

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Inflammatorische Schädigungen des Hirngewebes

Entzündungsreaktionen dienen dem Körper zum Schutz gegen innere und äußere Angriffe. Ziel einer Entzündung ist es, den Körper in eine erhöhte Abwehrbereitschaft zu versetzen, was mit einer gesteigerten Immunantwort verbunden ist und letztendlich dazu dient, die Integrität des Organismus wieder herzustellen. Auch soll der Zerstörung des Gewebes entgegengewirkt und diese durch Reparaturprozesse wieder rückgängig gemacht werden. Im allgemeinen hat eine Entzündungsreaktion einen akuten Verlauf und kommt in einigen Tagen oder innerhalb weniger Wochen wieder zum Stillstand. Chronische Entzündungen treten dann auf, wenn das auslösende Agens nicht eliminiert werden kann oder sich die Immunantwort in Form von Autoimmunreaktionen verselbständigt (GEMSA et al., 1991).

Das zentrale Nervensystem (ZNS) galt lange Zeit als immunprivilegierte Region. Zum einen, weil es kein lymphatisches System innerhalb des Gehirns gibt, wobei die Arachnoidea und der Virchow-Robin-Raum eine Ausnahme bilden, und zum anderen, weil sich das Gehirn von anderen Organen durch das Vorhandensein einer sehr effektiven und anatomisch besonders gestalteten Blut-Hirn-Schranke unterscheidet. Bei Wirbeltieren mit geschlossenem Blutkreislaufsystem wird sie von Astrozytenfortsätzen, den Endothelzellen der Kapillaren und der Basalmembran gebildet. Da diese Endothelzellen im Gegensatz zu den Kapillarendothelien anderer Organe kaum transzelluläre Poren besitzen und untereinander mit Tight junctions verbunden sind, schotten sie das Kapillarlumen gegen das Interstitium des Gehirns ab (WEHNER & GEHRING, 1990). Durch diese anatomische Besonderheit können lipidlösliche Substanzen durch die Endothelschranke diffundieren. Metabolite wie Glucose und manche Aminosäuren werden von Transportproteinen in der inneren und äußeren Endothelzellmembran durch die Blut-Hirn-Schranke geschleust. Serumbestandteile, Antikörper und immunkompetente Zellen aus der Körperperipherie haben dagegen nur einen extrem eingeschränkten Zutritt zum Hirngewebe (FABRY et al., 1994; LASSMANN et al., 1991).

Durch die strenge Selektion der das ZNS überwachenden Immunzellen wird somit das Risiko einer Schädigung von außen so gering wie möglich gehalten. Dies ist im Bereich des ZNS deshalb besonders wichtig, da sich bereits geringste Schädigungen deleträr auswirken können und weil die Möglichkeiten der neuronalen Regeneration sehr begrenzt sind. Trotz dieser erhöhten Schutzmaßnahme können jedoch auch im Gehirn inflammatorische Prozesse beobachtet werden. Werden Neurone beispielsweise durch akute mechanische oder biochemische Einflüsse geschädigt, erfolgt eine Kaskade von Ereignissen, die zum neuronalen Zelltod führen kann. Auslöser der Neurodegeneration können dabei Störungen der Ionenverteilung und der Verlust von Membranpotentialen sowie eine massive Freisetzung von Neurotransmittern sein. Durch eine veränderte Kalzium-Homöostase kommt es zur Freisetzung großer Mengen exzitatorischer Neurotransmitter. Diese führen über deren Bindung an ionotrope Glutamatrezeptoren zu einer

ausgeprägten intraneuronalen Bildung von reaktiven Sauerstoffradikalen (HALLIWELL, 2001; KOUTSILIERI et al., 2002), welche mit neuronalen Makromolekülen reagieren können und unter den Bedingungen eines Primärschadens kumulieren und toxisch wirken können. Darauffolgend setzen die in dem betroffenen Gebiet geschädigten Neurone verschiedene Faktoren, wie Nukleoside, Nukleotide, Glutamat und Kalzium in den extrazellulären Raum frei (HANSSON & RÖNNBÄCK, 2003; INOUE, 2002). Diese Moleküle verändern das physiologische Gleichgewicht im geschädigten Gehirnareal und bewirken unter anderem eine schnelle Aktivierung immunkompetenter Zellen (GEHRMANN et al., 1995). Zu diesen Zellen gehören insbesondere Mikrogliazellen, die intrinsischen Gehirnmakrophagen, die primär für die Entzündungsreaktion verantwortlich sind, wobei nicht nur die Einwanderung dieser Zellen in das geschädigte Gewebe entscheidend ist, sondern ebenso, daß diese dort aktiv werden (CAMPANELLA et al., 2002, KREUTZBERG, 1995, BANATI et al., 1993a). Durch die Produktion einer Vielzahl von Substanzen, wie Zytokinen (HANISCH, 2002), Chemokinen (RANSOHOFF, 2002), Adhäsionsmolekülen (RAIVICH et al., 1999), Sauerstoffradikalen (FLOYD, 1999; KOUTSILIERI et al., 2002) und Stickstoffoxid (LIU et al., 2002) greifen aktivierte Mikrogliazellen in alle Stadien der Neuroinflammation ein und sind maßgeblich an der Auslösung, Regulation, aber auch an der Suppression der Immunantwort beteiligt. Infolge der zahlreichen Faktoren, die im Prozeß der Inflammation von Mikrogliazellen und anderen invadierten Immunzellen, wie peripheren Leukozyten und T-Zellen gebildet werden können, entsteht zeitlich versetzt eine sekundäre Neurodegeneration, wobei sublethale Neurone, die den Primärschaden initial überlebt haben, abgetötet werden. Obwohl Immunzellen, die in die Entzündungsstelle einwandern, in erster Linie dazu dienen, die Entzündung einzudämmen und zur Regeneration des Gewebes beizutragen (STREIT et al., 1999), kann es durch ein inflammatorisches Geschehen ebenso zu Ausfallserscheinungen und Schädigungen von neuronalem Gewebe kommen (KALB, 1995; SCHWAB & BARTHOLDI, 1996). Dieser Funktionsausfall resultiert zum einen daraus, daß Nervenzellen sich schlecht regenerieren können und zum anderen aus der Produktion zytotoxischer Komponenten durch infiltrierende Immunzellen im Gebiet der neuronalen Schädigung (FADEN, 1993; POVLISHOCK & JENKINS 1995; MORGANTI-KOSSMANN et al., 2002).

Der Verlauf einer Neuroinflammation ist daher immer von dem auslösenden Reiz, der Anzahl der eingewanderten und aktivierten Mikrogliazellen/Makrophagen, aber ebenso von der Anzahl und Art anderer mitbeteiligter Immunzellen sowie von der Gewebeart abhängig (SCHWARTZ, 2003; PIEHL & LINDMAN, 2001). Therapeutische Maßnahmen konzentrieren sich, basierend auf diesen Erkenntnissen, zum einen auf die Stimulation der neuronalen Regeneration (CARONI & SCHWAB, 1988; NEUMANN & WOOLF, 1999) und zum anderen auf die Neuroprotektion initial überlebender Neurone, indem die Immunantwort, von den in das Schadensgebiet invadierenden Zellen, unterdrückt werden soll (BENVENISTE, 1997; EMSLEY & TYRRELL, 2002; MORGANTI-KOSSMANN et al. 2002).

## **1.2 Mikroglia-immunkompetente Zellen des Gehirns**

### **1.2.1 Allgemeine Einführung**

Am Aufbau des zentralen und peripheren Nervensystems sind neben den Neuronen, die für die Erregungsbildung, -verarbeitung und -weiterleitung verantwortlich sind, Gliazellen beteiligt. 90 % der Zellen im Gehirn sind Gliazellen. Im Nervensystem erfüllen sie die Aufgabe des Bindegewebes und dienen der mechanischen Stabilisierung von Neuronen sowie dem Auf- und Abbau neuronal wichtiger Verbindungen. Sie sind an der synaptischen Erregungsübertragung beteiligt, dem Stoffaustausch, aber auch an der elektrischen Isolierung und Markscheidenbildung. Während der Entwicklung bilden sie vielfach Leitstrukturen für auswachsende Neurone. Zudem sind Gliazellen bei Degenerations- und Regenerationsvorgängen von Nervenzellen des ZNS beteiligt (LEONHARDT, 1985).

Zu den Gliazellen im ZNS gehören die Astrozyten und Oligodendrozyten. Weiterhin zählen die Ependymzellen und, als Sonderform der Ependymzellen, das Epithel der Plexus choroidei, das einen großen Teil des Liquor cerebrospinalis produziert, dazu. Eine besondere Gliazellart sind die Mikrogliazellen, die auch als immunkompetente Zellen des Gehirns bezeichnet werden. Mikrogliazellen sind hochreaktive, mobile und multifunktionelle Zellen des ZNS und übernehmen sowohl im gesunden als auch im pathologisch veränderten Gehirn eine wichtige Funktion (NAKAJIMA & KOHSAKA, 1998). Da es im ZNS kaum ein pathologisches Ereignis gibt, an dem Mikrogliazellen nicht beteiligt sind, wird deutlich, welche wichtige Position diese Zellen in der Erforschung und Bekämpfung neuropathologischer Vorgänge einnehmen. Aufgrund dieser Tatsache bilden Untersuchungen über die mikroglialen Aktivierungsmechanismen, sowie die Suche nach Faktoren, die in diese Aktivierungskaskade inhibierend eingreifen können, den Schwerpunkt dieser Arbeit.

### **1.2.2 Herkunft und Verteilung im Gehirn**

Mikrogliazellen wurden erstmals von P. del Rio Hortega als eigenständiger Zelltyp des Gehirns beschrieben, der an krankhaften Veränderungen im Gehirn beteiligt ist und von monozytären/mesodermalen Zellen abstammt (DEL RIO HORTEGA, 1919; DEL RIO HORTEGA, 1932). Tatsächlich lassen sich alle anderen Zelltypen des Gehirns aus dem Neuroektoderm ableiten, während die Herkunft der Mikrogliazellen auf eine Abstammung von monozytären Zellen des Blutes, die während der embryonalen und frühen postnatalen Phase das Gehirn infiltrieren, deutet (RAIVICH et al., 1999). Hier ist die Mikroglia zunächst noch aktiv und an der Gehirnmodellierung und Gehirnreifung beteiligt (BARRON, 1995). Sie konvertiert dann aber in ramifizierte residente Mikroglia. Erst als Antwort auf einen neuronalen Schaden oder mit zunehmenden Alter werden Mikrogliazellen wieder aktiv und nehmen eine amöboide Gestalt an. Zu den spezifischen morphologischen Veränderungen treten dann spezielle immunphänotypische und funktionelle Eigenschaften hinzu (siehe Kapitel 1.2.4). Mikrogliazellen nehmen einen Anteil von 20 % der gesamten Gliazellpopulation im Zentralen Nervensystem ein (KREUTZBERG, 1995). Dabei sind sie sowohl in der grauen als auch in der weißen

Substanz lokalisiert, wobei etwas größere Mengen in der grauen Substanz, im zerebralen Kortex und im Hippokampus und unterschiedliche Mengen im dorsalen Thalamus vorkommen (GEBICKE-HAERTER et al., 1998). Basierend auf histologischen und immunphänotypischen Kriterien kann Mikroglia in zwei Klassen unterteilt werden: die perivaskulären Zellen und die intraparenchymale Mikroglia. Perivaskuläre Zellen oder perivaskuläre Makrophagen werden von der Basallamina der Blut-Hirn-Schranke umgeben (THOMAS, 1999) und vermutlich kontinuierlich durch mononukleäre Zellen aus dem Blutkreislauf ergänzt (LAWSON et al., 1992; GEHRMANN et al., 1995; PRILLER et al., 2001). Die intraparenchymale Mikroglia steht in direktem Kontakt mit der parenchymalen Seite der vaskulären Basallamina des ZNS und repräsentiert die eigentliche residente Mikroglia im Gehirn (GEHRMANN et al., 1995). Sie unterliegt keinem oder nur einem sehr geringen Austausch durch Zellen aus dem Knochenmark (LASSMANN et al., 1993). Beide Zelltypen spielen eine wichtige Rolle bei pathologischen Prozessen im ZNS, zum einen durch ihre strategische Lokalisation in der Nähe der Blut-Hirn-Schranke und zum anderen durch ihre schnelle und spezifische Transformation in eine immunkompetente, zytotoxisch und phagozytotisch aktive Zelle.

