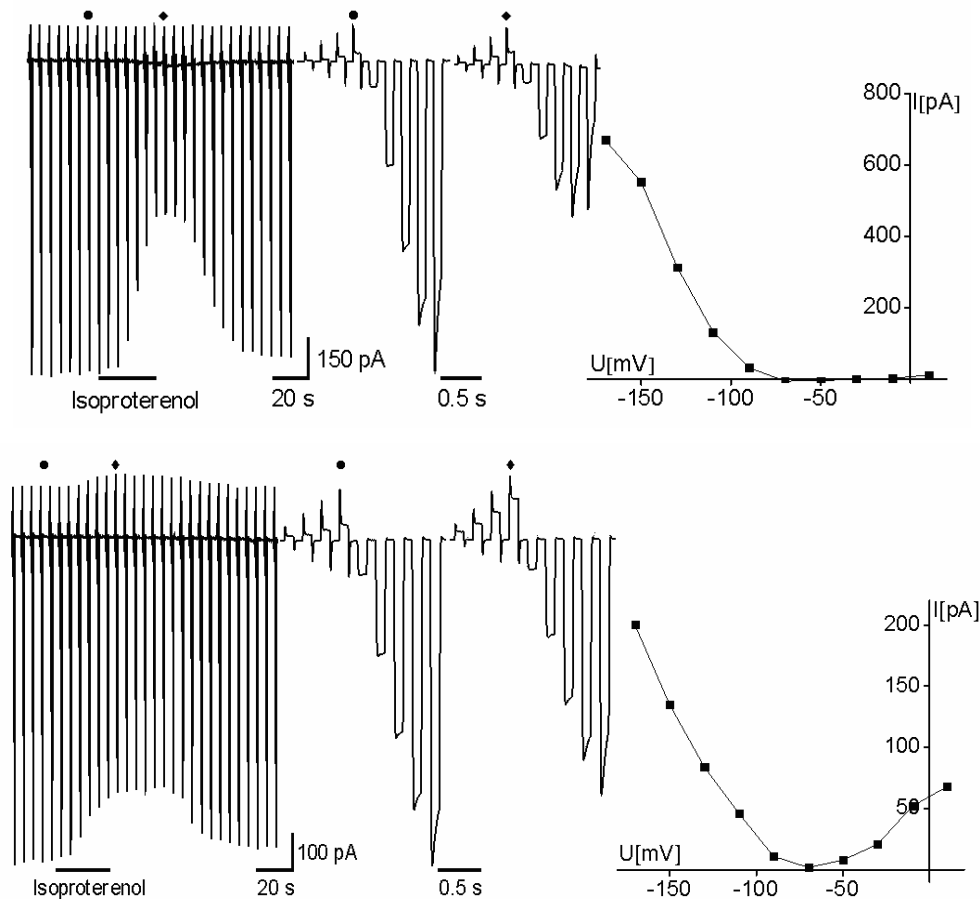


Abb. 35 Isoproterenol, ein Agonist β -adrenerger Rezeptoren beeinflusst ein- und auswärtsrektifizierende Kaliumströme in kultivierten Mikroglia. Die Darstellung der Daten erfolgte wie in Abbildung 29 beschrieben. Im oberen Bild ist die Reduktion des Einwärtsstroms, im unteren die zusätzliche Induktion eines Auswärtsstroms dargestellt.

Zum Vergleich der durch Noradrenalin bzw. spezifische α - und β -adrenerge Rezeptor Agonisten induzierten Reaktionen wurden die Mittelwerte zusammen in Abb. 36 dargestellt. Dabei ergaben sich jedoch keine signifikanten Unterschiede.

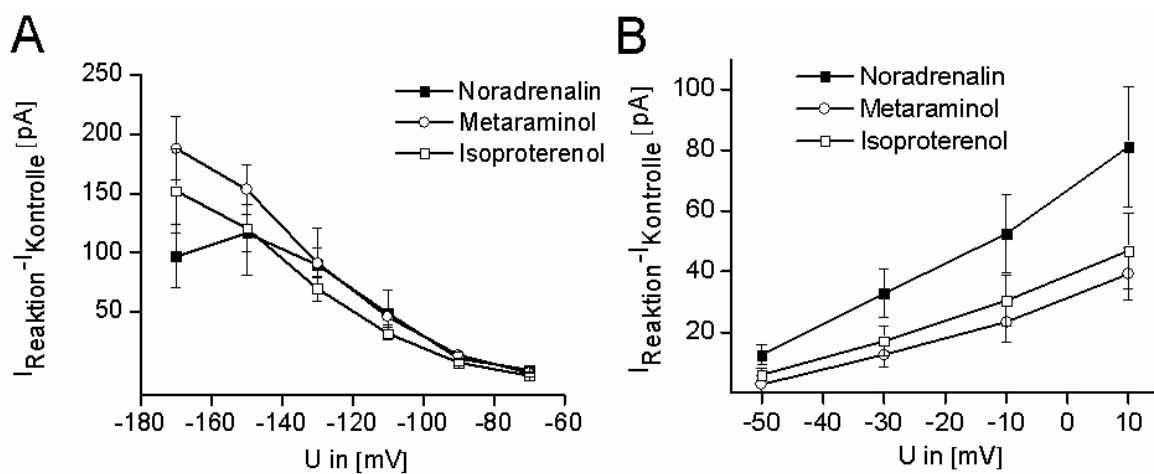


Abb. 36 Vergleich der, durch Noradrenalin bzw. spezifische Agonisten für α - und β -adrenerge Rezeptoren, induzierten Stromantworten. Dargestellt sind die Mittelwerte (\pm SEM) der Reduktion des Einwärtsstroms (A) bzw. der Induktion des Auswärtsstroms (B). Die Berechnung der Werte erfolgte wie in Abbildung 32 beschrieben.

Kultivierte Mikroglia exprimieren demnach sowohl funktionelle α -adrenerge als auch β -adrenerge Rezeptoren, deren Stimulation ähnliche Reaktionen in Mikroglia hervorruft. Demnach ist davon auszugehen, dass beide Rezeptoren an den gleichen Signaltransduktionsweg gekoppelt sind.

Histaminerge Rezeptoren

Histamin (1 mM) induzierte ähnliche Antworten in Mikroglia wie Dopamin (Abb. 29) und Noradrenalin (Abb. 37). In 8 der untersuchten 18 Zellen wurde IR reduziert, in 2 der Zellen konnte ein Auswärtsstrom induziert werden (Abb. 37). Applikation von Histamin erzeugte einen Auswärtsstrom bei +50 mV von $89,1 \pm 45,9$ pA, der Einwärtsstroms hingegen wurde bei -150 mV um $203,16 \pm 39,95$ pA reduziert.

