

5 DISKUSSION

5.1 Kv1.5 und Kv1.3 Kanäle modulieren essentielle Funktionen aktivierter Mikroglia

5.1.1 Der prominente K⁺ Auswärtsstrom aktivierter Mikroglia fließt möglicherweise durch Kv1.3/Kv1.5 Heteromere

Bislang ist noch nicht eindeutig geklärt, welcher Kv Kanal nach Aktivierung auf der Mikroglia exprimiert wird. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte geklärt werden, ob Kv1.5 und Kv1.3 Kanäle bei der Aktivierung der Mikroglia eine Rolle spielen und ob und welche Funktionen durch deren Expression moduliert werden. Dazu wurde zum einen die Kanal-Expression spezifisch mittels Antisense-Oligonukleotiden geblockt, zum anderen ein Kv1.5 Knockout-Tier verwendet. Durch elektrophysiologische Untersuchungen kann so ermittelt werden, ob und inwieweit Kv1.5 bzw. Kv1.3 Kanäle an der Ausprägung des Kaliumauswärtsstroms beteiligt sind.

Der Großteil der in der Literatur beschriebenen Daten spricht für die alleinige Expression des Kv1.3 Kanals (Schilling *et al.*, 2000; Schilling & Eder, 2003; Fordyce *et al.*, 2005; Newell & Schlichter, 2005; Khanna *et al.*, 2001; Visentin *et al.*, 2001). Die kinetischen Eigenschaften des, in Mikroglia exprimierten, auswärtsrektifizierenden Kaliumkanals entsprechen am ehesten denen von Kv1.3. Einerseits zeigen die, in Mikroglia gemessenen Ströme, kumulative Inaktivierung (Schlichter *et al.*, 1996), eine charakteristische Eigenschaft von transfizierten Kv1.3 Kanälen (Grissmer *et al.*, 1994). Auf der anderen Seite gibt es jedoch vielfältige Hinweise darauf, dass der Kv1.5 Kanal ebenfalls in Mikroglia exprimiert wird. Immunfärbungen weisen die Expression des Kv1.5 Kanals auf Mikrogliazellen *in vitro* und *in situ* nach (Pyo *et al.*, 1997; Kotecha & Schlichter, 1999).

Vor allem nach Aktivierung der Mikroglia konnte *in vivo*, durch die Injektion von LPS in den Cortex von Rattenhirnen eine signifikante Erhöhung der Kv1.5 Expression mittels Immunfärbung nachgewiesen werden, das Kv1.3 Expressionslevel blieb unverändert (Jou *et al.*, 1998). Auch durch Inkubation der Mikroglia mit Amyloidem Vorläufer-Protein (*amyloid precursor protein* APP), welches ebenfalls zu einer Aktivierung führt, konnte eine Beteiligung des Kv1.5 Kanals an der Aktivierung der Mikroglia nachgewiesen werden. Da die Inhibierung der Kv1.5 Expression durch Antisense-Oligonukleotide in den APP aktivierten Mikroglia zu einer Reduktion des Auswärtsstroms um 67,3% führte. Das gleiche Experiment wurde auch mit Kv1.3 spezifischen Antisense-Oligonukleotiden durchgeführt, dabei konnte jedoch nur eine Reduktion des Auswärtsstroms um 32,7% gemessen werden (Chung *et al.*, 2001). Diese Ergebnisse stimmen mit denen im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Daten überein, da auch hier eine stärkere Reduktion (um 73,9%) des Auswärtsstroms durch Inhibierung der Kv1.5 Expression erzielt werden konnte. Durch Blockierung der Kv1.3 Expression konnten 54,6% des Stroms geblockt werden. Demnach scheint der

Kv1.5 Kanal ebenfalls an der Ausprägung des K⁺ Auswärtsstroms nach Aktivierung der Mikroglia beteiligt zu sein. Aber auch in Vorstufen der aktivierten Mikroglia spielt dieser Kv-Kanal scheinbar eine Rolle, da ein Kv1.5 charakteristischer Strom in nichtproliferierenden Mikroglia aus Gewebeprints gemessen wurde (Kotecha & Schlichter, 1999).