### 1.2.3 Physiologische Funktionen der Mikroglia

Residente Mikrogliazellen weisen einen herunterregulierten Immunphänotyp auf, der durch eine spezielle Morphologie, einen Mangel an endozytotischer und phagozytotischer Aktivität und durch eine geringe Expression des Leukozytenantigens CD45 gekennzeichnet ist (SEDGWICK & HICKEY, 1997). In diesem Zustand sind die Zellen speziell an die Mikroumgebung des ZNS adaptiert (siehe **Abbildung 1.1**). Sie erfüllen im gesunden Gehirn als immunkompetente Zellen eine überwachende Funktion, wobei Mikroglia nicht nur auf Veränderungen der strukturellen Integrität im Gehirn, sondern auch auf verschiedenste Veränderungen in ihrer Mikroumgebung, hoch sensitiv reagieren kann. Die Zellen können mit Neuronen, Endothelzellen und anderen Gliazellen kommunizieren und registrieren die Zusammensetzung und Konzentration von Ionen, Aminosäuren und anderen Signalmolekülen im extrazellulären Milieu (HANSSON & RÖNNBÄCK, 2003). Mikrogliazellen besitzen Membranrezeptoren für verschiedene Transmitter wie Glutamat, Acetylcholin und Noradrenalin (KREUZBERG, 1996; CICCARELLI et al., 2000) und weisen einwärts gerichtete Kaliumkanäle auf, die sie sehr sensitiv auf erhöhte extrazelluläre Kaliumkonzentrationen reagieren lassen (ILLES et al., 1996; BANATI, 2003). Purinerge Rezeptoren, die durch ATP stimuliert werden, bewirken einen intrazellulären Kalziumanstieg, wobei die über Kalzium vermittelte Signaltransduktion ein wichtiger Mechanismus ist, über den die Zellen im ZNS kommunizieren und sich gegenseitig beeinflussen können (PASTI et al., 1997; FIELDS & STEVENS-GRAHAM, 2002).

Zusammen mit Astrozyten sind Mikrogliazellen befähigt, trophische Faktoren, wie den basalen Fibroblasten Wachstumsfaktor (bFGF), den Nerven Wachstumsfaktor (NGF) und Neurotrophin 3 freizusetzen, die alle auf die Neuroplastizität einwirken können (BANATI, 2002; HANSSON & RÖNNBÄCK, 2003). Über die Ausschüttung der exzitotoxischen Aminosäure Glutamat können die

Zellen weiterhin die synaptische Aktivität modulieren (HANSSON & RÖNNBÄCK, 2003). Durch ihre Fähigkeit, selektiv auf Moleküle, die in die neuronale Transmission involviert sind, zu reagieren, wird es Mikrogliazellen ermöglicht, kontinuierlich die physiologische Integrität ihrer Mikroumgebung zu überwachen, um dann, im Falle einer pathologischen Störung, sehr schnell zu reagieren (KREUZBERG, 1996).

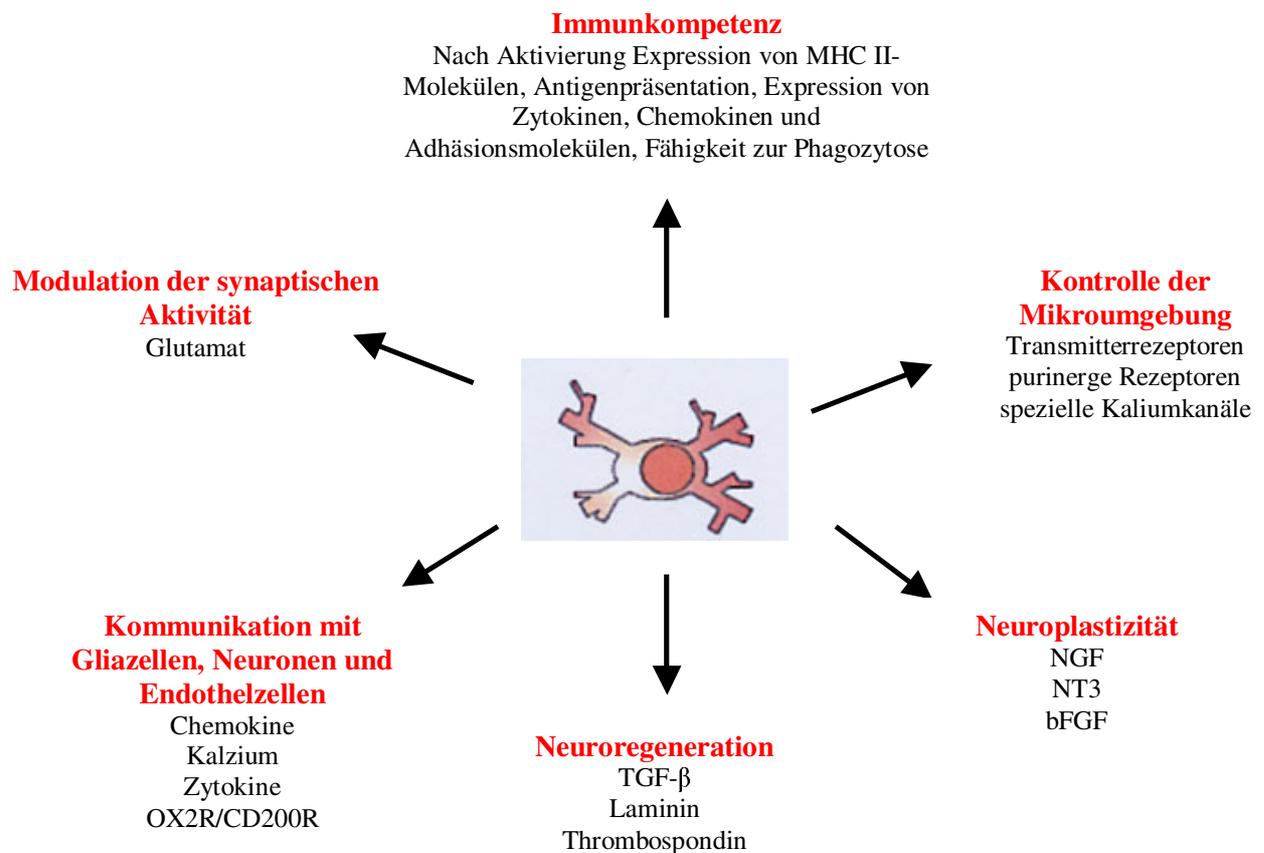
Neurone kommunizieren nicht nur untereinander, sondern auch mit Gliazellen, um diese über ihren Aktivitätszustand zu informieren und um es Gliazellen zu ermöglichen, sie metabolisch und trophisch, je nach ihren spezifischen Bedürfnissen, zu unterstützen. Ein wichtiges Signalmolekül beim neuronal-mikroglialen Zelldialog ist das Chemokin SDF-1, welches von Neuronen und Mikrogliazellen gebildet werden und die neuronale Funktion in Bezug auf Wachstum und Überleben modulieren kann (ASENSIO & CAMPBELL, 1999). Weiterhin wird auf neuronalen Zellen OX2 (CD200), ein membrangebundenes Glykoprotein, exprimiert, welches den auf Mikrogliazellen gebildeten OX2 Rezeptor (CD200R) erkennen und daran binden kann (WRIGHT et al., 2000; HOEK et al., 2000). Die Bindung stellt ein inhibierendes Signal für Mikrogliazellen dar, daß über einen direkten Zellkontakt ausgelöst wird und einen neuronalen Kontrollmechanismus darstellt (ALOISI, 2001, BANATI 2002). Zu den Faktoren, mit denen Neurone den Zustand der Mikroglia beeinflussen, gehören weiterhin Neurotrophine (NGF, BDNF, NT3), für die gezeigt werden konnte, daß diese die mikrogliale Expression von MHC-II-Molekülen und von den kostimulierenden Moleküle B7-2 und CD40, die in die Antigenpräsentation involviert sind, inhibieren (NEUMANN et al., 1998; WEI & JONAKAIT, 1999).

Im gesunden Gehirn spielt neben dem mikroglial-neuronalen Dialog ebenso die mikroglial-astrozytäre Kommunikation eine wichtige Rolle. Astrozyten scheinen dabei vor allem regulierend in den Prozess der Mikroglia differenzierung und -deaktivierung einzugreifen. Astrozytär freigesetzte Faktoren, wie der transformierende Wachstumsfaktor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), der Makrophagen-Koloniestimulierende-Faktor (M-CSF) und der Granulozyten/Makrophagen-Koloniestimulierende-Faktor (GM-CSF) können beispielsweise eine Ramifizierung und damit eine Deaktivierung von Mikrogliazellen induzieren. Astrozyten sind weiterhin in der Lage, die mikrogliale Phagozytose (DEWITT et al., 1998) und die Produktion des proinflammatorischen Zytokins IL-12 zu unterdrücken (ALOISI et al., 1997).

Viele Forschungsarbeiten, die sich *in vivo* auf die Rolle aktivierter Mikroglia bei der Neuroregeneration beziehen, beruhen auf Untersuchungen nach Axotomie des N. facialis (RAIVICH, 2002). In diesem Modellsystem werden die Neurone dieses Nervs außerhalb des Gehirns sublethal geschädigt und anschließend die Reaktionen der Motoneurone des N. facialis und ihrer glialen Umgebung im Hirnstamm beobachtet (KREUZBERG, 1996). Die Tatsache, daß eine periphere Axotomie die Mikrogliaaktivierung im ZNS beeinflusst, beweist, daß ein effektiver Signalweg zwischen Neuronen und Mikrogliazellen existieren muß (STREIT, 2002). Wenige Tage nach der Durchtrennung des Nervs wird ein Regenerationsprogramm innerhalb der motorischen Kerngebiete des N. facialis aktiviert, was letztendlich zu einer Reinnervation des Zielmuskels führt. Die Aktivierung von Mikrogliazellen durch geschädigte Neurone stellt dabei eine zentrale Komponente

dar (STREIT, 2002; SCHWARTZ et al., 1999), wobei die mikrogliale Produktion trophischer Faktoren und extrazellulärer Matrixmoleküle, wie Laminin und Thrombospondin, vermutlich eine entscheidende Rolle bei der neuronalen Regeneration spielen (CHAMAK et al., 1994; RABCHEVSKY & STREIT, 1997; NAKAJIMA & KOSAKA, 2002). In weiteren Modellsystemen zur neuronalen Regeneration konnte gezeigt werden, daß Mikrogliazellen in der Lage sind, Wachstumsfaktoren, einige Prostaglandine und antiinflammatorische Zytokine freizusetzen, die zur Neuroregeneration durch Remyelinisierung von Oligodendrozyten beitragen können (DIEMEL et al. 1998, MINGHETTI & LEVI, 1998). Phagozytotisch aktive Mikrogliazellen sind dazu befähigt, geschädigte Neurone und Myelinresten zu entfernen, um für intakte, gesunde Neurone Platz zu schaffen. Dieser Prozeß trägt ebenfalls zur Neuroregeneration bei (INOUE, 2002).