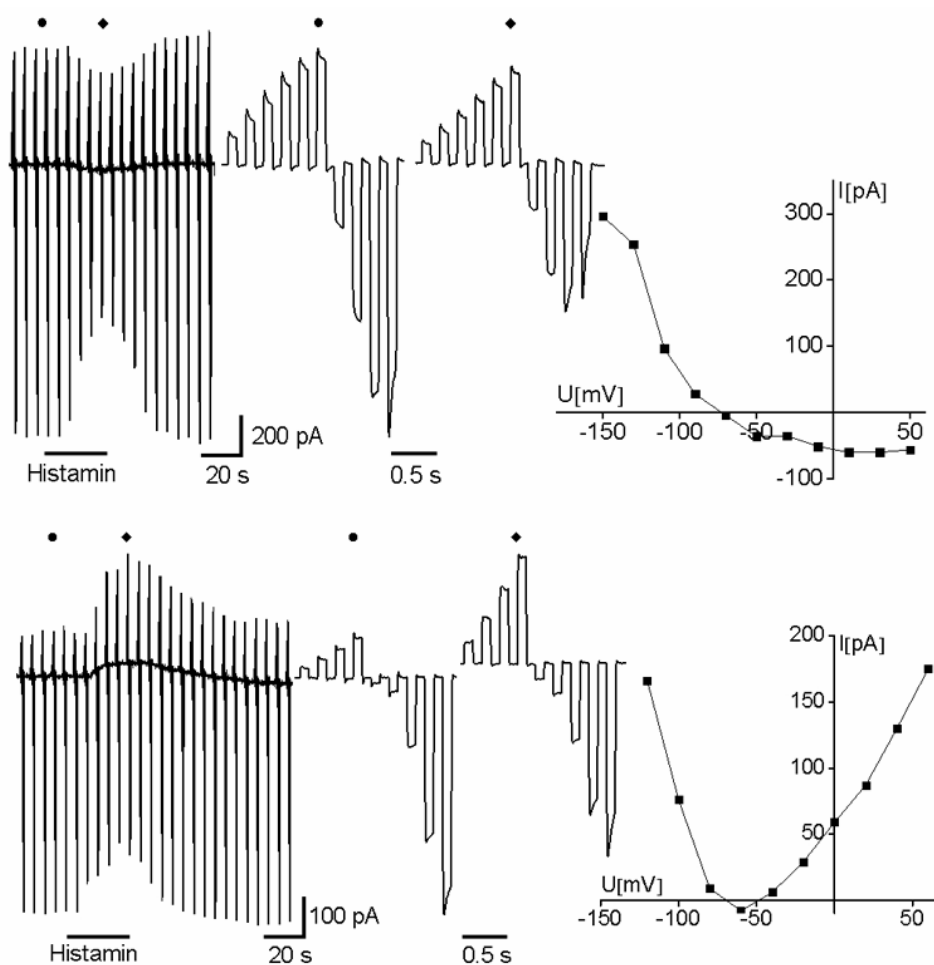


Abb. 37 Histamin beeinflusst ein- und auswärtsrektifizierende Kaliumströme in kultivierten Mikroglia. Die Darstellung der Daten erfolgte wie in Abbildung 29 beschrieben. Im oberen Bild ist die Reduktion des Einwärtsstroms, im unteren die zusätzliche Induktion eines Auswärtsstroms dargestellt.

Das Umkehrpotential des induzierten Auswärtsstroms lag bei circa -60 mV. Funktionelle Histamin-Rezeptoren konnten demnach auf kultivierten Mikroglia nachgewiesen werden. Da noch kein spezifischer Agonist für den H1-Rezeptor käuflich zu erwerben war, wurde auf eine genauere Charakterisierung der Histamin-Rezeptoren verzichtet.

Serotonerge Rezeptoren

Serotonin (1 mM) reduzierte in 12 der untersuchten 15 Zellen IR, in 7 der 12 Zellen konnte zusätzlich ein Auswärtsstrom induziert werden (Abb. 38).