Als weiterer Beweis dafür, dass nur Kv1.3 Kanäle für den K⁺-Auswärtsstroms in Mikroglia verantwortlich sind, galt die völlige Blockierung des Stroms mit Margatoxin, einem Kv1.3 spezifischen Toxin (Garcia-Calvo *et al.*, 1993). Neuere Untersuchungen ergaben jedoch, dass sich heterotetramere Komplexe aus Kv1.3 und Kv1.5 Proteinuntereinheiten bilden können und diese durch Margatoxin geblockt werden. Dazu wurden Kv1.5 und Kv1.3 Kanäle in HEK-293 Zellen co-exprimiert. Durch Co-Immünpräzipitation und *fluorescence resonance energy transfer* (FRET)-Analyse konnte eine Co-Lokalisation von Kv1.5 und Kv1.3 auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden. Durch Co-Expression von Kv1.5 und Kv1.3 Kanälen kam es außerdem zu einer Positivierung der halbmaximalen Aktivierung ($V_{1/2}$) (Vicente *et al.*, 2005). Darauf deuten möglicherweise auch die hier ermittelten Daten hin, da eine Blockierung der Expression des Kv1.5 Kanals zu einer Negativierung der halbmaximalen Aktivierung führt ($V_{1/2} = -20,7$ mV) im Vergleich zu Kontrollzellen ($V_{1/2} = -16,7$ mV).

Eine weitere kinetische Eigenschaft der untersuchten Kv Kanäle spricht für die Expression von Heteromeren. Kumulative Inaktivierung, ein charakteristisches Merkmal von Kv1.3 Kanälen (Grissmer *et al.*, 1994;Kotecha & Schlichter, 1999) konnte nur in sehr geringem Maße beobachtet werden. Würden nur Kv1.3 Kanäle exprimiert werden, sollte die kumulative Inaktivierung deutlich stärker ausgeprägt und wie in der Literatur beschrieben nach der 5. bis 6. Depolarisation zu einer fast völligen Blockierung des Kanals führen (Grissmer *et al.*, 1994;Kotecha & Schlichter, 1999). Da dies jedoch nicht der Fall ist, sondern lediglich eine geringe Verminderung der Stromamplitude ab der 2. oder 3. Depolarisation auftritt, scheinen Kanäle mit anderen kinetischen Eigenschaften exprimiert zu werden. Dem Kv1.5 Kanal kann das gemessene Stromprofil jedoch auch nicht zugeordnet werden, da diese Kanäle keine kumulative Inaktivierung zeigen. Demnach könnten auch diese Ergebnisse auf die Expression eines Heteromultimers hindeuten. Durch Blockierung der Kv1.5 bzw. Kv1.3 Expression konnten die kinetischen Eigenschaften jedoch nicht signifikant verändert werden. Da für die Messung von Aktivierung, Inaktivierung und kumulativer Inaktivierung nur die Antisense-Oligonukleotid-behandelten Zellen verwendet wurden, welche einen erkennbaren Auswärtsstrom aufwiesen, kann möglicherweise keine Veränderungen der Eigenschaften der exprimierten Ströme beobachtet werden. Die Menge der exprimierten Kv1.5 bzw. Kv1.3 Kanalproteine ist zwar reduziert, reicht jedoch noch für die Bildung von Heterodimeren, welche dann gleiche Eigenschaften wie Kanäle unbehandelter Zellen aufweisen. In den Kv1.5^{-/-} Mikroglia kommt wird das Fehlen des Kv1.5 Kanals möglicherweise durch Hochregulation der Expression eines anderen Kv-Kanals kompensiert. Mikroglia exprimieren Kv1.2

Kanäle (Kotecha & Schlichter, 1999) welche ebenfalls keine kumulative Inaktivierung zeigen (Grissmer *et al.*, 1994).

Die *steady-state* Inaktivierung der hier untersuchten Zellen spricht für die Expression von Kv1.3 Kanälen, da die Werte für die verschiedenen Modelle (Antisense-Oligonukleotid-Behandlung, Knockout) im Bereich von -40 bis -50 mV lagen, für Kv1.3 Kanäle in Mikroglia ist ein Wert von -38 mV in der Literatur angegeben (Kotecha & Schlichter, 1999).

Da auch für andere Mitglieder der Kv-Kanalfamilie beschrieben ist, dass diese Heteromultimere bilden können (Ruppersberg *et al.*, 1990;Zhu *et al.*, 2003), ist es vorstellbar das auch in Mikroglia Heteromultimere aus Kv1.5 und Kv1.3 Kanälen vorliegen. Die hier dargestellten Daten deuten darauf hin, dass sowohl Kv1.5 und Kv1.3 Kanalproteine an der Expression des Kaliumauswärtsstroms in aktivierten Mikroglia beteiligt sind, da bei Reduktion der Expression von Kv1.5 oder Kv1.3 bzw. Knockout des Kv1.5 Kanals die Stromdichte nach LPS-Aktivierung deutlich reduziert ist.