Zusammenfassend besitzen Mikrogliazellen eine duale Funktion im Gehirn: Einerseits können sie die Eigenschaften immunkompetenter Makrophagen annehmen und an inflammatorischen Prozessen partizipieren, andererseits sind sie in der deaktivierten Form als „normale“ Gliazellen in der Lage, Neurone zu schützen und zu unterstützen (STREIT, 2002; BRUCE-KELLER, 1999; ALDSKOGIUS, 2001).



**Abb.1.1:** Physiologische Funktionen der Mikroglia.

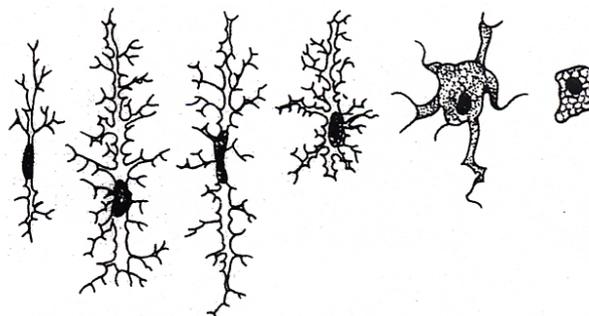
Insgesamt sind die Fähigkeiten von Mikrogliazellen, zur Neuroregeneration beizutragen, bisher wenig erforscht. Die meisten Erkenntnisse beziehen sich auf die aktivierte Mikrogliazelle im Zusammenhang mit neurodegenerativen Prozessen. Auf die Rolle der Mikrogliazelle bei chronisch neurodegenerativen und akuten Schädigungen wird in den Kapiteln 1.2.6.1 und 1.2.6.2 näher eingegangen. Ein wichtiger Vorgang, der jedoch zunächst näher erläutert werden soll, ist der Prozeß der Mikrogliaaktivierung, der in einem scheinbar stereotypen Muster abläuft.

#### 1.2.4 Prozeß der Mikrogliaaktivierung

Die Aktivierung der Mikroglia beinhaltet ein typisches Muster, bestehend aus: morphologischen Veränderungen, Proliferation, Freisetzung verschiedenster Mediatoren, Migration zu den Orten neuronaler Aktivität, Expression immunologisch relevanter Oberflächenproteine und Phagozytose geschädigter Neurone. Zusätzlich setzen Mikrogliazellen nach der Aktivierung verschiedene neuroprotektive und zytotoxische Substanzen frei (BANATI et al. 1993a; KREUZBERG, 1996; BENVENISTE, 1997; ALOISI, 2001). In **Tabelle 1.1** sind die mikroglialen Rezeptoren und in **Tabelle 1.2** sind die Faktoren, die von Mikrogliazellen nach Aktivierung freigesetzt werden können, zusammenfassend dargestellt.

Es existieren drei klar identifizierbare Zustandsformen der Mikroglia, die auf entwicklungs- und pathophysiologischen Untersuchungen basieren: 1) Ramifizierte, ruhende Mikroglia, die im normalen, gesunden und adulten Gehirn vorliegt. 2) Nach Aktivierung können Mikrogliazellen als nicht phagozytotisch aktive Mikroglia auftreten. Diese Zustandsform ist in neuronalen Gebieten nach Nervtransektion und ZNS-Infektion zu finden. 3) Reaktive, phagozytierende Mikrogliazellen, die in neuronalen Gebieten nach Trauma, Infektion und neuronaler Degeneration auftreten und dann als Gehirnmakrophagen bezeichnet werden (BEVENISTE, 1997).

Die **Abbildung 1.2** zeigt, daß ruhende Mikrogliazellen eine ramifizierte Morphologie aufweisen, die durch eine starke Verzweigung der Zellausläufer und geringem perinukleären Zytoplasma gekennzeichnet ist, während die Zellen nach Aktivierung eine hypertrophe Morphologie, kurze Zellausläufer und ein vergrößertes perinukleäres Zytoplasma besitzen (KREUZBERG, 1996; BENVENISTE, 1997).



**Abb. 1.2:** Morphologische Transformationen der Mikrogliazelle vom deaktivierten, ramifizierten Zelltyp zum amöboiden Makrophagen (KREUZBERG, 1996).

#### 1.2.4.1 Aktivierende Faktoren aus der Mikroumgebung

Mikrogliazellen werden durch Veränderungen in ihrer Mikroumgebung oder durch eine neuronale Schädigung aktiviert. Die Transformation von Mikroglia in intrinsische Makrophagen scheint dabei unter einer strikten Kontrolle zu verlaufen, und vieles deutet daraufhin, daß sie zu den ersten Zellen zählen, die eine Veränderung, wie beispielsweise Infektionen, Traumata und physiologische Veränderungen im Gehirn registrieren und dann spezifisch reagieren (GEBICKE-HAERTER et al. 1996; KATO & WALZ, 2000). Spezielle Rezeptoren auf der Mikrogliazelle sind dabei für die Signalaufnahme und -verarbeitung verantwortlich. Spezifische Signale, wie Schwankungen der extrazellulären Kaliumkonzentration, ausgelöst durch den Zelltod von Nervenzellen (KETTENMANN et al., 1990) oder freigesetztes ATP oder Adenosin überaktivierter Neurone können Mikrogliazellen erreichen und diese aktivieren (NÖRENBERG et al., 1994; KATO & WALZ, 2000). Bedeutsam für den Beginn proliferativer Vorgänge ist die Erhöhung von freien intrazellulären Kalziumkonzentrationen durch Einstrom von extrazellulärem Kalzium oder durch Freisetzung von Kalzium aus intrazellulären Speichern (ILLES et al., 1996; GEBICKE-HAERTER et al.; 1998; MÖLLER, 2002). Zytokine wie TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  (HUNOT & HIRSCH, 2003), Lipopolysaccharide (LPS) sowie die Neurotransmitter Glutamat, Acetylcholin und Noradrenalin (KREUZBERG, 1996) gelten ebenfalls als Aktivatoren.

**Abbildung 1.3** zeigt zusammenfassend die Faktoren, die bei der Mikrogliaaktivierung eine entscheidende Rolle spielen.

#### 1.2.4.2 Rolle der Kolonie-Stimulierenden Faktoren (CSFs) bei der Proliferation

Eine bedeutende Rolle bei der Proliferation der Mikroglia spielen die Koloniestimulierenden Faktoren (CSFs). CSFs sind starke Mitogene, die auf die morphologische und funktionelle Differenzierung einwirken (GIULIAN & INGEMAN, 1988). Ihre Wirkung entfalten sie über die Bindung an spezifische Rezeptoren (RAIVICH & KREUZBERG, 1994). CSFs bestehen aus drei Mitgliedern, dem multi-CSF (IL3), dem Granulozyten/Makrophagen-Koloniestimulierenden-Faktor (GM-CSF) und dem Makrophagen-Koloniestimulierenden-Faktor (M-CSF). Sowohl Astrozyten als auch Mikrogliazellen selbst können CSF's produzieren (KREUZBERG, 1996). GM-CSF und M-CSF beschleunigen die mikrogliale Proliferation *in vitro* (GIULIAN & INGEMAN, 1988). Die Infusion von GM-CSF führt *in vivo* zu einer Rekrutierung von Makrophagen in den Infusionsbereich (GIULIAN & INGEMAN, 1988), und bei einem Schaden im ZNS zeigen aktivierte, prämitotische Mikrogliazellen einen Anstieg in der Expression der CSF-Rezeptormoleküle (RAIVICH et al., 1991). M-CSF ist an der Reorganisation des Aktin Zytoskeletts beteiligt und wird über einen Rho/GTPasen-abhängigen Signalweg reguliert (IMAI & KOHSAKA, 2002). Zusammenfassend sind CSF's wichtig für die Induktion der Proliferation und entscheiden darüber, ob die Mikrogliazelle in eine Ruhephase bzw. Regeneration zurückkehrt, oder ob es zur Differenzierung mit der Ausbildung entzündungsspezifischer Marker kommt (TAKEUCHI et al., 2001).

**Tab. 1.1:** Übersicht über die Rezeptorarten auf Mikrogliazellen

Allgemeine Bezeichnung	Funktion	Spezielle Rezeptoren	Zellbiologische Bedeutung
<b>Erkennungsrezeptoren für Pathogene</b>	Direkte Interaktion mit mikrobiellen Strukturen	<b>CR3</b> (CD11b/CD18= Mac-1), <b>Mannose R</b> (Bindung von Glykoproteinen), <b>CD14/TLR4</b> (LPS-Rezeptor)	Migration, Phagozytose, Zytotoxizität, Aktivierung immunologisch relevanter Gene
<b>Komplement-Rezeptoren Fc-Rezeptoren</b> = Opsoninrezeptoren	Erkennung mikrobieller Strukturen und veränderter zelleigener Strukturen im Serum	<b>CR1, CR3, CR4, C1qR<sub>p</sub>, FcγRI, RII, RIII</b>	Phagozytose opsonierter Zielzellen, Zytokinproduktion, Radikalproduktion
<b>Zytokin-Rezeptoren</b>	Erkennung pro- und antiinflammatorischer Zytokine innerhalb des ZNS	<b>IFN-γR, TNF-αR (TNFRI, TNFRII), IL-1RI(?), IL-12R, IL-15R, IL-18R; IL-4R, IL-10R, IL-13R, TGF-βRI, TGF-βRII</b>	Induktion bzw. Verstärkung der mikroglialen Immunfunktionen z.B. Antigenpräsentation
<b>Chemokin-Rezeptoren</b>	Erkennung chemotaktischer Zytokin-Mediatoren	<b>CCR2</b> (Rezeptor für MCP-1, MCP-3, MCP-4) <b>CCR3</b> (Rezeptor für MCP-3, MCP-4, RANTES) <b>CCR5</b> (Rezeptor für MIP-1α, MIP-1β, RANTES) <b>CXCR4</b> (Rezeptor für SDF-1) <b>CX3CR1</b> (Rezeptor für Fraktalkin/Neurotactin)	Stimulation zur Migration zum Ort des inflammatorischen Geschehens, Aktivierung und Differenzierung
<b>Zelltod-Rezeptoren/ Liganden</b>	Erkennung von Immunzellen	<b>Fas (CD95)/FasL (CD95L)</b>	Verantwortlichkeit für den Fas-vermittelten Zelltod von ZNS infiltrierenden Immunzellen
<b>Prostaglandin-Rezeptoren</b>	Erkennung von Prostanoiden	<b>EP2</b> (Rezeptor für PGE <sub>2</sub> ) <b>PPAR-γ</b> (Rezeptor für PGJ <sub>2</sub> )	Lokale Regulation der Entzündungsreaktion und der Immunantwort, antiinflammatorisch
<b>Andere Rezeptoren</b>		<b>CD40</b> (auf der Oberfläche von APC, Mitglied der TNF-R Superfamilie) <b>D200R</b> (Rezeptor für OX2)	Entwicklung der Immunantwort: CD40: Differenzierung aktivierter B-Zellen, Interaktion zwischen APC und T-Zelle, Bindung führt zur Expression kostimulierender Moleküle D200R: Inhibition von Mikrogliazellen