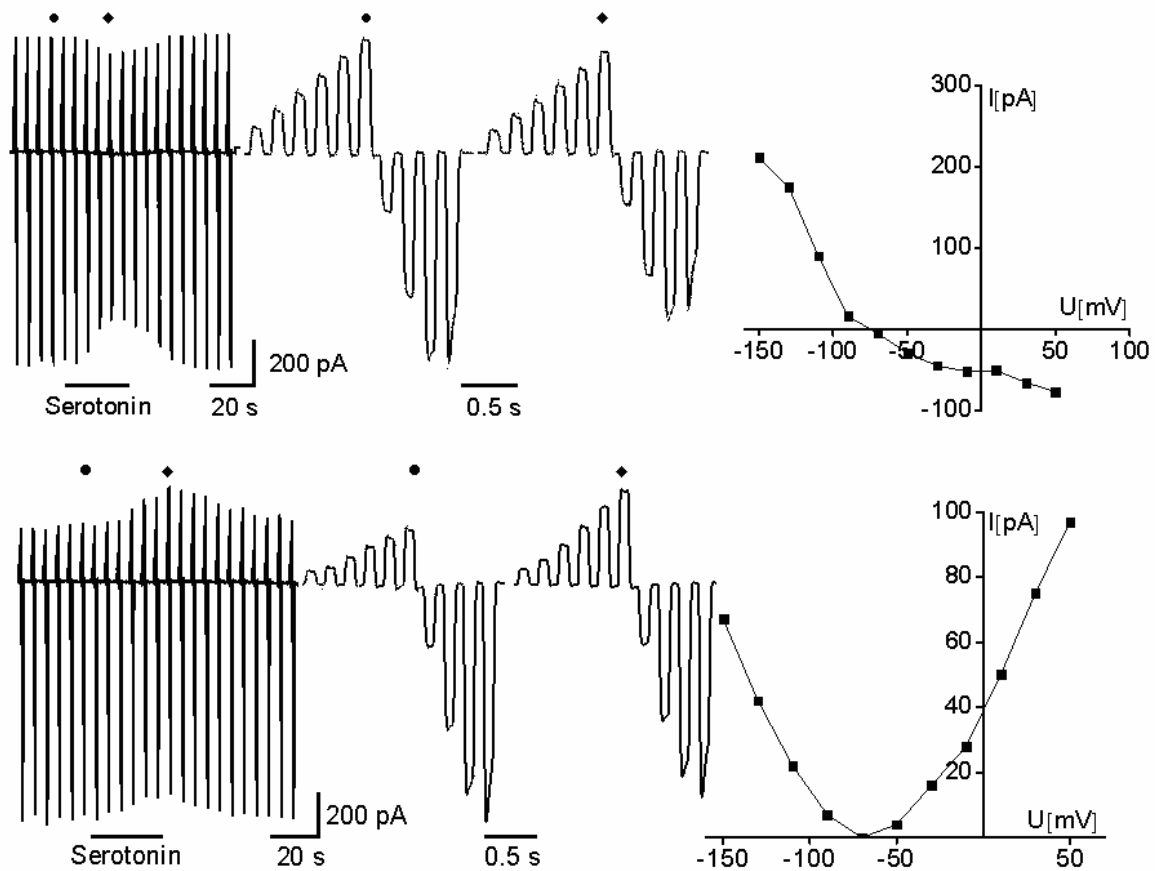


Abb. 38 Serotonin beeinflusst ein- und auswärtsrekifizierende Kaliumströme in kultivierten Mikroglia. Die Darstellung der Daten erfolgte wie in Abbildung 29 beschrieben. Im oberen Bild ist die Reduktion des Einwärtsstroms, im unteren die zusätzliche Induktion eines Auswärtsstroms dargestellt.

Applikation von Serotonin erzeugte einen Auswärtsstrom bei +50 mV von 53.7 ± 10.5 pA, der Einwärtsstroms hingegen wurde bei -150 mV um 87.7 ± 18.7 pA reduziert. In einer Zelle konnte nur ein Auswärtsstrom von 103 pA induziert werden. Das Umkehrpotential des induzierten Auswärtsstroms lag auch hier etwa bei -60 mV.

Da es, wie bereits gesagt 14 verschiedene Serotonin-Rezeptoren gibt, war es im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich alle verschiedenen Agonisten zu testen. Da jedoch in der Literatur beschrieben wurde, dass 5-HT_{2A} Rezeptoren von Gliazellen, den Gliomazellen (entartete Astrozyten), exprimiert werden und deren Stimulation mit Serotonin bzw. einem spezifischen Agonist (DOI) die Expression von iNOS sowie NO reduziert (Miller *et al.*, 1997), sollte getestet werden, ob auch Mikroglia, diesen Rezeptorsubtyp exprimieren.

DOI (10 μ M) reduzierte in 16 von 26 Zellen den Einwärtsstrom um 239.9 ± 49.8 pA. In nur einer Zelle konnte die Induktion eines sehr geringen Auswärtsstroms von 18 pA gemessen werden (Abb. 39, Abb. 40).

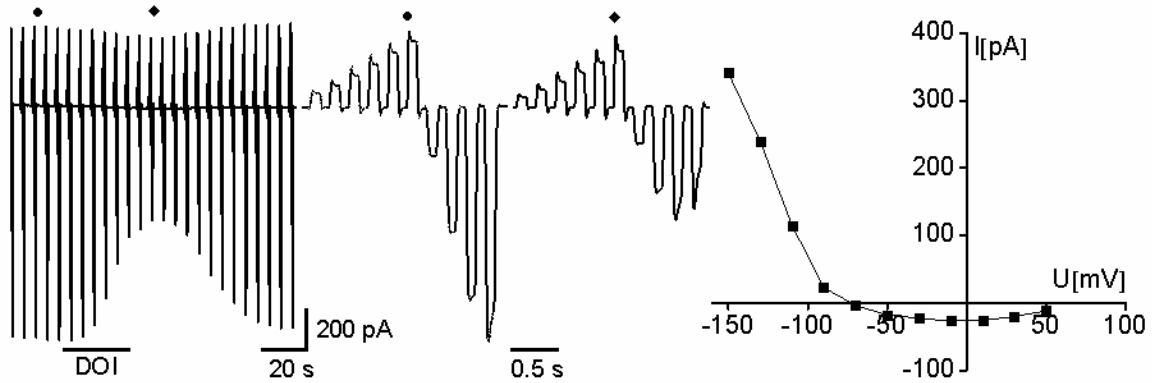


Abb. 39 DOI beeinflusst einwärtsrektifizierende Kaliumströme in kultivierten Mikroglia. Die Darstellung der Daten erfolgte wie in Abbildung 29 beschrieben. Im oberen Bild ist die Reduktion des Auswärtsstroms, im unteren die zusätzliche Induktion eines Auswärtsstroms dargestellt.

Um die durch Serotonin und DOI induzierte Reduktion des Einwärtsstroms vergleichen zu können, wurden die Mittelwerte der Reaktion in Abb. 40 dargestellt.

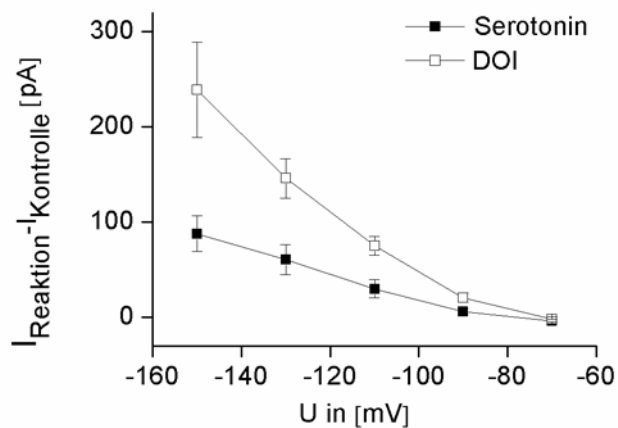


Abb. 40 Vergleich der durch Serotonin bzw. DOI induzierten Stromantworten. Dargestellt sind die Mittelwerte (\pm SEM) der induzierten Reduktion des Einwärtsstroms. Die Daten wurden wie in Abbildung 32 beschrieben ermittelt.