Applikation von 4-Aminopyridin (4-AP), einem Kv Kanalblocker, bewirkte eine Depolarisierung des Membranpotential demnach scheint ein direkter Zusammenhang zwischen Membranpotential und Kv-Kanalstrom zu bestehen (Pyo *et al.*, 1997). Im Rahmen dieser Arbeit konnte jedoch kein Zusammenhang zwischen der Reduktion der Kv 1.5 oder Kv1.3 Expression bzw. dem Knockout des Kv1.5 Kanals und dem Membranpotential gefunden werden. Nach LPS-Aktivierung wurden keine signifikanten Unterschiede im Membranpotential der verschiedenen Untersuchungsansätze gemessen.

Anhand der gemessenen Daten kann eher ein Zusammenhang zwischen der Expression des Einwärtsstroms und dem Membranpotential gesehen werden, da durch LPS-Aktivierung der IR deutlich reduziert wurde und das Membranpotential depolarisierte. Dies konnte auch in den, im zweiten Teil der Arbeit, untersuchten Mikroglia im akuten Hirnschnitt beobachtet werden. Kultivierte Mikroglia wiesen im Vergleich zu amöboiden und ramifizierten Mikroglia wesentlich größere Einwärtsströme und signifikant hyperpolarisierte Membranpotentiale auf.

Eine kürzlich erschienene Studie zeigt, unter Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen, die eine Änderung des Membranpotentials anzeigen, dass Chloridkanäle einen wesentlichen Einfluss auf das Membranpotential haben. Außerdem konnte gezeigt werden, dass Mikroglia Membranpotential-Oszillationen aufweisen, welche durch das Zusammenwirken von ein- und auswärtsrektifizierenden Kaliumströmen sowie durch Chloridströme erzeugt werden (Newell & Schlichter, 2005). Demnach ist also ein Zusammenspiel von Ein- und Auswärtsströmen für die De- bzw. Hyperpolarisierung des Membranpotentials verantwortlich. Da durch Antisense-Oligonukleotide die Expression der Kv-Kanäle und nicht der durch den Kanal fließende Strom geblockt wird wie mit 4-AP (Pyo *et al.*, 1997), kann die Zelle das völlige Fehlen des Kanals möglicherweise kompensieren und es kommt nicht zu einer Depolarisation des Membranpotentials.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in Mikroglia sowohl Kv1.3 als auch Kv1.5 Kanäle an der Ausprägung des prominenten Kaliumauswärtsstroms aktivierter Mikroglia beteiligt sind, und einiges dafür spricht, dass diese Kanäle möglicherweise Heteromultimere mit veränderten kinetischen und pharmakologischen Eigenschaften bilden, welche die mikroglialen Funktionen unterschiedlich modulieren. Dadurch wäre es möglich, schnell und präzise auf unterschiedliche Stimuli zu reagieren. Ob dies tatsächlich der Fall ist, muss jedoch noch geklärt werden.

5.1.2 Kv1.5 Kanal-Expression moduliert die NO-Freisetzung

Diverse Studien, z.B. (Kokovay & Cunningham, 2005; Goody *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2005) haben gezeigt, dass die NO-Freisetzung durch Mikroglia neurodegenerative Prozesse negativ beeinflussen bzw. direkt das Absterben von Neuronen bewirken kann (Chao *et al.*, 1992; Fordyce *et al.*, 2005; Dawson *et al.*, 1991; Boje & Arora, 1992). Mikroglia produzieren NO jedoch erst nach Aktivierung, welche durch diverse pathologische Veränderungen, wie z.B. bakterielle Infektionen (Meningitis), ischämische Zustände (Schlaganfall etc.) und degenerative Erkrankungen (Alzheimer, Parkinson etc.) hervorgerufen werden kann.

Die genaue Kenntnis der Mechanismen, die zur Produktion von NO durch Mikroglia führen, ist deshalb wichtig für das Verständnis der Rolle von Mikroglia in neurodegenerativen Erkrankungen. Bisher sind die Signalkaskaden, welche zur Aktivierung von Mikroglia führen, noch nicht vollständig untersucht, da sich erst in den letzten zwei Jahrzehnten herausgestellt hat, dass die Mikroglia neurodegenerative Prozesse maßgeblich beeinflussen kann.