**Tab. 1.2:** Mediatoren und Oberflächenproteine, die von aktivierten Mikrogliazellen produziert bzw. freigesetzt werden

Allgemeine Bezeichnung	Spezielle Mediatoren	Zellbiologische Bedeutung
Proinflammatorische Zytokine	<b>IL-1, TNF-<math>\alpha</math>, IL-6, IL-12, IL-15, IL-18</b>	Aktivierung, Differenzierung; Induktion bzw. Verstärkung der mikroglialen Immunfunktionen z.B. Antigenpräsentation
Antiinflammatorische Zytokine	<b>IL-10, TGF-<math>\beta</math>, IL-1ra</b>	Neuroprotektiv, entzündungshemmend
Cytotoxische Moleküle	<b>iNOS, Sauerstoff- und Stickstoffradikale</b>	Zytotoxisch, proinflammatorisch, Bekämpfung und Auflösung von Infektionsherden
Prostanoide	<b>PGD<sub>2</sub> PGE<sub>2</sub> Thromboxan B<sub>2</sub></b>	Regulatoren bei Entzündungen und bei der Immunantwort, synthetisiert über den Cyclooxygenase (COX) Syntheseweg
Chemokine	<b>IL-8, IP-10, MIP-1<math>\alpha</math>, MIP-1<math>\beta</math>, MCP-1, RANTES, MIP-3<math>\beta</math></b>	Stimulation zur Migration zum Ort des inflammatorischen Geschehens, Aktivierung und Differenzierung
Wachstumsfaktoren	<b>GM-CSF M-CSF</b>	Proliferation Differenzierung
Neurotrophine	<b>NGF BDNF NT3</b>	Neuronale Regeneration
MHC-Moleküle	<b>MHC-I MHC-II</b>	Antigenpräsentation Mikroglia-T-Zell-Dialog
Adhäsionsmoleküle	<b>LFA-1 ICAM-1</b>	Zell-Zell-Kommunikation Zell-Matrix-Interaktion Migration

### 1.2.4.3 Zytokine und Zytokinrezeptoren

Zytokine sind Schlüsselregulatoren der angeborenen und erworbenen Immunantwort. Bei inflammatorischen Vorgängen im ZNS werden verschiedene Zytokine vor allem von Mikrogliazellen, aber auch von Astrozyten und invadierten Immunzellen gebildet. Die mikrogliale Aktivierung bewirkt eine Produktion der proinflammatorischen Zytokine Tumor Nekrose Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) und Interleukin-1 (IL-1) sowie der immunregulatorischen Zytokine IL-6, (IL-12) und IL-18 (GREGERSEN et al., 2000; HANISCH, 2002). IL-1 und TNF- $\alpha$  sind bei der Entwicklung der Inflammation im Gehirn von Bedeutung. Dieses geschieht im wesentlichen durch die Induktion von Adhäsionsmolekülen und Chemokinen in zerebrovaskulären Endothelzellen und Astrozyten. Als Folge kommt es zur Leukozytenextravasation und –rekrutierung in das ZNS (LEE & BENVENISTE, 1999; SEDGWICK et al., 2000). TNF- $\alpha$ , intrazerebral produziert, ist vermutlich ein Initiator der Inflammation und Gewebszerstörung (AKASSOGLU et al., 1998) sowie an der autoimmunen Inflammation beteiligt (TAUPIN et al., 1997). Vorwiegend auf *in vitro* Untersuchungen beruhen die Erkenntnisse, daß Mikrogliazellen Zytokine mit pleiotrophen Charakter, wie beispielsweise IL-6, IL-18 und IL-12, produzieren, die eine Rolle bei der humoralen und zellvermittelten Immunantwort spielen (FREI et al., 1989; BECHER et al., 1996; PRINZ & HANISCH, 1999). Mikrogliazellen stellen ebenso eine Quelle für die Produktion antiinflammatorischer Zytokine dar. Hierzu gehören TGF- $\beta$ , IL-10 und der IL-1 Rezeptor Antagonist IL-1ra. TGF- $\beta$  und IL-10 inhibieren die Mikroglia/Makrophagen-Aktivierung über die Herunterregulierung der Moleküle, die in die Antigenpräsentation und Produktion proinflammatorischer Zytokine, Chemokine sowie Stickstoff- und Sauerstoffradikal Produktion involviert sind (FREI et al., 1994; O'KEEFE et al., 1999). IL-1ra wirkt den biologischen Effekten von IL-1 entgegen, indem es an den IL-1 Rezeptor bindet, ohne jedoch eine Signaltransduktion zu initiieren (LIU et al., 1998). Zusammenfassend entscheidet das Zusammenspiel der pro- und antiinflammatorischen Zytokine über den Verlauf und die Beendigung der inflammatorischen Kaskade.

Neben der Fähigkeit, selbständig Zytokine zu produzieren, besitzen Mikrogliazellen eine Vielzahl von Rezeptoren für pro- und antiinflammatorische Zytokine auf ihrer Zelloberfläche, die für die Signalaufnahme bei einer Inflammation von Bedeutung sind. IFN- $\gamma$ , das hauptsächlich von natürlichen Killerzellen produziert wird, induziert und verstärkt die mikroglialen, proinflammatorischen und antigenpräsentierenden Eigenschaften (COLTON et al., 1994; BENVENISTE, 1998). TNF- $\alpha$ , freigesetzt von TH1-Zellen, Makrophagen und Mikrogliazellen selbst, aktiviert Mikrogliazellen, bewirkt die Phagozytose und die Produktion weiterer pro- und antiinflammatorischer Zytokine (SMITH et al., 1998a). TNF- $\alpha$  ist einer der stärksten autokrinen Aktivatoren (BECHER et al., 2000) und bindet an zwei strukturell ähnliche Rezeptoren: TNFR1 und TNFR2 (DOPP et al., 1997), und TNF- $\alpha$  induziert die Transkription vieler immunologisch wichtiger Gene über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B (CAO et al., 1999).

#### 1.2.4.4 Chemokine und Chemokinrezeptoren

Die Rekrutierung von Leukozyten aus der Körperperipherie in das ZNS ist ein entscheidender Schritt bei neuroinflammatorischen Vorgängen und bei der Induktion der ZNS-Autoimmunität. Bei diesem Prozeß spielen Chemokine, die im Hirngewebe von Astrozyten, Mikrogliazellen und Endothelzellen produziert werden können, eine wichtige Rolle (GLABINSKI & RANSOHOFF, 1999; HESSELGESSER & HORUK, 1999; RANSOHOFF, 2002). Chemokine sind chemotaktische Zytokine, die einer Superfamilie kleiner Peptide angehören. Basierend auf ihrem Cystein Motiv können sie in vier Gruppen eingeteilt werden: CXC-, CC-, C-, CX3C-Chemokine. Chemokine reagieren mit einem G-Protein gekoppelten Rezeptor, bestehend aus sieben transmembranen Domänen. Mikrogliazellen besitzen Chemokinrezeptoren für für MCP-1, MCP-3, MCP-4, RANTES, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  und Fraktalkin/Neurotaktin. (HARRISON et al., 1998; MCMANUS et al., 2000; SIMPSON et al., 2000). Die Anzahl der exprimierten Chemokinrezeptoren ist dabei abhängig vom Aktivierungsgrad der Zellen. Vieles deutet darauf hin, daß Chemokine die Migration von Mikrogliazellen zu den Orten neuronaler Schädigung beeinflussen können (PETERSON et al., 1997; MACIEJEWSKI-LENOIR et al., 1999; SORIANO et al., 2002).

Mikrogliazellen produzieren nach ihrer Aktivierung Chemokine der CXC/ $\alpha$ -Familie (IL-8, IP-10) und der CC/ $\beta$ -Familie (MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , MCP-1, RANTES). Die genannten Chemokine sind vermutlich an der intrazerebralen Rekrutierung von T-Zellen, Makrophagen und dendritischen Zellen beteiligt (ALOISI, 2001). Weiterhin können Mikrogliazellen mit Endothelzellen über Chemokine kommunizieren, wodurch sie an der gesteigerten Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke beteiligt sind (PRAT et al., 2001).

#### 1.2.4.5 Mikrogliale Expression von Adhäsionsmolekülen

Aktivierte Mikrogliazellen sind durch die Expression von Adhäsionsmolekülen gekennzeichnet (HAILER et al. 1996). Adhäsionsmoleküle sind an der Zellerkennung und Kommunikation zwischen Zellen des Immunsystems beteiligt und gewährleisten eine effiziente Immunantwort bei einem Entzündungsprozeß (SPRINGER, 1990). Sie können als Rezeptor und Ligand wirken und ermöglichen Zellen über diesen Kontakt eine Kommunikation. Der durch Adhäsionsmoleküle bewirkte Zell-Zell-Kontakt setzt eine Vielzahl von Reaktionen in Gang: So werden intrazellulär Botenstoffe aktiviert, welche die Genexpression für bestimmte Moleküle induzieren und häufig eine Umgestaltung des Zytoskeletts bewirken. Betroffen davon sind die Exozytose, die Clusterbildung von Oberflächenproteinen im Kontaktbereich und die Zellmigration, die auf einem koordinierten Zusammenspiel einzelner Zytoskelettkomponenten beruht (GUMBINER, 1996). Eine wichtige Eigenschaft vieler Adhäsionsmoleküle ist ihr zeitlich begrenztes Vorkommen auf der Zelloberfläche, sowie ihre Expression durch ein externes Signal.

Verschiedene Strukturfamilien spielen bei der Leukozytenwanderung in entzündliche Gewebsareale (Extravasation), bei ihrer Zielortbestimmung (Homing) und bei der Zell-Zell-Interaktion, wie

beispielsweise der Antigenpräsentation, eine Rolle (SHIMIZU et al., 1992; GAHMBERG et al., 1998). Aufgrund von partiellen Übereinstimmungen in ihrer Aminosäuresequenz lassen sie sich zu einzelnen Familien zusammenfassen: die Selectine, mucinähnliche Moleküle, die Intergrine und Proteine der Immunglobulinsuperfamilie.

In dieser Arbeit sollen die Intergrine als eine wichtige Molekülgruppe unter den Adhäsionsmolekülen herausgestellt werden. Intergrine sind Rezeptoren, die eine heterodimere Struktur besitzen und aus zwei Untereinheiten bestehen: einer alpha- und einer beta-Kette, die nichtkovalent miteinander verbunden sind. Beide Untereinheiten besitzen eine Transmembranregion und ragen mit einem kurzen C-terminalen Ende in das Zytoplasma. Jede Polypeptidkette ist durch Disulfidbrücken stabilisiert (JANEWAY & TRAVERS, 1997). Integrine binden häufig Liganden mit der Aminosäuresequenz Arginin-Glycin-Aspartat. Im aktiven Zustand sind sie phosphoryliert. Die Phosphorylierung wird durch das Enzym Proteinkinase C ausgeführt, welches erst nach Bindung der Integrine an einen Liganden intrazellulär aktiviert wird und eine festere Bindung des Liganden zur Folge hat (BUYON et al., 1990; VALMU et al., 1991). Die Integrine als Molekülfamilie werden nochmals unterteilt, wobei die Einteilung auf der Struktur der beta-Kette, die jeweils eine andere Aminosäuresequenz aufweist, beruht. Dabei dienen besonders die Leukozyten-Integrine der Kommunikation von Immunzellen.