Es konnten im Rahmen dieser Arbeit funktionelle Serotonin-Rezeptoren auf kultivierten Mikroglia nachgewiesen werden. Außerdem konnte ermittelt werden dass, funktionelle 5-HT_{2A} Rezeptoren von diesen Zellen exprimiert werden, demnach eine mögliche Beeinflussung der NO-Freisetzung dieser Zellen durch Serotonin untersucht werden sollte. Der spezifische Agonist induzierte jedoch nicht wie Serotonin, zumindest in einem Teil der Zellen, einen Auswärtsstrom, demnach werden vermutlich noch andere Serotonin-Rezeptoren in Mikroglia exprimiert, deren Aktivierung dann auch die Induktion eines Auswärtsstroms zur Folge hat. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass alle 4 applizierten Neurotransmitter, bzw. die spezifischen Agonisten, nahezu identische Veränderungen des Strommusters der kultivierten Mikroglia hervorgerufen haben, demnach vermutlich alle an den gleichen Signaltransduktionsweg gekoppelt sind. Möglicherweise haben die untersuchten

Transmitter dadurch auch ähnliche Effekte auf die Funktionen der Mikro-glia. Dies konnte für Dopamin und Noradrenalin hinsichtlich der NO-Freisetzung bereits gezeigt werden (Chang & Liu, 2000). Ob sich jedoch das Rezeptorspektrum von Mikroglia unterschiedlicher Aktivierungszustände unterscheidet, und ob diese Rezeptoren überhaupt von Mikroglia im Gehirn exprimiert werden, soll im Folgenden geklärt werden.

4.2.3 Transmitter-Rezeptor-Expression von Mikroglia im akuten Hirnschnitt

Dazu sollten amöboide und ramifizierte Mikroglia im akuten Hirnschnitt hinsichtlich der funktionellen Expression dieser Neurotransmitter-Rezeptoren untersucht werden. Das Expressionsmuster von amöboiden Mikroglia ist vor allem deshalb von Interesse, da sie in das Gehirn einwandern und auf bisher noch ungeklärte Weise ihre endgültige Position finden. Da z.B. für ATP ermittelt werden konnte, dass es chemotaktisch auf Mikroglia wirkt (Honda & Kohsaka, 2001), ist es vorstellbar dass unterschiedliche Konzentrationen von Neurotransmittern die Mikroglia zu ihren endgültigen Positionen im ZNS leiten. Haben die Zellen diese Position gefunden, differenzieren sie zu ramifizierten Mikroglia. Demnach könnte der direkte Vergleich der Rezeptor-Spektren von amöboiden und ramifizierten Mikroglia Aufschluss darüber geben, inwieweit sich die Expression von Transmitter-Rezeptoren dabei ändert. Da amöboide Mikroglia zum Teil Eigenschaften aktivierter Mikroglia aufweisen, kann so außerdem ermittelt werden, ob es möglicherweise erst während des Aktivierungsprozesses zur Expression von Transmitter-Rezeptoren kommt.

Die amöboiden und ramifizierten Mikroglia entsprechen außerdem, vor allem auch hinsichtlich der Expression von Rezeptoren, sehr viel mehr den eigentlich *in vivo* existierenden Mikroglia als die kultivierten Zellen. Für die Untersuchung von amöboiden bzw. ramifizierten Mikroglia *in situ* wurden akute Hirnschnitte von 5-10 Tage alten NMRI Mäusen bzw. adulten iba-1-EGFP-Mäusen verwendet. Wie in 1.1 beschrieben akkumulieren die amöboiden Mikroglia-zellen auf der Oberfläche des Hirnschnittes und sind leicht an ihrer runden Morphologie und den großen intrazellulären Vesikeln zu erkennen. Die ramifizierten Mikroglia wurden aufgrund ihrer grünen Fluoreszenz identifiziert.

Dopaminerge Rezeptoren

Da in Kultur bereits ermittelt wurde, dass die durch Dopamin und die spezifischen Agonisten induzierten Reaktionen nahezu identisch sind, wurden die amöboiden Mikroglia zur genaueren Charakterisierung der exprimierten Rezeptoren gleich mit spezifischen Agonisten stimuliert. Applikation von Dihydroxydopamin (10 μ M) und (-)-Quinpirol (10 μ M) induzierte einen Auswärtsstrom in amöboiden Mikroglia (Abb. 41). Im Gegensatz zu den kultivierten Zellen konnte hier keine Reduktion des IR Stroms gemessen werden.

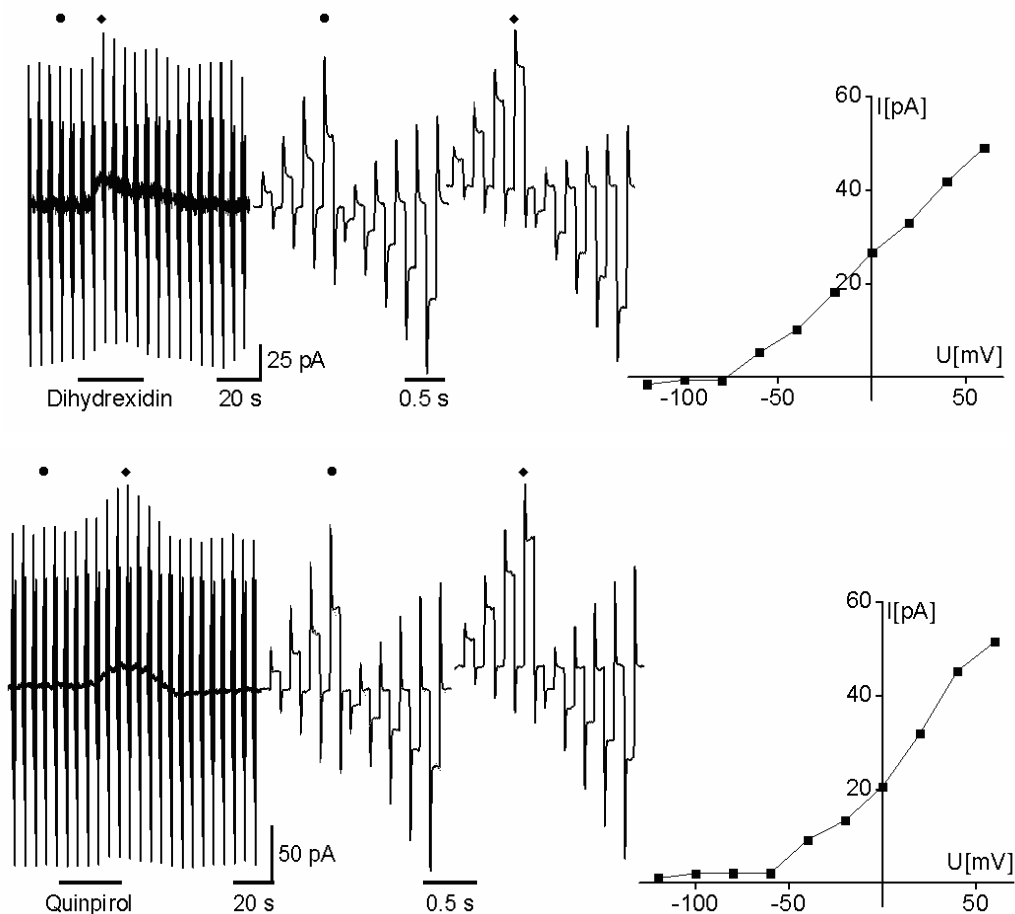


Abb. 41 Dihydroxidin bzw. Quinpirol induziert einen auswärtsrektifizierenden Kaliumstrom in amöboiden Mikroglia. Die Darstellung der Daten erfolgte wie in Abbildung 29 beschrieben.