Die Expression von Kaliumauswärtsströmen ist eine sehr frühe Modifikation der mikroglialen Eigenschaften im Aktivierungsprozess. Dies konnte durch elektro-physiologische Untersuchungen an ramifizierten Mikroglia im akuten Hirnschnitt gezeigt werden. Durch Läsion des Fazialisnervs wurde in diesen Mikroglia ein Kaliumauswärtsstrom induziert (Boucsein *et al.*, 2000). Die Expression von Kv1.5 Protein nach LPS Injektion in Rattenhirnen war bereits 8 h nach der Injektion nachweisbar, die Expression von iNOS Protein nach 12 h (Jou *et al.*, 1998). Außerdem konnte durch Verwendung des unspezifischen Kv-Kanal Blockers 4-Aminopyridin die NO-Freisetzung signifikant reduziert werden (Pyo *et al.*, 1997). Möglicherweise gibt es also einen Zusammenhang zwischen der Ausprägung des Kaliumkanals und der Expression von iNOS und der damit verbundenen Freisetzung von NO.

Die im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Daten weisen darauf hin, dass der Kv1.5 Kanal eine essentielle Rolle bei der Bildung von Stickstoffmonoxid in aktivierten Mikroglia spielt, da die Deletion des Kanals die NO-Synthese vollständig inhibiert. Des Weiteren wird durch den Knockout bzw. den Block der Expression des Kv1.5 Kanals die RNA-Expression des für die NO-Synthese notwendigen Enzyms (iNOS) reduziert. Demnach inhibiert dieser Kanal bereits die Produktion von NO, moduliert also bereits den Anfang des Signalwegs, der zur Entstehung von NO führt.

In Makrophagen konnte die iNOS Expression durch Blockierung des exprimierten Kv1.3 Kanals mit Margatoxin reduziert werden (Vicente *et al.*, 2003). Der Kv1.3 Kanal scheint in den hier untersuchten Zellen jedoch nicht an der Regulation der NO-Freisetzung beteiligt zu sein, da eine Verminderung der Expression dieses Kanals keinen Effekt auf die NO-Freisetzung bzw. Expression des Enzyms iNOS hatte. Diese Ergebnisse stimmen auch mit Untersuchungen überein, die zeigen konnten, dass Kv1.3 Kanal spezifische Blocker zwar den respiratorischen *Burst*, nicht jedoch die NO-Freisetzung aktivierter Mikroglia inhibieren (Fordyce *et al.*, 2005). Möglicherweise sind beide Kanäle also für die Regulation unterschiedlicher Zellfunktionen verantwortlich.

Eine Erhöhung des Kalziumspiegels könnte möglicherweise die Verbindung zwischen Kaliumauswärtsstrom und NO-Expression bilden. In diversen anderen Immunzellen, wie z.B. Lymphozyten, wurden Hinweise dafür gefunden, dass Kaliumauswärtsströme an der Repolarisierung des depolarisierten Membranpotentials beteiligt sind. Ein hyperpolarisiertes Membranpotential ist wiederum die Triebkraft für den Kalziumeinstrom durch CRAC-Kanäle (Lewis & Cahalan, 1995). Eine Erhöhung des Kalziumlevels scheint jedoch entscheidend für die Produktion von NO zu sein, da eine Blockierung der Erhöhung des Kalziumspiegels durch BAPTA nach LPS-Aktivierung eine signifikante Reduktion der NO Freisetzung bewirkt (Hoffmann *et al.*, 2003). Kalzium, als ein intrazellulärer Botenstoff kontrolliert die Genexpression (Berridge, 2001) und hat möglicherweise Einfluss auf die Expression von iNOS. Es ist vorstellbar, dass durch die Depolarisation des Membranpotentials nach LPS-Aktivierung und den dadurch aktivierten Kaliumausstrom der intrazelluläre Kalziumspiegel verändert und dadurch die Genexpression von iNOS aktiviert wird.

5.1.3 Kv1.5 und Kv1.3 spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation des Zellzyklus

Bei Mikroglia-Zellen ist noch unklar ob Kv-Kanäle an der Regulation des Zellzyklus beteiligt sind. Dafür, dass sie daran beteiligt sind, spricht, dass durch Aktivierung mit LPS die Expression von K⁺ Auswärtsströmen induziert und gleichzeitig die Proliferationsrate von Mikroglia reduziert wird (Norenberg *et al.*, 1992; Norenberg *et al.*, 1994). Das Kv-Kanäle die Proliferation modulieren, konnte jedoch in anderen Zelltypen wie B- und T-Lymphozyten, Schwannschen Zellen und Vorläuferzellen von Oligodendrozyten nachgewiesen werden (DeCoursey *et al.*, 1984; Chittajallu *et al.*, 2002; Gollapudi *et al.*, 1988; Konishi, 1989). Makrophagen verdreifachen die Expressionsrate des Kv1.3 Kanals nach Stimulation der Proliferation (Vicente *et al.*, 2003). In Oligodendrozyten bewirkte die Blockierung der Kv1.3 Kanal-Expression mit Antisense Oligonukleotiden einen Zellzyklusarrest während Kv1.5 Antisense Oligonukleotide keinen Effekt zeigten (Attali *et al.*, 1997). In Astrozyten dagegen konnte mit Kv1.5 spezifische Antisense Oligonukleotiden die Proliferation inhibiert werden (MacFarlane & Sontheimer, 2000). In verschiedenen Gliazelltypen hatte