Bislang sind vier Leukozyten-Integrine beschrieben worden: LFA-1 = CD11a/CD18 (leukocyte function associated antigen), Mac-1 = CD11b/CD18 = CR3, gp150,95 = CD11c/Cd18 (Glykoprotein 150,95) und CD11d/CD18 (GAHMBERG et al., 1998). LFA-1 kommt auf allen Immunzellen vor. Der Bindungspartner von LFA-1 ist das Zelloberflächenprotein ICAM = CD54 (intercellular adhesion molecule), das zur Immunglobulinsuperfamilie gehört (HIBBS et al., 1991). Durch diese Bindung wird u.a. die Interaktion zwischen T-Zelle und antigenpräsentierender Zelle ermöglicht. Die ICAM-1-LFA-1-Bindung ist besonders dadurch gekennzeichnet, daß das Zytoskelett durch diese Bindung eine Umstrukturierung erfährt.

Im Gehirn ist die Rolle der Adhäsionsmoleküle noch nicht ausreichend charakterisiert. Basierend auf der generellen Funktion von Adhäsionsmolekülen können jedoch bestimmte Aufgaben, wie die Leukozyten Extravasation durch die Blut-Hirn-Schranke und deren Migration, sowie die Antigenpräsentation auf das ZNS übertragen werden (LEE & BENVENISTE, 1999). Daß verschiedene Adäsionsmoleküle von Gliazellen nach deren Aktivierung exprimiert werden können und diese somit einen entscheidenden Einfluß auf die Inflammation ausüben, konnte mehrfach gezeigt werden: Mikrogliazellen exprimieren beispielsweise ICAM-1 nach Zugabe von proinflammatorischen Zytokinen, die bei der Pathogenese der Multiplen Sklerose (MS) oder bei der EAE (experimental autoimmune encephalomyelitis) eine Rolle spielen (LEE & BENVENISTE, 1999). Ebenso wurden LFA-1 positive Mikrogliazellen in chronisch aktiven MS-Läsionen lokalisiert (BROSNAN et al., 1995) und LFA-1 als Regulator bei der Mikrogliaaktivierung beschrieben (VAN SEVENTER et al., 1990). Weiterhin konnte in immunzytochemischen Studien an humanem post-mortem Gewebe gezeigt werden, daß es bei Hirntumoren, inflammatorischen Prozessen des ZNS (ROSSLER et al., 1992), sowie

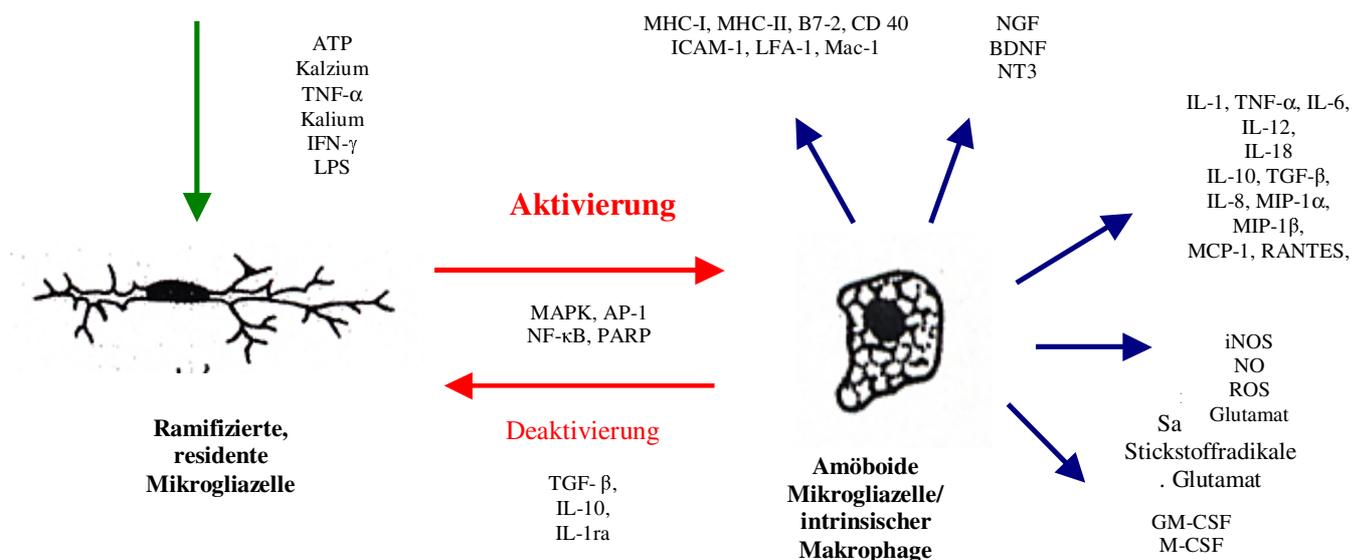
beim Morbus Alzheimer (AKIYAMA et al., 1993) zur erhöhten mikroglialen Expression von LFA-1 kommt. In tierexperimentellen Untersuchungen wurde nach Induktion einer akuten Inflammation eine ICAM-1-Expression (BELL & PERRY, 1995) und im entorhinalen Kortex-Läsions-Modell konnte eine Expression von LFA-1, ICAM-1 und VLA-4 auf Mikrogliazellen nachgewiesen werden (HAILER et al., 1997).

#### **1.2.4.6 Mikrogliale Beteiligung an der Zytotoxizität**

In Analogie zu Blutmakrophagen können Mikrogliazellen zellzerstörerische Aktivitäten entwickeln. Diese können als normale Abwehrmechanismen aufgefasst werden, um geschädigte oder entartete Zellen zu eliminieren. Mindestens zwei Mechanismen der Zytotoxizität stehen den Zellen zur Verfügung: Der direkte Weg, über die Freisetzung zytotoxischer Agenzien oder der indirekte Weg über die Präsentation von Antigenen im Kontext mit MHC-Molekülen, was zur Bildung antigenspezifischer T-Zellklone führt (siehe Kapitel 1.2.4.7). Direkt können Mikrogliazellen nach ihrer Aktivierung zytotoxische Faktoren produzieren und freisetzen. Zu diesen zytotoxischen Substanzen gehören reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und Stickstoffradikale, Stickstoffmonoxid sowie proinflammatorische Zytokine (siehe Kapitel 1.2.4.3) und Glutamat (BANATI et al., 1993a). Bei neuroinflammatorischen Vorgängen im Gehirn steigt die Oxidantienproduktion durch aktivierte Mikrogliazellen drastisch an (KOUTSILIERI et al., 2002). Dieser als „oxidative burst“ bezeichnete Vorgang soll in erster Linie Infektionsherde bekämpfen und auflösen. Bedingt durch eine verminderte Aktivität und Kapazität antioxidativer Schutzsysteme, wie beispielsweise Vitamin E und Superoxiddismutase, ist das Gehirn sehr empfindlich gegenüber oxidativem Streß (HALLIWELL, 1989). Hinzu kommt, daß Neurone sich quantitativ gesehen kaum regenerieren. So können Zellschäden durch die Reaktion freier Sauerstoffradikale mit zellulären Makromolekülen wie Lipiden, Proteinen und Nukleinsäuren zu pathologischen Veränderungen führen (KOUTSILIERI et al., 2002). Mechanismen, die zu einem neuronalen Zelltod durch oxidativen Streß führen, bestehen immer aus einer mitochondrialen Dysfunktion, Glutamatexzitotoxizität sowie erhöhten intrazellulären Kalziumkonzentrationen (ZAMZAMI et al., 1997, CALNE et al., 1992; COHEN & KESLER, 1999). Superoxidradikale werden von Mikrogliazellen auch bei der Synthese von Prostanoiden während der Zyklisierung von Arachidonsäure durch das Enzym Zyklooxygenase gebildet. Während die konstitutive Form (COX-1) vorwiegend in Nervenzellen vorkommt, findet man die induzierbare (COX-2) insbesondere in Mikrogliazellen (MINGHETTI & LEVI, 1995).

Neben den reaktiven Sauerstoffspezies zählt auch Stickstoffmonoxid (NO) zu den Faktoren, die bei neurodegenerativen und entzündlichen Erkrankungen des Gehirns von Bedeutung sind. NO wird enzymatisch über Stickstoffmonoxid-Synthetasen (NO-Synthetasen) im Gehirn gebildet (CALABRESE et al., 2000). In Makrophagen und Mikroglia ist die induzierbare NO-Synthetase (iNOS) lokalisiert, die durch LPS und andere inflammatorische Mediatoren während der Zellaktivierung induziert wird (DAWSON & DAWSON, 1995; LIU et al. 2002). NO kann mit bestimmten biologischen

Makromolekülen reagieren und durch Bindung an Häm- oder Thiolgruppen spezifische Modifikationen auslösen (DAVEY et al., 1998). Besonders wichtig ist die schnelle Reaktion von NO mit dem Superoxidanion-Radikal. Dabei entsteht Peroxynitrit ( $\text{ONOO}^-$ ), ein sehr potentes Oxidans, das Proteine zu Nitrotyrosin oxidieren kann. Diese oxidierten Proteine können kumulieren, Entzündungen hervorrufen und schließlich zum neuronalen Zelltod und zu Funktionsverlusten führen (CALABRESE et al., 2000). Weitere zytotoxische Faktoren sind die lysosomalen Cystein Proteinasen Cathepsin B/L, die an dem Gewebeumbau nach einem neuronalen Schaden beteiligt sind (BANATI et al., 1993b). Die proinflammatorischen Zytokine IL-1 und TNF- $\alpha$  können toxische Effekte auf die Proliferation und Differenzierung von Oligodendrozyten ausüben, was zu Demyelinisierungen von Neuronen führen kann (MERRILL, 1992, KREUZBERG, 1996). Weiterhin sind Mikrogliazellen in der Lage, Glutamat und Aspartat zu synthetisieren, wobei die Freisetzung dieser Aminosäuren zum Zelltod über eine neuronale NMDA-Rezeptor vermittelte Exzitotoxizität führen kann (PIANI et al., 1991).



**Abb. 1.3:** Übersichtsschema zur Mikrogliaaktivierung. Ein externes Signal im Rahmen eines neuropathologischen Prozesses initiiert den Aktivierungsprozeß. Mikrogliazellen konvertieren daraufhin durch Aktivierung intrazellulärer Signalwege von der ramifizierten in die amöboide Form. Als Folge der Aktivierung kommt es zur Proliferation und Migration der Zellen. Weiterhin werden wichtige Mediatoren, wie Zytokine, Chemokine und zytotoxische Moleküle freigesetzt, und auf der Oberfläche der Zellen lassen sich immunologisch relevante Oberflächenproteine, wie MHC-Moleküle und Adhäsionsmoleküle, nachweisen. Aktivierte Mikrogliazellen besitzen die Fähigkeit, geschädigte Neurone zu phagozytieren. Deaktivierende Faktoren führen zu einer Transformation der aktivierten Zellen zurück in residente Mikroglia.