Bei 7 der untersuchten 29 Zellen induzierte Dihydroxidin bei +60 mV einen Auswärtsstrom von $42,05 \pm 7$ pA (Abb. 43). Quinpirol aktivierte in 7 von 28 Zellen einen Auswärtsstrom von $29,37 \pm 7,38$ pA (Abb. 43). Das Umkehrpotential lag etwa bei -80 mV, und damit nahe bei dem für die verwendeten Lösungen berechneten Kaliumgleichgewichtspotential von -99,5 mV, demnach handelt es sich auch hier wahrscheinlich um einen Kaliumstrom.

Da die Messung von ramifizierten Mikroglia sehr viel schwieriger ist, und außerdem nur eine begrenzte Anzahl von transgenen Tieren zur Verfügung stand, wurde hier auf die Applikation beider Agonisten verzichtet und stattdessen Dopamin appliziert (Abb. 42). In 3 von 10 untersuchten ramifizierten Mikroglia konnte durch die Applikation von 1 mM Dopamin bei +60 mV ein Auswärtsstrom von $29,03 \pm 6,55$ pA induziert werden (Abb. 43).

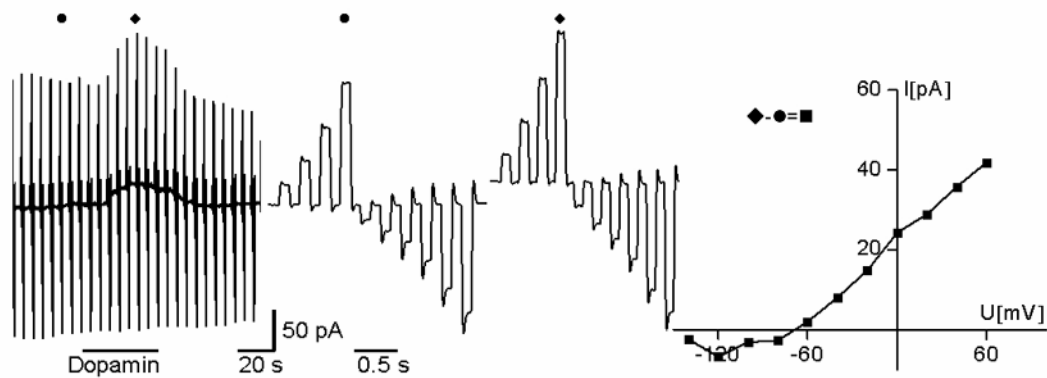


Abb. 42 Dopamin induziert einen auswärtsrektifizierenden Kaliumstrom in ramifizierten Mikroglia. Die Darstellung der Daten erfolgte wie in Abbildung 29 beschrieben.

Das Umkehrpotential des induzierten Auswärtsstroms lag bei -80 mV. Um die in amöboiden und ramifizierten Mikroglia induzierten Stromantworten vergleichen zu können, wurden die Mittelwerte aller Reaktionen Abb. 43 zusammengefasst, dabei ergaben sich jedoch keine signifikanten Unterschiede.

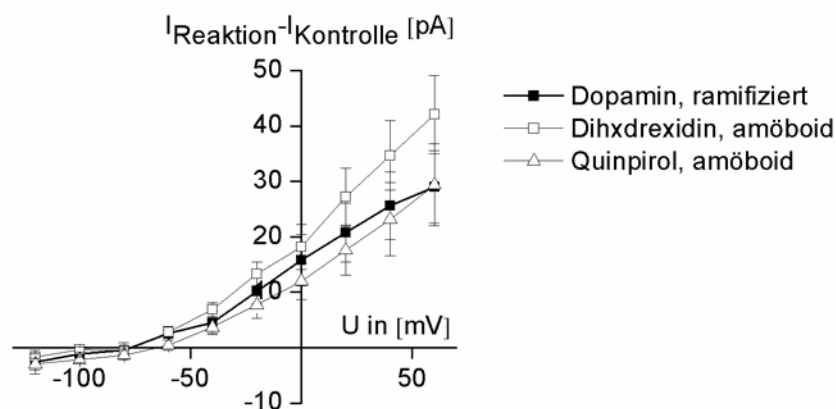


Abb. 43 Vergleich der durch Stimulation dopaminergischer Rezeptoren induzierten Stromantworten in amöboiden und ramifizierten Mikroglia. Ramifizierte Mikroglia wurden mit Dopamin, amöboide Mikroglia mit D1(Dihydroxid) - und D2 (Quinpirol) -Agonisten stimuliert. Dargestellt sind die Mittelwerte (\pm SEM) des induzierten Auswärtsstroms. Die Daten wurden wie in Abbildung 32 beschrieben ermittelt.

Aus diesen Ergebnissen kann man schlussfolgern, dass sowohl amöboide als auch ramifizierte Mikroglia funktionelle Dopamin-Rezeptoren exprimieren. Beide Mikroglia-Populationen reagieren auf die gleiche Weise auf Stimulation dieser Rezeptoren. Die Reaktionen unterscheiden sich jedoch von denen der kultivierten Mikroglia, und zwar insofern, dass nur in Kultur der IR reduziert wird. Dies ist möglicherweise auf die Unterschiede im exprimierten Stromprofil (sehr viel größerer IR bei kultivierten Mikroglia) zurückzuführen. Die Amplitude des induzierten Auswärtsstroms ist etwas kleiner als bei den kultivierten Mikroglia.

Noradrenerge Rezeptoren

Für die Untersuchung der Expression von noradrenergen Rezeptoren wurden ebenfalls nur die Agonisten verwendet, da die durch Noradrenalin bzw. die spezifischen Agonisten induzierten Reaktionen in kultivierten Mikroglia nahezu identisch waren. Der β -adrenerge Agonist Isoproterenol induzierte in 9 der untersuchten 36 amöboiden Mikroglia einen Auswärtsstrom (Abb. 44). Der induzierte Strom bei +60 mV betrug $47,41 \pm 7,87$ pA. Es konnte auch hier kein Effekt auf IR gemessen werden. Keine von 30 untersuchten Zellen reagierte auf die Applikation von Metaraminol.