demnach der gleiche Kv-Kanal-Typ jedoch unterschiedliche Effekte auf die Proliferation. In Zellen der glatten Muskulatur der Bronchien konnte durch Blockierung der Kv-Kanäle mit TEA eine Erhöhung der Proliferation induziert werden (Liu *et al.*, 2003). Demnach scheinen Kv Kanäle die proliferativen Eigenschaften von Zellen je nach Zelltyp ganz unterschiedlich zu beeinflussen.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass LPS eine Reduktion der Proliferationsrate und eine Expression von Kv Strömen induziert. Wird jedoch die Expression von Kv1.5 Kanälen reduziert, ist die Proliferationsrate von LPS-aktivierten und nichtaktivierten Mikroglia signifikant erhöht, außerdem kann die durch LPS-Aktivierung induzierte Reduktion der Proliferation nicht beobachtet werden. Demnach scheint dieser Kanal sowohl in nichtaktivierten als auch in aktivierten Mikroglia die Proliferation zu regulieren. Auch *in vivo* konnte ein Zusammenhang zwischen Proliferation und Kv1.5 Kanal Expression gefunden werden. Durch Läsion des Fazialisnervs werden Mikroglia im Fazialiskern aktiviert, was einerseits durch die Expression eines auswärtsrektifizierenden Kaliumstroms (Boucsein *et al.*, 2000) und andererseits durch Induktion der Proliferation (Schiefer *et al.*, 1999;Kreutzberg, 1996) gekennzeichnet ist. Deletion des Kv1.5 Kanals, wie hier gezeigt werden konnte, führt zu einer, im Vergleich zum Wildtyp, erhöhten Anzahl proliferierender Mikroglia im Fazialiskern. Da jedoch die Gesamtzahl der Mikroglia im Knockout-Tier sich nicht signifikant von der im Wildtyp unterschied, ist davon auszugehen, dass weniger Mikroglia in den Fazialiskern eingewandert sind, möglicherweise Aufgrund einer verminderten Aktivierung der Mikroglia wegen des Fehlens des Kv1.5 Kanals.

Zusammenfassend konnte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* nachgewiesen werden, dass der Kv1.5 Kanal die Proliferation von Mikroglia beeinflusst. Der Kanal scheint jedoch hemmend auf den Zellzyklus zu wirken, da das Fehlen des Kanals eine Steigerung der Proliferation bewirkt.

Die Blockierung der Expression von Kv1.3 Kanälen bewirkte ebenfalls eine Steigerung der Proliferation und zwar in noch größerem Maße als die Blockierung der Kv1.5 Kanäle. Jedoch konnte LPS hier eine Reduktion der Proliferationsrate induzieren, was möglicherweise darauf hindeutet, dass dieser Kanal in aktivierten Mikroglia keinen inhibierenden Einfluss auf die Proliferation hat, sondern dies nur durch den Kv1.5 Kanal bewirkt wird.

Die hier ermittelten Daten deuten darauf hin, dass die Expression von beiden Kv Kanälen, Kv1.3 und Kv1.5, eine wichtige Rolle bei der Regulation der Proliferation spielt. Die Expression der Kanäle wirkt hemmend auf die Proliferation, da eine Verminderung der Kv1.5 oder Kv1.3 Expression bzw. der Knockout des Kv1.5 Kanals die Proliferationsrate erhöht. Das würde bedeuten, dass aktivierte Mikroglia, welche K⁺ Auswärtsströme exprimieren nicht oder zumindest vermindert proliferieren. Proliferation von Mikroglia findet zum einen während der Entwicklung des ZNS statt, bei der amöboide Mikroglia in das Gehirn einwandern. Diese Zellen exprimieren, wie im Rahmen dieser Arbeit gezeigt, keine K⁺ Auswärtsströme. Bei pathologischen