#### 1.2.4.7 Rolle der Mikroglia bei der unspezifischen und spezifischen Immunität

Eine weitere Eigenschaft, die aktivierte Mikrogliazellen aufweisen, ist die Expression von Opsoninrezeptoren. Zu diesen Rezeptoren gehören Fc- $\gamma$ RI, -II und -III. Ihre Aufgabe besteht darin, die Phagozytose zu initiieren und zu beschleunigen, indem sie Bestandteile von Mikroorganismen aus dem Serum erkennen und binden (PERESS et al., 1993; ULVESTAD et al., 1994a). CR1, CR3 und CR4 binden die Komplementkomponente C3bi und sind ebenfalls an der Phagozytose beteiligt (BARNUM, 1999). Signaltransduktionen über den C3-Rezeptor und Fc-Rezeptoren führen zu einer Produktion reaktiver Sauerstoffspezies, biologisch hochaktiver Eicosanoide und proinflammatorischer Zytokine (COLTON et al., 1994; WILLIAMS et al., 1994; VAN DER LAAN et al., 1996). Lipopolysaccharid (LPS), der Hauptbestandteil der Membran gram-negativer Bakterien, bindet an den CD14/TLR-4-Rezeptor (KITCHENS, 2000). LPS gilt als starkes Stimulans für Mikrogliazellen, sowohl *in vitro* als auch *in vivo* (ALOISI, 2001). Die Bindung von LPS an den CD14/TLR-4-Rezeptor bewirkt in Mikrogliazellen die Bildung pro- und antiinflammatorischer Zytokine, Chemokine, Adhäsionsmoleküle und von Stickstoffoxid, über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B und von MAPKinasen (HANISCH, 2002). Neben der Phagozytose von Mikroorganismen sind Mikrogliazellen fähig, geschädigte Neurone und Myelinreste abzubauen (BECHMANN & NITSCH, 1997).

Neben der unspezifischen Immunantwort, bei der es zur Phagozytose und intrazellulären Abtötung von Bakterien kommt, übernehmen Mikrogliazellen eine zentrale Rolle bei der Induktion und Regulation der spezifischen Immunantwort. Als antigenpräsentierende Zellen sind sie dabei in der Lage, körperfremde Antigene mit MHC-I- oder MHC-II-Molekülen den T-Lymphozyten in geeigneter Form darzubieten, wodurch sie eine Voraussetzung für eine immunspezifische Antwort schaffen (LASSMANN et al., 1993; PERRY, 1998). Durch die Expression der Haupthistokompatibilitätsantigene und costimulierender Moleküle wie beispielsweise B7-2/CD86 und CD40, die bei der Antigenpräsentation eine wichtige Rolle spielen (NEUMANN et al. 1998; WEI & JONAKAIT, 1999; CARSON, 2002), wird es Mikrogliazellen ermöglicht, mit infiltrierenden T-Zellen zu kommunizieren. Dabei können sowohl T-Zellen von Mikrogliazellen als auch Mikrogliazellen von T-Zellen durch Zytokine oder Kostimulation aktiviert und in ihrer Funktion moduliert werden (NGUYEN & BENVENISTE, 2002).

#### 1.2.4.8 Protektive Faktoren

Grundsätzlich scheint die Aktivierung von Mikrogliazellen nicht darauf ausgerichtet zu sein, Zellen zu zerstören, sondern Zellen, die durch andere Einflüsse bereits geschädigt sind, zu entfernen und damit dem gesunden Gewebe regenerative Impulse zu geben (BANATI & GRAEBER, 1994). So sezernieren die intrinsischen Gehirnmakrophagen neben entzündungsfördernden Produkten auch entzündungshemmende Substanzen und Wachstumsfaktoren, die eine entscheidende Rolle bei der Suppression der Immunantwort und der Wundheilung spielen (STREIT, 2002). Hierzu gehören Neurotrophine (NGF, NT3) und antiinflammatorische Zytokine, wie beispielsweise TGF- $\beta$  und IL-10

(HANISCH, 2002). In dem Kapitel 1.2.3, das sich mit den physiologischen Eigenschaften der Mikroglia beschäftigt, wurden die neuroprotektiven Eigenschaften der Mikroglia im Zusammenhang mit neuroregenerativen Vorgängen bereits ausführlich dargestellt.

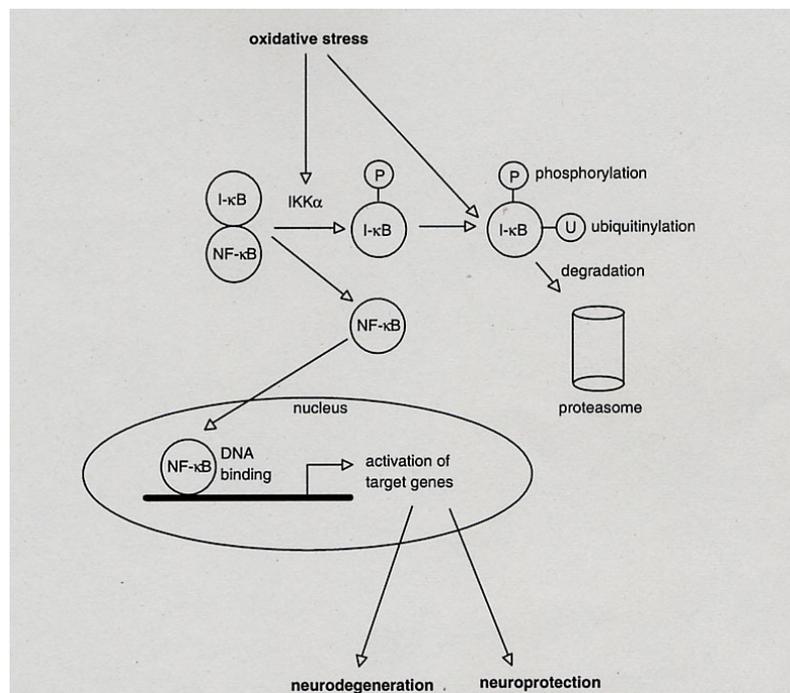
#### **1.2.4.9 Mikrogliale Signaltransduktion: Funktion des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B bei der Neuroinflammation**

NF- $\kappa$ B ist ein wichtiger Transkriptionsfaktor bei inflammatorischen und immunologischen Prozessen, sowie bei der Zellteilung und bei Apoptosevorgängen. (NOMOTO et al., 2001; MATTSON & CAMANDOLA, 2001). Funktionelle NF- $\kappa$ B-Komplexe sind in allen Zelltypen des Gehirns zu finden (O'NEILL & KALTSCHMIDT, 1997) und bestehen aus fünf Mitgliedern einer multigenen Familie: p50, p52, p65 (RelA), c-Rel und Rel-B. Allen gemeinsam ist eine 300 Aminosäuren umfassende Rel-homologe Region, die für die Proteindimerisierung, nukleäre Lokalisation und die DNA-Bindung an  $\kappa$ B-Elemente in der Enhancer Region von Zielgenen verantwortlich sind (HASSA & HOTTIGER, 1999). Ein Heterodimer, bestehend aus der Untereinheit p50, gebunden an die p65 (RelA) Untereinheit, kommt am häufigsten vor. Die p65 (RelA) Untereinheit besitzt zwei Transaktivierungsdomänen in der C-terminalen Region des Proteins (SCHMITZ et al., 1995).

Normalerweise liegt NF- $\kappa$ B als deaktivierte Form im Zytoplasma vor. NF- $\kappa$ B ist dabei an das Protein I $\kappa$ B gebunden, welches das Kernlokalisierungssignal inhibiert (siehe **Abbildung 1.4**). Nach Stimulation der Zelle durch verschiedene Signale, wie beispielsweise Viren, Bakterien, UV-Strahlung, Sauerstoffradikale und Zytokine, wird I $\kappa$ B durch die I $\kappa$ B Kinase (IKK) phosphoryliert, was zur Ubiquitinierung und proteosomalen Degradation von I $\kappa$ B und zu einer schnellen Translokation von NF- $\kappa$ B in den Nukleus führt (CHEN et al., 1995). Im Kern bindet das Heterodimer dann an seine spezifischen NF- $\kappa$ B-Elemente (BERG et al., 1993; HENKEL et al., 1993). Die funktionelle Wichtigkeit von NF- $\kappa$ B bei akuten inflammatorischen Prozessen liegt an der Fähigkeit, die Promotoren von verschiedenen Genen zu regulieren, die für die Expression von Zytokinen und Adhäsionsmolekülen codieren und kritisch für den Entzündungsvorgang sind (MATTSON & CAMANDOLA, 2001; COMBS et al., 2001). Generell scheint es so zu sein, daß eine Aktivierung von NF- $\kappa$ B in Neuronen dazu beiträgt, diese vor einer Degeneration zu schützen (YU et al., 1999), während eine Aktivierung von NF- $\kappa$ B in Mikroglia eher zur Bildung neurodegenerativer Faktoren führt (QUIN et al., 1998).

Mitogen aktivierte Protein Kinasen (MAPK) können ein wichtiger Vermittler bei der IKK Phosphorylierung in Verbindung mit der Aktivierung von Zelloberflächenrezeptoren sein. (MATTSON & CAMANDOLA, 2001). Ebenso gibt es Hinweise darauf, daß die Poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1), ein ubiquitäres 113 kDa großes nukleäres Enzym, das unter Abspaltung von Nikotinamid den Transfer von ADP-Ribose-Einheiten aus NAD<sup>+</sup> auf spezifische Akzeptorproteine katalysiert (ALTHAUS & RICHTER, 1987), eine wichtige Rolle bei der NF- $\kappa$ B-abhängigen Genaktivierung *in vivo* spielt (HASSA & HOTTIGER, 1999). Die PARP ist vorwiegend in DNA-Reparaturprozesse involviert, kann aber ebenfalls an der Regulation der Transkription teilnehmen (D'AMOURS et al., 1999; CHIARUGI, 2002). So ist auch der Transkriptionsfaktor p53 als Akzeptor für Poly(ADP-ribose)

Polymere beschrieben worden (WESIERKA-GADEK et al., 1996). Die PARP beschleunigt sowohl *in vitro* (MEISTERERNST et al., 1997) als auch *in vivo* die Aktivierung von NF- $\kappa$ B-abhängigen Genen (HASSA & HOTTIGER, 1999). Dabei wirkt die PARP vermutlich als Kofaktor, wobei es zu einer Protein-Protein-Interaktion zwischen der PARP und p65 im Nukleus und zu einer Modifizierung von NF- $\kappa$ B und anderer Proteine kommt (HASSA & HOTTIGER, 1999). PARP<sup>(-/-)</sup>-Mäuse zeigen dagegen eine stark verminderte NF- $\kappa$ B-Aktivität (OLIVER et al., 1999; HA et al., 2002). Da NF- $\kappa$ B eine wichtige Rolle bei der Produktion inflammatorischer Gene nach einer neuronalen Schädigung spielt und an der Gliazellaktivierung und der damit verbundenen Zytotoxizität erheblich beteiligt ist (COMBS et al., 2001; NGUYEN et al., 2002), könnte die Inhibition der PARP-1 ein potentielles Ziel darstellen, um die NF- $\kappa$ B-abhängigen proinflammatorischen Signalwege in Mikrogliazellen zu hemmen.



**Abb. 1.4:** Schematische Darstellung des NF- $\kappa$ B Signalweges (KOUTSILIERI et al., 2002). Oxidativer Stress aktiviert verschiedene Kinasen wie beispielsweise IKK $\alpha$ , die direkt in die NF- $\kappa$ B-Aktivierung involviert ist. In nicht aktivierten Zellen ist NF- $\kappa$ B im Zytoplasma lokalisiert und an I $\kappa$ B gebunden. Die Phosphorylierung von I $\kappa$ B durch IKK $\alpha$  führt dazu, daß NF- $\kappa$ B vom Proteinkomplex dissoziiert und in den Zellkern transloziert wird. Die phosphorylierte I $\kappa$ B wird ubiquitiniert und vom Proteasom degradiert. NF- $\kappa$ B bindet nach der Translokation in den Nukleus an die DNA und aktiviert dort seine Zielgene.