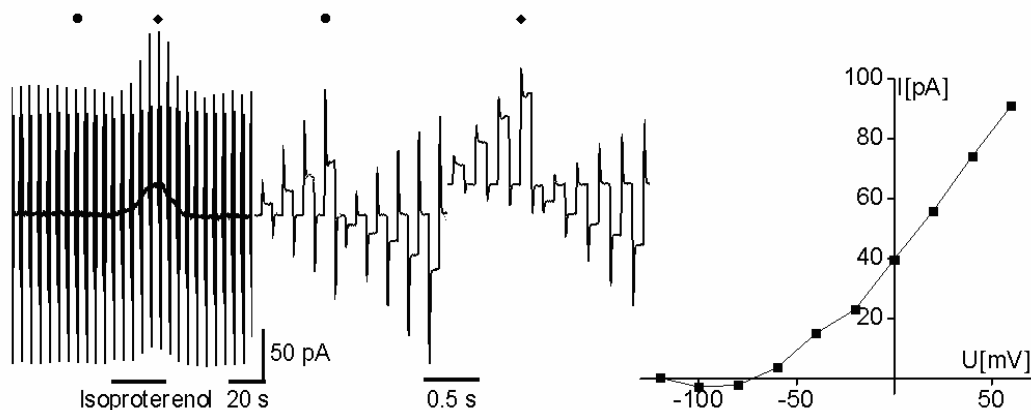


Abb. 44 Isoproterenol induziert einen auswärtsrektifizierenden Kaliumstrom in amöboiden Mikroglia. Die Darstellung der Daten erfolgte wie in Abbildung 29 beschrieben

Das Umkehrpotential des induzierten Stroms lag bei -80 mV, demnach wurde auch hier ein Kaliumstrom aktiviert. In 3 von 10 untersuchten, ramifizierten Mikroglia im akuten Hirnschnitt von adulten Mäusen konnte durch die Applikation von 1 mM Noradrenalin bei +60 mV ein Auswärtstrom von $35,5 \pm 9,97$ pA induziert werden (Abb. 45).

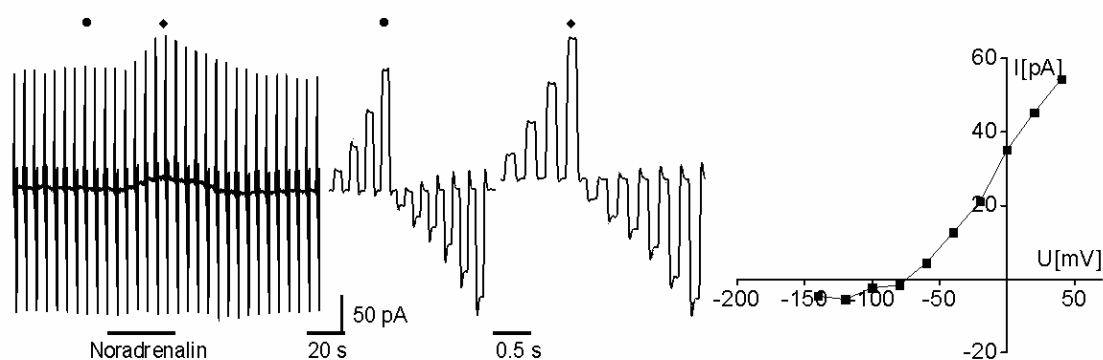


Abb. 45 Noradrenalin induziert einen auswärtsrektifizierenden Kaliumstrom in ramifizierten Mikroglia. Die Darstellung der Daten erfolgte wie in Abbildung 29 beschrieben

Das Umkehrpotential des aktivierten Stroms lag bei -80 mV. Um die in amöboiden und ramifizierten Mikroglia induzierten Stromantworten vergleichen zu können, wurden die Mittelwerte aller Reaktionen in Abbildung 46 zusammengefasst, dabei ergaben sich jedoch keine signifikanten Unterschiede.

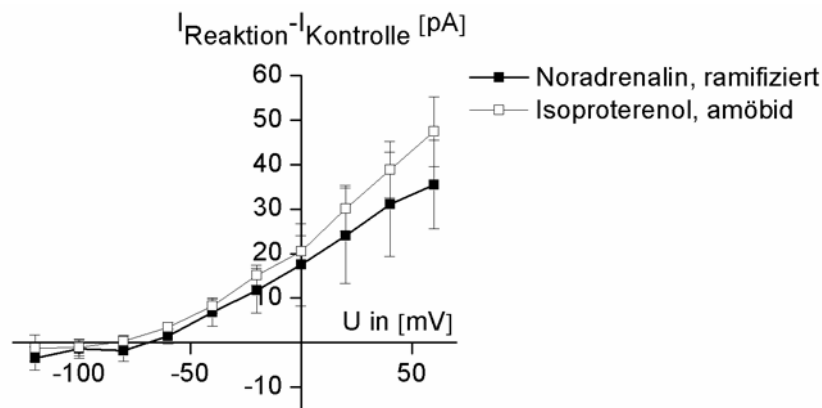


Abb. 46 Vergleich der durch Stimulation noradrenerger Rezeptoren induzierten Stromantworten in amöboiden und ramifizierten Mikroglia. Ramifizierte Mikroglia wurden mit Noradrenalin, amöboide Mikroglia mit α - (Metaraminol) und β -adrenergen (Isoproterenol) -Agonisten stimuliert. Dargestellt sind die Mittelwerte (\pm SEM) des induzierten Auswärtsstroms. Die Daten wurden wie in Abbildung 32 beschrieben ermittelt.

Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass amöboide und ramifizierte Mikroglia im akuten Hirnschnitt funktionelle, adrenerge Rezeptoren exprimieren. Im Unterschied zu kultivierten Zellen exprimieren amöboide Mikroglia jedoch keine α -adrenerge Rezeptoren.

Histaminerge Rezeptoren

Die Applikation von Histamin aktivierte in 9 der untersuchten 19 amöboiden Mikroglia ebenfalls einen Auswärtsstrom. Der induzierte Strom bei +60 mV betrug $47,41 \pm 7,87$ pA. Es konnte auch hier kein Effekt auf IR gemessen werden (Abb. 47).