Veränderungen im Gehirn kann es ebenfalls zur Proliferation von Mikroglia kommen, wie z.B. bei der hier untersuchten Fazialis-Axotomie. Mit Hilfe dieses Modells konnte nachgewiesen werden, dass in Mikroglia 24 h postoperativ ein Auswärtsstrom induziert wird, zu diesem Zeitpunkt kann noch keine erhöhte Proliferation nachgewiesen werden. Drei Tage nach der Operation ist dieser Auswärtsstrom nahezu wieder verschwunden, jedoch eine signifikant erhöhte Proliferation der Zellen messbar (Boucsein *et al.*, 2000;Raivich *et al.*, 1994). Möglicherweise ist die Expression dieses Auswärtsstroms notwendig um die Mikroglia zunächst in reaktiven Zustand zu versetzen, um eine erste Immunabwehr z.B. durch Freisetzung von NO zu ermöglichen. Erst in einem späteren Aktivierungsstadium wird dann durch die Reduktion des Auswärtsstroms Proliferation induziert.

5.2 Neurotransmitter-Rezeptoren auf Mikroglia

5.2.1 Vergleich der verwendeten Zellmodelle

Für die Charakterisierung von Neurotransmitter-Rezeptoren wurden drei verschiedene Mikroglia-Populationen verwendet. Kultivierte Mikroglia sind bereits in einem aktivierten Zustand, da sie im Vergleich zu ramifizierten Mikroglia im Hirn einen sehr stark ausgeprägten Kaliumeinwärtsstrom exprimieren. Diese Zellen sollten demnach als Modell für bereits im Aktivierungsprozess befindliche Mikroglia dienen. Da kultivierte Mikroglia sehr einfach elektrophysiologisch zu charakterisieren sind, sollte zunächst mit Hilfe dieser Zellen untersucht werden ob überhaupt Rezeptoren für Dopamin, Noradrenalin, Histamin und Serotonin exprimiert werden, da dies der Fall war wurden auch Mikroglia im akuten Hirnschnitt hinsichtlich der Expression dieser Rezeptoren untersucht. Dadurch sollte der Beweis erbracht werden, dass Mikroglia *in vivo* tatsächlich diese Rezeptoren besitzen und dadurch in der Lage sind mit Neuronen zu kommunizieren. Im akuten Hirnschnitt wurden amöboide und ramifizierte Mikroglia untersucht da amöboide Mikroglia Eigenschaften aktivierter Mikroglia aufweisen (Migration, Phagozytose) und möglicherweise anders auf Transmitter-Applikation reagieren als ruhende (ramifizierte) Mikroglia. Aus Unterschieden im Reaktionsmuster dieser beiden Mikroglia-Populationen könnte man dann Rückschlüsse auf die Funktion von Neurotransmitter-Rezeptoren auf amöboiden bzw. ruhenden Mikroglia ziehen.

Die elektrophysiologische Charakterisierung der drei Mikroglia-Populationen ergab zunächst Unterschiede im exprimierten Strommuster. In den kultivierten Mikroglia konnte ein sehr viel stärker ausgeprägter K⁺-Einwärtsstrom gemessen werden, welcher scheinbar maßgeblich das Membranpotential beeinflusst, da dieses bei den kultivierten Zellen wesentlich näher am Gleichgewichtspotential der Kaliumionen lag als das der amöboiden und ramifizierten Mikroglia, welche wesentlich schwächer ausgeprägte Kaliumeinwärtsströme aufwiesen. Auch bei Mikroglia in akuten Hirnschnitten, welche durch Tomatolektion-Färbung identifiziert wurden, konnte ein

deutlich positiviertes Membranpotential (-15 mV) und nahezu keinen Kaliumeinwärtsstrom nachgewiesen werden (Boucsein *et al.*, 2000). Die Hyperpolarisierung des Membranpotentials scheint ebenfalls mit der Aktivierung dieser Zellen zu korrelieren, da auch bei aktivierten Mikroglia nach Fazialisnerv-Axotomie ein deutlich negativeres Membranpotential als bei den nichtaktivierten Mikroglia gemessen werden konnte (Boucsein *et al.*, 2000). An den drei untersuchten Mikroglia-Populationen konnte sehr gut der stufenweise Übergang vom ruhenden in einen aktivierteren Zustand beobachtet werden. Ramifizierte Mikroglia wiesen nahezu keine einwärtsrektifizierenden Kaliumleitfähigkeiten und ein stark depolarisiertes Membranpotential auf, durch die zunehmende Aktivierung bei amöboiden bzw. kultivierten Mikroglia wurden die einwärtsrektifizierenden Kaliumströme im größer, dass Membranpotential hyperpolarisierter. Vollständig aktivierte Mikroglia hingegen, weisen wie im ersten Teil der Arbeit an LPS-stimulierten Zellen gezeigt deutlich reduzierte einwärtsrektifizierende, dafür aber prominente auswärtsrektifizierende Kaliumströme auf, das Membranpotential ist bei diesen Zellen wieder etwas depolarisiert, im Vergleich zu den LPS-aktivierten Zellen. Demnach scheint möglicherweise ein Zusammenhang zwischen K^+ -Einwärtsstrom und Membranpotential zu bestehen. Dafür sprechen wie bereits erwähnt auch die im ersten Teil dieser Arbeit erhaltenen Daten von LPS-aktivierten Mikroglia.