### 1.2.5 Analogie zu neutrophilen Granulozyten und peripheren Makrophagen

Im Gehirn sind die Mikrogliazellen die wichtigsten intrinsischen immunkompetenten Zellen, die für eine Entzündungsreaktion verantwortlich sind (KREUTZBERG, 1996; ALOISI, 2001). Sie werden deshalb auch als Makrophagen des ZNS bezeichnet, wobei betont werden muß, daß Mikroglia zwar das Potenzial besitzt, phagozytotisch aktiv zu werden, im gesunden Gehirn aber resident ist und deaktiviert vorliegt. Es gibt *in vivo* keine Beweise dafür, daß Mikrogliazellen gesunde Neurone schädigen oder zerstören (KREUZBERG, 1996).

Erst bei neuropathologischen Prozessen weisen Mikrogliazellen viele Gemeinsamkeiten mit Gewebsmakrophagen aber auch mit neutrophilen Granulozyten aus der Körperperipherie auf. Neutrophile Granulozyten werden bei einer Entzündung schnell mobilisiert und aus dem Knochenmark freigesetzt. Adhärenz an Endothelzellen, Durchwandern von Gefäßwänden (Diapedesis) und gezielte Migration durch Chemotaxis sind essentielle Funktionen, die zur Ansammlung von neutrophilen und anderen Leukozyten am Entzündungsherd beitragen (GEMSA et al., 1991). Die Entfernung untergehender Granulozyten erfolgt in der Körperperipherie über die nachströmenden Makrophagen. Diese sollen die unerwünschte Freisetzung gewebsschädigender Enzyme verhindern (SAVILL et al., 1989). Im nicht entzündeten Gewebe besteht die Aufgabe von Gewebsmakrophagen in der Beseitigung gealterter Zellen (scavenger cells) und der Produktion einer großen Anzahl löslicher Faktoren, die für die Kommunikation innerhalb des Immunsystems wichtig sind (KIRCHNER et al., 1993) Bei Entzündungsreaktionen werden residente Makrophagen zu einer erhöhten Funktionsfähigkeit stimuliert und aktiviert. Makrophagen gehören zu den sekretorisch aktivsten Zellen des Organismus (NATHAN, 1987).

Neutrophile Granulozyten, aktivierte Mikrogliazellen und Gewebsmakrophagen sind bedeutende Zellen der unspezifischen Abwehr. Allen drei Zellen gemeinsam ist die ausgeprägte Fähigkeit zur Phagozytose, bedingt durch das Vorhandensein des C3-Rezeptors und des Fc-Rezeptors für IgG (Fc- $\gamma$ R) und die Fähigkeit, proteolytische Enzyme wie Lysozym, saure Hydroasen (Kathepsine), Kollagenasen zu produzieren. Über die  $\beta_2$ -Integrine sind sie zur Migration in Entzündungsgebiete befähigt (GAHMBERG et al., 1998). Die Zellen setzen zytotoxische Substanzen, wie Sauerstoffmetaboliten frei und besitzen Rezeptoren für TNF- $\alpha$ , IL-6, GM-CSF und IL-1. Unter den Phagozyten sind die neutrophilen Granulozyten die potentesten Produzenten von reaktiven Sauerstoffmetaboliten (GEMSA et al., 1991).

Die hauptsächlichen Unterschiede zwischen Mikrogliazellen/Makrophagen und neutrophilen Granulozyten bestehen darin, daß Mikrogliazellen/Makrophagen eine höhere Lebensdauer von mehreren Monaten haben und einen ausgeprägten Syntheseparat zur Erneuerung verbrauchter Proteine und zur Aufnahme neuer Funktionen besitzen. Zusätzlich weisen sie ein größeres Spektrum an produzierbaren Mediatoren und Rezeptoren (M-CSF und IFN- $\gamma$ -Rezeptor, Sekretion von Komplementkomponenten und Zytokinen wie TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6) auf. Desweiteren besitzen Mikrogliazellen/Makrophagen die Fähigkeit zur Immunregulation durch Kooperation mit

Lymphozyten über eine Antigenprozessierung und Antigenpräsentation (GEMSA et al., 1991). Mikrogliazellen und Makrophagen greifen in alle Stadien der Neuroinflammation ein und sind maßgeblich an der Auslösung, Regulation, aber auch an der Suppression der Neuroinflammation beteiligt und können nach einer Entzündung die notwendigen Heilungsprozesse im Gewebe unterstützen.

Mikrogliazellen lassen sich nach ihrer Aktivierung von Makrophagen nur elektrophysiologisch unterscheiden, da sie ein charakteristisches Expressionsmuster einwärts gerichteter Kalium-Kanäle besitzen (KETTENMANN et al., 1990; KETTENMANN et al., 1993). Makrophagen weisen dagegen einwärts und auswärts gerichtete Kaliumkanäle auf. Die monozytäre Abstammung und Ähnlichkeit mit Makrophagen äußert sich ebenfalls in zytochemischen Zellfärbungen. Hier zeigt die Detektion mit Antikörpern, wie beispielsweise OX-42/CD11b, CD68 oder ED1, gegen Antigene auf Mikrogliazellen auch eine Kreuzreaktion mit Monozyten/Makrophagen-Antigenen.

### **1.2.6 Beteiligung der Mikroglia an neurologischen Erkrankungen**

Die Rolle der aktivierten Mikrogliazelle im Gehirn führt in der Literatur zu kontroversen Meinungen. Die Frage, inwieweit aktivierte Mikroglia unter pathologischen Bedingungen eher den neuronalen Zelltod fördert oder aber diesem durch die Bildung neuroprotektiver Faktoren entgegenwirkt, steht hierbei im Mittelpunkt. Eine Schlüsselfrage ist weiterhin, ob die Neuroinflammation eine Konsequenz der Krankheit ist, oder ob die Neuroinflammation erst zu der Erkrankung führt oder letztendlich die Ursache ist (PERRY, 1998). Bei der Multiplen Sklerose (MS) scheint die Inflammation die Ursache der Krankheit zu sein, während beim Schlaganfall oder der Alzheimer Demenz (AD) die Inflammation erst zum Ausbruch der Krankheit führt. Zu bemerken ist dabei, daß bei akuten Hirnschäden oder chronischen Erkrankungen periphere Leukozyten in größerer Anzahl, auch bei nicht geschädigter Blut-Hirn-Schranke, ins Hirngewebe eindringen können.

Im allgemeinen führt eine Daueraktivierung von Mikrogliazellen, wenn nicht gegenläufige Prozesse in Gang gesetzt werden, zu einer chronisch, progredienten Krankheitssituation. Der Auslöser für eine chronische Neurodegeneration kann dabei ein Ungleichgewicht zwischen der intrazellulären Produktion freier Radikale durch Mikrogliazellen und den neuronalen Abwehrmechanismen in Form des antioxidativen Schutzsystems sein. Da Mikrogliazellen bei einer Dauer- und Überaktivierung zusätzlich die Fähigkeit besitzen, proinflammatorische Zytokine zu produzieren und Antigene zu präsentieren, können sie insgesamt als eine wesentliche Komponente bei der Progression pathologischer Vorgänge im Gehirn angesehen werden. In der Literatur werden zytotoxische Substanzen (siehe 1.2.4.6) als hauptsächliche Verursacher von chronischen und akuten Neurodegenerationen diskutiert (CALABRESE et al., 2000; GEBICKE-HAERTER, 2001).

Da Mikrogliazellen bei fast allen chronisch-neurodegenerativen Erkrankungen eine wichtige Rolle spielen und ebenfalls in akute neuropathologische Prozesse involviert sind, kann in den folgenden Kapiteln nicht auf jede einzelne Krankheit genauer eingegangen werden. Die **Tabelle 1.3** soll deshalb

einen zusammenfassenden Überblick über verschiedene neurologische Erkrankungen geben, an denen Mikrogliazellen mitbeteiligt sind.

**Tab. 1.3:** Beteiligung der Mikroglia an akuten und chronisch neurodegenerativen Schadensprozessen im Gehirn

Erkrankung	Kennzeichen und mikrogliale Beteiligung	Literaturhinweise
Morbus Alzheimer	<b>Extrazelluläre, neuritische Plaques durch Aggregationsbildung von <math>\beta</math>-Amyloid Protein;</b> erhöhte Expression proinflammatorischer Zytokine und Freisetzung von zellschädigenden Substanzen wie reaktiven Sauerstoffspezies über die COX-2	MCGEER & MCGEER, 1998 HALLIDAY et al., 2000
Morbus Parkinson	<b>Progressive Degeneration dopaminergener Neuronen in der Substantia nigra;</b> erhöhte Expression proinflammatorischer Zytokine und Produktion zellschädigender Substanzen über die iNOS und COX-1	WÜLLNER & KLOCKGETHER, 2003, HUNOT & HIRSCH, 2003
Multiple Sklerose	<b>chronisch-entzündliche Entmarkungsherde im Hirngewebe;</b> Produktion proinflammatorischer Zytokine und Antigenpräsentation	ANTEL & OWENS, 1999; CARSON, 2002; BENVENISTE, 1997
AIDS-Demenz	<b>Vermehrte neuronale Schädigung und Nervenzellverlust;</b> Nachweis von Virusproteinen in Mikrogliazellen (Riesenzellen), neuronale Schädigung durch Veränderung der Mikrogliazellaktivität, (Überaktivierung/ Dysregulation).	WILLIAMS & HICKEY, 2002, GARTNER & LIU, 2002
Trauma Schlaganfall Ischämie	<b>Funktionelle Störungen, die von der Lokalisation des Schadensgebietes abhängig sind;</b> Aktivierung von Mikrogliazellen im Gehirn und Makrophagen aus dem Blutkreislauf, Invasion der Zellen in das vorgeschädigte Gebiet, Freisetzung freier Radikale und toxischer Zytokine, Beteiligung an massiven sekundären Schädigungen des Gewebes.	DANTON & DIETRICH, 2003; MORGANTI-KOSSMANN et al., 2002 EMSLEY & TYRRELL, 2002

Weiterhin: Amyotrophe Laterale Sklerose (ALS) MCGEER & MCGEER, 2002; ANNESER et al., 2001;  
KAWAMATA et al., 1992  
Gehirntumore GRAEBER et al., 2002; BADIE & SCHATNER, 2001;  
ROGGENDORF et al., 1996

### 1.2.6.1 Rolle der Mikroglia bei der chronischen Neurodegeneration

Zu den bekanntesten chronisch-neurodegenerativen Erkrankungen, die eine Demenz bewirken, gehört der Morbus Alzheimer (AD). Die Ursache für diese Erkrankung ist bis heute noch weitgehend unbekannt. Charakteristische pathologische Merkmale der Alzheimer Demenz sind die fortschreitende Hirnatrophie, Abnahmen in der kortikalen Synapsendichte, die intrazelluläre Fibrillenablagerung in Neuronen und extrazelluläre, neuritische Plaques (DICKSON, 1997). Hinweise für einen inflammatorischen Prozeß geben aktivierte Mikrogliazellen, die um die neuritischen Plaques lokalisiert sind. Auch die erhöhte Expression proinflammatorischer Zytokine und die Freisetzung von zellschädigenden Substanzen, wie reaktiven Sauerstoffspezies über die COX-2 Induktion durch Mikrogliazellen, ist vielfach dokumentiert (PASINETTI & ASIEN, 1998; KALARIA, 1999; HALLIDAY et al., 2000; MCGEER & MCGEER, 2001). Die neuritischen oder senilen Plaques bestehen hauptsächlich aus dem  $\beta$ -Amyloid Protein, einem Protein, daß normalerweise im menschlichen Gehirn als untoxische Form vorkommt. Bei der Alzheimer Erkrankung erfährt das Protein jedoch eine Konformationsänderung, die zu Ablagerungen im Hirnparenchym führen (WISNIEWSKI et al., 1997). Die Ablagerungen wandeln sich über mehrere Jahre von diffusen in senile Plaques mit fibrillärem  $\beta$ -Amyloid um und wirken neurotoxisch (DICKSON, 1997). Aufgrund von *in vitro* Befunden wird diskutiert, ob Mikrogliazellen über ihre „scavenger“-Rezeptoren, die auf aktivierten Mikrogliazellen in AD-Gehirnen exprimiert sind, das  $\beta$ -Amyloid Protein binden und Teile davon phagozytieren (CHRISTIE et al., 1996). Dies könnte zu einer Zellimmobilisierung der Mikroglia und zur Bildung von Sauerstoffradikalen führen, die neurotoxisch wirken können (EL KHOURY et al., 1996). Weiterhin sind Mikrogliazellen in der Lage, Apolipoprotein E zu bilden (IGNATIUS et al., 1986), wobei gezeigt werden konnte, daß Apolipoprotein E die Aggregationsbildung von  $\beta$ -Amyloid Protein begünstigen kann (MA et al., 1994). Dies könnte ein weiterer Mechanismus sein, über den Mikrogliazellen die Entwicklung von diffusen zu neuritischen Plaques beeinflussen könnten und über den sie am neuronalen Zelltod beteiligt sind, der letztendlich zur Demenz führt.