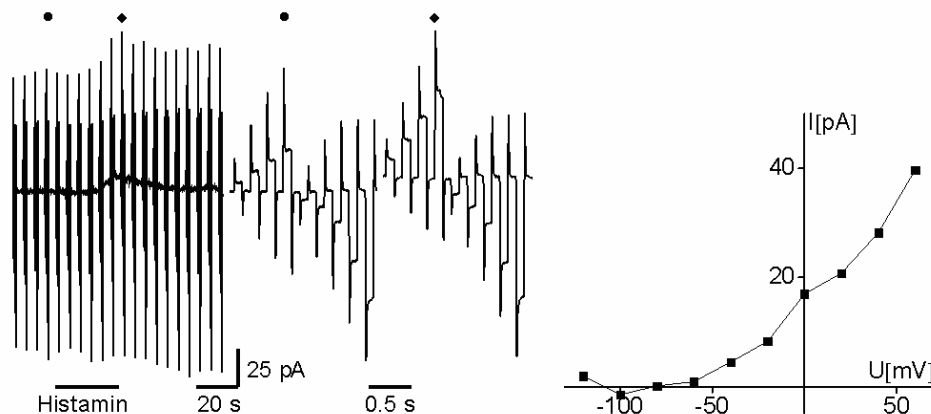


Abb. 47 Histamin induziert einen auswärtsrektifizierenden Kaliumstrom in amöboiden Mikroglia. Die Darstellung der Daten erfolgte wie in Abbildung 29 beschrieben

Das Umkehrpotential des induzierten Stroms lag bei -70 mV, demnach handelt es sich auch hier um einen Kaliumstrom. In 3 von 20 untersuchten, ramifizierten Mikroglia konnte durch die Applikation von 1mM Histamin ein Auswärtsstrom induziert werden. Bei +60 mV konnte eine mittlere Stromamplitude von $42,1 \pm 9,27$ pA gemessen werden (Abb. 483). Das Umkehrpotential der Stromantwort lag bei -70 mV.

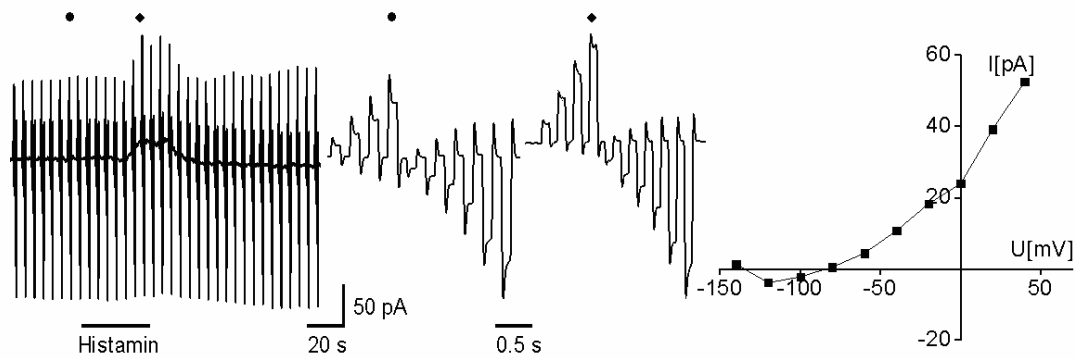


Abb. 48 Histamin induziert einen auswärtsrektifizierenden Kaliumstrom in ramifizierten Mikroglia. Die Darstellung der Daten erfolgte wie in Abbildung 29 beschrieben

Um die Reaktionen von amöboiden und ramifizierten Mikroglia vergleichen zu können, wurden die Mittelwerte aller Reaktionen in Abbildung 49 zusammengefasst.

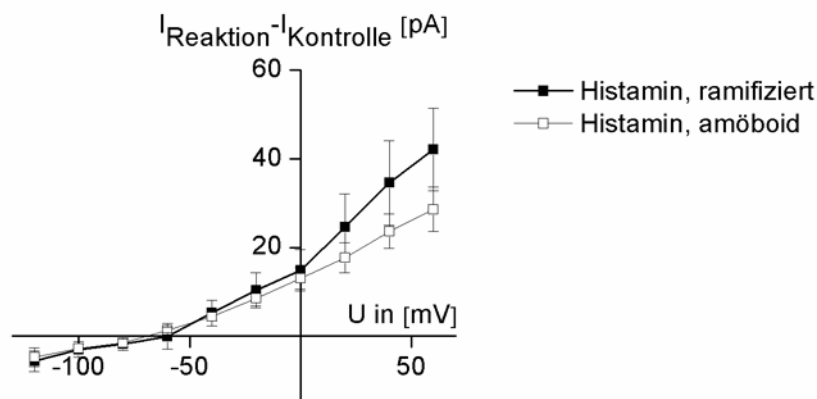


Abb. 49 Vergleich der durch Stimulation histaminerger Rezeptoren induzierten Stromantworten in amöboiden und ramifizierten Mikroglia. Dargestellt sind die Mittelwerte (\pm SEM) des induzierten Auswärtsstroms. Die Daten wurden wie in Abbildung 32 beschrieben ermittelt.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass amöboide und ramifizierte Mikroglia im akuten Hirnschnitt funktionelle Histamin-Rezeptoren exprimieren. Stimulation dieser Rezeptoren induziert in beiden Zelltypen die Induktion eines Kaliumauswärtsstroms, dessen Amplitude sich nicht signifikant unterscheidet.

Serotonerge Rezeptoren

Serotonin induzierte in 2 der untersuchten 13 amöboiden Mikroglia einen Auswärtsstrom. Bei +60 mV konnte eine Stromamplitude von $55,8 \pm 27,2$ pA gemessen werden. Im Unterschied zu allen anderen applizierten Transmittern konnte auch eine Reduktion des Einwärtsstroms um $40,4 \pm 32,75$ pA bei -120 mV gemessen werden. Das Umkehrpotential der Stromantwort lag auch hier mit -70 mV nahe dem Kaliumgleichgewichtspotential.