Ein hyperpolarisiertes Membranpotential ist die Triebkraft für den Kalziumeinstrom durch CRAC-Kanäle (Lewis & Cahalan, 1995). Kalzium, als ein intrazellulärer Botenstoff kontrolliert die Genexpression (Berridge, 2001). Möglicherweise werden also durch unterschiedliche Membranpotentiale Zellfunktionen zu moduliert. Ein eher hyperpolarisiertes Membranpotential ist möglicherweise für eine Aktivierung der Zellen verantwortlich, da auch bei aktivierten Mikroglia nach Fazialisnerv-Axotomie ein deutlich negativeres Membranpotential als bei den nichtaktivierten Mikroglia gemessen werden konnte (Boucsein *et al.*, 2000).

5.2.2 Neurotransmitter induzierte Stromantworten in Mikroglia

Die Funktion von Mikroglia besteht darin, die empfindlichen Neurone vor pathologischen Einflüssen zu schützen, sowie deren Entwicklung durch neurotrophische Faktoren zu unterstützen. Neurone müssen deshalb die Möglichkeit haben die Funktionen der Mikroglia zu modulieren, um entweder die inflammatorischen Funktionen bei pathologischen Veränderungen zu aktivieren oder aber im gesunden Gehirn die Bildung von neurotrophischen Faktoren zu induzieren. Demnach sollte es eine Form der Kommunikation zwischen Neuronen und Mikroglia geben. Da Neurone untereinander durch die Sekretion von Neurotransmittern Signale weiterleiten, schien es nahe liegend, dass sie auch mit Mikroglia über diese Stoffe kommunizieren. Dafür benötigen Mikroglia jedoch funktionelle Rezeptoren für Neurotransmitter. Einige dieser Rezeptoren. z.B. für die Aminosäuren GABA oder Glutamat konnten bereits auf der Mikroglia identifiziert werden. Im Rahmen dieser Arbeit sollte unter-

sucht werden, ob Mikroglia funktionelle Rezeptoren für die als biogene Amine zusammengefassten Neurotransmitter, Dopamin, Noradrenalin, Histamin und Serotonin besitzen. Rezeptoren für die genannten Neurotransmitter sind, mit Ausnahme des adrenergen Rezeptor-Subtyps β_3 , an G-Proteine gekoppelt. In murinen Mikroglia wurden G-Protein-aktivierte, auswärtsrektifizierende K^+ Kanäle identifiziert (Ilshner *et al.*, 1995; Ilshner *et al.*, 1996). Demnach besitzen Mikroglia die für die Funktion dieser Rezeptoren notwendigen Signalkaskaden. Durch Applikation von GABA bzw. spezifische Rezeptoragonisten konnte ein Kaliumauswärtsstrom in Mikrogliazellen induziert werden (Kuhn *et al.*, 2004). Durch Verwendung von GTP γ S, einem konstanten Aktivator von G-Proteinen, konnte gezeigt werden, dass der exprimierte Einwärtsstrom innerhalb von Minuten geblockt wurde. Gleichzeitig mit der Reduktion des Einwärtsstroms wurde ein Auswärtsstrom exprimiert (Ilshner *et al.*, 1995). Mikroglia exprimieren also funktionelle Neurotransmitter-Rezeptoren, deren Stimulation die Aktivierung von nachgeschalteten G-Proteinen zur Folge hat, welche wiederum Kaliumkanäle beeinflussen. Demnach kann eine Veränderung der Kaliumströme nach Applikation von Neurotransmitter als Indiz dafür gesehen werden, dass die Zelle funktionelle Rezeptoren besitzt. Stromänderungen können mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik nachgewiesen werden, deshalb wurden in der vorliegenden Arbeit Mikroglia gepatcht und gemessen, ob die Applikation von Dopamin, Noradrenalin, Serotonin und Histamin eine Stromänderung hervorruft.