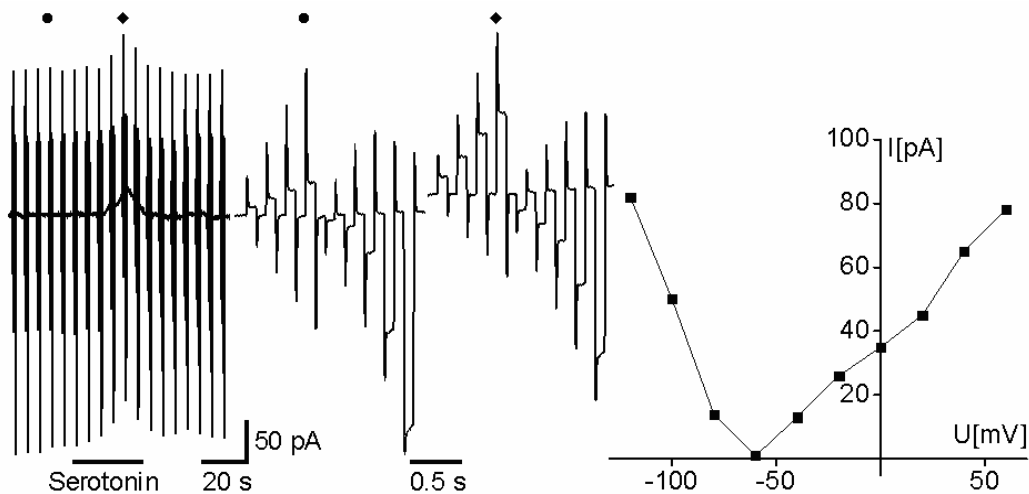


Abb. 50 Serotonin induziert einen auswärtsrektifizierenden Kaliumstrom und reduziert den einwärtsrektifizierenden Kaliumstrom in amöboiden Mikroglia. Die Darstellung der Daten erfolgte wie in Abbildung 29 beschrieben

Im akuten Hirnschnitt wurden 5 ramifizierte Mikroglia auf Serotonin-Rezeptoren untersucht, es konnte jedoch keine Stromänderung gemessen werden. Demnach konnten funktionelle serotonerge Rezeptoren nur in amöboiden nicht aber in ramifizierten Mikroglia nachgewiesen werden. Möglicherweise findet hier also eine Veränderung im Rezeptor-Expressionsmuster bei der Ramifizierung statt.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten funktionelle Rezeptoren für Dopamin, Noradrenalin, Histamin und Serotonin auf kultivierten und amöboiden Mikroglia sowie ramifizierten Mikroglia, mit Ausnahme von serotonergen Rezeptoren, im akuten Hirnschnitt nachgewiesen werden. In Abbildung 51 ist eine Zusammenfassung der induzierten Reaktionen dargestellt. In kultivierten Mikroglia induzierten alle Transmitter und auch die spezifischen Agonisten ein ähnliches Reaktionsmuster. Dopamin, Noradrenalin und Histamin stimulierten durch Bindung an die jeweiligen Rezeptoren sowohl in amöboiden als auch in ramifizierten Mikroglia eine nahezu identische Veränderung des Strommusters, demnach ist davon auszugehen, dass diese Transmitter-Rezeptoren alle an den gleichen Signaltransduktionsweg gekoppelt sind und möglicherweise dadurch auch die Funktionen der Zellen in ähnlicher Weise modulieren. Serotonin war der einzige Transmitter der auch eine Reduktion des Einwärtsstroms in amöboiden Mikroglia induzierte, jedoch in ramifizierten keine Reaktion auslöste, deshalb aktiviert dieser Transmitter möglicherweise andere Signalwege bzw. wird nur bei Aktivierungszuständen der Mikroglia funktionell exprimiert.

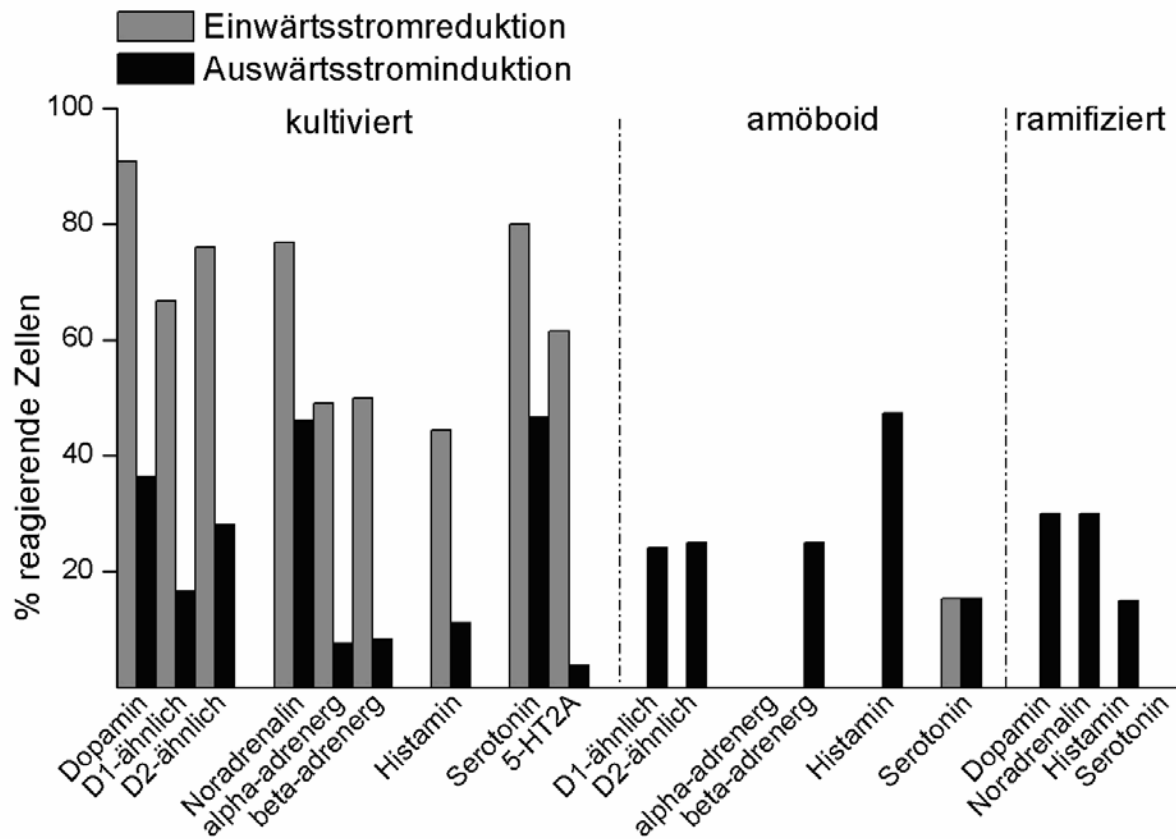


Abb. 51 Zusammenfassung der durch Transmitter-Applikation induzierten Reaktionen. Die reagierenden kultivierten, amöboiden und ramifizierten Mikroglia sind jeweils als Prozent der insgesamt untersuchten Zellen (100%) dargestellt.

Aufgrund dieser Daten kann man davon ausgehen, dass auch Mikroglia *in vivo* diese Rezeptoren exprimieren, da kaum anzunehmen ist, dass es innerhalb der 1-2 h nach Präparation der Hirnschnitte zu einer *de novo* Expression dieser Rezeptoren auf der Mikroglia kommt.