Die bereits beschriebene Reduktion des Einwärtsstroms (Ilshner *et al.*, 1995) konnte in den untersuchten, kultivierten Mikroglia durch alle applizierten Neurotransmitter bzw. Rezeptor-Agonisten induziert werden (Farber *et al.*, 2005). Die Induktion eines Auswärtsstroms erfolgte jedoch nur in einem kleineren Teil der reagierenden, kultivierten Mikroglia. Durch Bestimmung des Umkehrpotentials des induzierten Stroms konnte ermittelt werden, dass es sich dabei um einen Kaliumstrom handelt. Die Aktivierung von G-Protein gekoppelten Kaliumströmen induzierte die Migration von Mikroglia (Ilshner *et al.*, 1996), möglicherweise können Neurotransmitter demnach chemotaktisch auf diese Zellen wirken. Eine chemotaktische Wirkung könnte vor allem für einwandernde amöboide Mikroglia wichtig sein, um ihre endgültige Position im Gehirn zu finden. Deshalb sollte untersucht werden, ob amöboide Mikroglia im akuten Hirnschnitt Neurotransmitter-Rezeptoren exprimieren und ob deren Stimulation zur Induktion eines Kaliumauswärtsstroms führt. Diese Untersuchungen ergaben, dass Mikroglia auf Applikation der vier verschiedenen Transmitter mit der Induktion eines Auswärtsstroms reagieren. Das Umkehrpotential dieses Stroms lag ebenfalls dicht bei dem errechneten Kaliumgleichgewichtspotential. Es ist also vorstellbar das Neurotransmitter die Einwanderung amöboider Mikroglia steuern und sie gezielt zu Orten erhöhter Neurotransmitter-Freisetzung leiten (Farber *et al.*, 2005). Diese These wird durch Untersuchungen bestätigt, dies zeigen, dass Dopamin die Migration von kultivierten Mikroglia induziert (Farber *et al.*, 2005).

Ob Neurone durch die Ausschüttung von Neurotransmittern auch Funktionen von ramifizierten Mikroglia modulieren können sollte im letzten Teil der Arbeit geklärt werden. Dazu wurden ramifizierte Mikroglia in akuten Hirnschnitten hinsichtlich Transmitter-Rezeptor-Expression untersucht. Auch in diesen Zellen konnte, wie bei den amöboiden Mikroglia ein Kaliumauswärtsstrom induziert werden. Eine ähnliche Reaktion konnte in ramifizierten Mikroglia auch durch Applikation von ATP induziert werden (Boucsein *et al.*, 2003). Ob die Neurotransmitter Funktionen ramifizierter Mikroglia modulieren ist jedoch noch nicht untersucht.

In vivo Untersuchungen im gesunden Hirn konnten zeigen, dass die Fortsätze ramifizierter Mikroglia kontinuierlich das umgebende Gewebe abtasten und Partikel aufnehmen (Nimmerjahn *et al.*, 2005). Dadurch ist die Mikroglia in der Lage Veränderungen des umgebenden Gewebes wahrzunehmen. Vermutlich können Mikroglia dadurch auch Änderungen in der Konzentration von Neurotransmittern wahrnehmen und darauf reagieren. Bisherige Untersuchungen konnten nur bei bereits aktivierten Mikroglia eine Wirkung von Neurotransmittern nachweisen.

Dopamin moduliert wichtige Zellfunktionen aktivierter Mikroglia (Farber *et al.*, 2005). Zum einen reduziert Dopamin die LPS induzierte NO Freisetzung (Chang & Liu, 2000), zum anderen aktiviert es mikrogliale Migration (Farber *et al.*, 2005). Auch Noradrenalin reduzierte die Freisetzung von NO, IL-6 und TNF α von aktivierten Mikroglia (Chang & Liu, 2000; Farber *et al.*, 2005; Hetier *et al.*, 1991). Außerdem konnte eine erhöhte Expression des anti-apoptotischen Proteins BCL-XL, eines für die Serin-Synthese wichtigen Enzyms (L-Serin ist eine essentielle Aminosäure für Neurone), sowie des Noradrenalin degradierenden Enzyms Catechol-O-Methyl-transferase durch Stimulation adrenerger Rezeptoren induziert werden (Mori *et al.*, 2002). Für Serotonin konnte eine hemmende Wirkung auf den respiratorischen Burst von aktivierten Mikroglia nachgewiesen werden (Huether *et al.*, 1997).

Dopamin, Noradrenalin und Serotonin wirken haben demnach eine attenuierende Wirkung auf Funktionen aktivierte Mikroglia. Möglicherweise sorgen die im ZNS freigesetzten Neurotransmitter dafür, dass die Mikroglia in einem ramifizierten Stadium verharren (Farber *et al.*, 2005) und stimulieren vielleicht die Produktion und Freisetzung neurotropher Substanzen durch die Mikrogliazellen.