Die Multiple Sklerose (MS), eine Autoimmunerkrankung des ZNS, ist durch chronisch-entzündliche Entmarkungsherde im Hirngewebe gekennzeichnet. Läsionen bei dieser Erkrankung sind charakterisiert durch ein entzündliches Zellinfiltrat, bestehend aus aktivierten T-Zellen, B-Zellen, Plasmazellen und Mikrogliazellen/Makrophagen. Mikrogliazellen kommen hier als zytokinproduzierendes und primär antigenpräsentierendes Element bei der Entstehung der MS in Betracht (BENVENISTE, 1997; OLSON et al., 2001; CARSON, 2002). Auf aktivierten Mikrogliazellen sind in Läsionsbereichen sowohl MHC-II- als auch kostimulatorische Moleküle wie B7 detektierbar (ULVESTAD et al, 1994b; DE SIMONE et al., 1995). Bei der Phagozytose des Myelins und/oder der geschädigten Oligodendrozyten kommt es zur Erkennung von Myelinkomponenten als „nicht-körpereigen“ und dadurch zur Antigenpräsentation von körpereigenem Antigen. Erst dann beteiligen sich aktivierte T-Zellen und Blutmonozyten am Krankheitsgeschehen. Das entzündliche Geschehen führt zu einer Zerstörung der die Axone von Nervenzellen umgebenden Myelinscheiden bzw. zu einer

Schädigung von Oligodendrozyten, die Myelin produzieren. Durch fortschreitende Demyelinisierung kommt es schließlich zu einer gestörten neuronalen Signalübertragung und einem ausgeprägten Krankheitsbild mit Sensibilitätsstörungen, Paresen und Ataxie.

### **1.2.6.2 Einfluß der Mikroglia auf akute neuropathologische Prozesse**

Eine Aktivierung von Mikrogliazellen findet man ebenso bei akuten Gewebsschädigungen im Gehirn und Rückenmark. Diese Schädigungen können durch Entzündungen, Toxine, traumatische Gewebszerstörung und durch Infektionen hervorgerufen werden (ALOISI, 2001). Auch bei einem zerebrovaskulären Insult (Schlaganfall), einem Schaden am Gehirn, der infolge krankhafter Veränderungen von Blutgefäßen auftritt, ist dies der Fall. Dabei kommt es zu einer verminderten Sauerstoffversorgung des Hirngewebes. Das betroffene Gebiet degeneriert, wird nekrotisch, und es entsteht ein ischämisches Infarktareal (GERTZ, 2001). Ursache ist hierbei nicht nur alleine die Durchblutungsstörung allein, sondern vielmehr das Zusammenspiel mehrerer Ereignisse: Durch die geringe Sauerstoffversorgung fällt zunächst der ATP-Spiegel ab. Veränderungen im pH-Wert, Störungen der Ionenverteilung und der Verlust von Membranpotentialen sowie die massive Freisetzung von Neurotransmittern und eine veränderte Kalzium-Homöostase sind die Folge. Die Freisetzung großer Mengen exzitatorischer Neurotransmitter führt über deren Bindung an ionotrope Glutamatrezeptoren zu einer ausgeprägten intraneuronalen Bildung von reaktiven Sauerstoffradikalen (HALLIWELL, 2001). Diese können mit neuronalen Makromolekülen reagieren, welche unter den Bedingungen eines Primärschadens kumulieren und toxisch wirken können. Aktivierte Mikrogliazellen aus dem Gehirn und Makrophagen aus dem Blutkreislauf dringen anschließend in das vorgeschädigte Gebiet ein und verursachen ihrerseits durch die Bildung freier Radikale und toxischer Zytokine eine massive sekundäre Schädigung des Gewebes (WOOD, 1995; KIM, 1996; ISHIBASCHI et al., 2002). Dieser Sekundärschaden von initial überlebenden Neuronen ist sowohl für die Größe des Infarktgebietes als auch für den Verlust von Hirnfunktionen verantwortlich.

Es ist denkbar, daß die Aktivierungssignale bei akuten Verletzungen anderer Natur sind, als die, mit denen Mikrogliazellen zu Beginn von chronischen Neurodegenerationen konfrontiert werden. Das legt konsequenterweise auch die Aktivierung verschiedener Rezeptormechanismen und die Auslösung von Mikrogliareaktionen nahe, die spezifisch für die Art der Verletzung oder für die Erkrankung sind. Dadurch scheinen die Mechanismen der Mikrogliaaktivierung und ihrer Ausdifferenzierung doch nicht so stereotyp abzulaufen, wie bisher vermutet. Detailliertere Einblicke in die Mikrogliaaktivierung auf zellulärer und molekularer Ebene stellen somit eine große Möglichkeit einer spezifischen, therapeutischen Strategie zur Behandlung neuroinflammatorischer Erkrankungen dar. Ein geeignetes Modellsystem für Untersuchungen zur Entstehung neurodegenerativer Erkrankungen unter mikroglialer Beteiligung ist dabei der Hippokampus, der in der vorliegenden Arbeit für Untersuchungen zur exzitotoxischen neuronalen Schädigungen eingesetzt wurde.

## **1.3 Der Hippokampus**

### **1.3.1 Funktion der entorhinal-hippokampalen Formation**

Die entorhinal-hippokampale Formation dient als ein weit verbreitetes Modellsystem, um die Entstehung neurodegenerativer Erkrankungen zu untersuchen. Die Gründe dafür sind zum einen die klinische Relevanz, da sich neuronale Schädigungen sehr früh im Hippokampus zeigen und Schädigungen zu unwiderruflichen kognitiven und mnestischen Ausfällen führen können und zum anderen die relativ einfache Zytoarchitektur, die charakteristische Eigenschaften der kortikalen Organisation aufweist (COTMAN et al., 1990; FROTSCHER et al., 1995b; STOPPINI et al.; 1991).

Der Hippokampus ist eine entwicklungsgeschichtlich sehr alte Struktur, die sich aus dem Archipallium entwickelt hat und dem limbischen System zugeordnet wird. Er ist in beiden Temporallappen der Großhirnhemisphären lokalisiert. Die Hippokampusformation erstreckt sich dabei längs vom septalen Kerngebiet des basalen Vorderhirns bis zum ventrokaudalen Pol des Temporallappens. Am temporalen Pol der Formation schließt sich der entorhinale Kortex an, der vom Isokortex durch die rhinale Fissur abgegrenzt wird.

Der Hippokampus bildet einen, aus nur drei, statt sechs Schichten, aufgebauten Bereich des Cortex, der unter anderem an Lernvorgängen und am Gedächtnis beteiligt ist. Zur hippokampalen Formation gehören der Hippokampus und der entorhinale Kortex, der einen Großteil der Eingangssignale in den Hippokampus vermittelt, sowie das Subikulum, die Struktur, in die ein Großteil der hippokampalen Projektionen zieht (AMARAL & WITTER, 1989). Verletzungen dieser Bereiche stören nur die Abspeicherung neuer Informationen, so daß der Hippokampus offenbar einen kurzzeitigen Speicher, d.h. für einige Wochen oder Monate, für Inhalte des Langzeitgedächtnisses darstellt. Für eine permanente Speicherung überträgt er Informationen in andere Hirngebiete, vermutlich in den Kortex. Der Hippokampus besitzt drei große synaptische Schaltstellen (siehe 1.3.2), wobei jede von ihnen Langzeitpotenzierungen (LTP) erzeugen kann. Von diesem Vorgang, nimmt man an, daß er am Speicherungsprozeß beteiligt ist. Eine alternative Hypothese zur Funktion des Hippokampus besagt, daß dort keine Speicherung von Informationen stattfindet, sondern daß der Hippokampus lediglich die Speicherung von der im inferior-temporalen Kortex verarbeiteten Informationen an andere Orte des Gehirns vermittelt. Der Hippokampus ist also entweder ein Zwischenlager des Langzeitgedächtnisses oder ein Hilfssystem, das für die Abspeicherung von Informationen in anderen Bereichen des Gehirns notwendig ist (KANDEL et al., 1996).

### **1.3.2 Afferente und efferente Verbindungswege im Hippokampus**

An seiner ventrikulären Seite ist der Hippokampus vom Alveus bedeckt, der aus efferenten und afferenten Fasersystemen besteht und die weiße Substanz des Hippokampus darstellt. Der Alveus setzt sich in der Fimbria hippocampi fort, die in den Fornix übergeht. Der Fornix verbindet den Hippokampus mit zahlreichen kortikalen und subkortikalen Gebieten. Direkte Afferenzen erreichen

den Hippokampus aus dem Septum über den Fornix, wobei Acetylcholin und GABA als Transmitter dienen und aus der Area entorhinalis über den Tractus perforans, wo Glutamat als Transmitter eingesetzt wird (ZILLES & REHKÄMPER, 1998).

Der Hippokampus besitzt drei wichtige afferente Verbindungswege, die vom entorhinalen Kortex, dessen Neurone von mehreren Arealen des Isokortex innerviert werden, bis in die sogenannte CA1-Region reichen. Der Tractus perforans entspringt im entorhinalen Kortex aus den Schichten II und III, und seine Axone enden auf den Körnerzellen im Hilus des Gyrus dentatus und im Stratum lacunosum-moleculare der CA1-Region (INSAUSTI et al., 1997). Dieser Faserzug ist die hauptsächliche Quelle der Eingangssignale in den Hippokampus. Die Axone der Körnerzellen - die Moosfasern - bilden nun ihrerseits ein Faserbündel und laufen zu den Pyramidenzellen in der CA3-Region. Schließlich entspringen aus den Pyramidenzellen der CA3-Region erregende Axonkollateralen - die Schaffer-Kollateralen - und ziehen zu den Pyramidenzellen in die CA1-Region. Die Pyramidenzellen in dieser Region projizieren über das Subiculum zurück zum entorhinalen Kortex (AMARAL & WITTER, 1989). Einige wenige Verbindungen bestehen auch zwischen dem Isokortex und dem Subiculum oder der CA1-Region des Hippokampus.

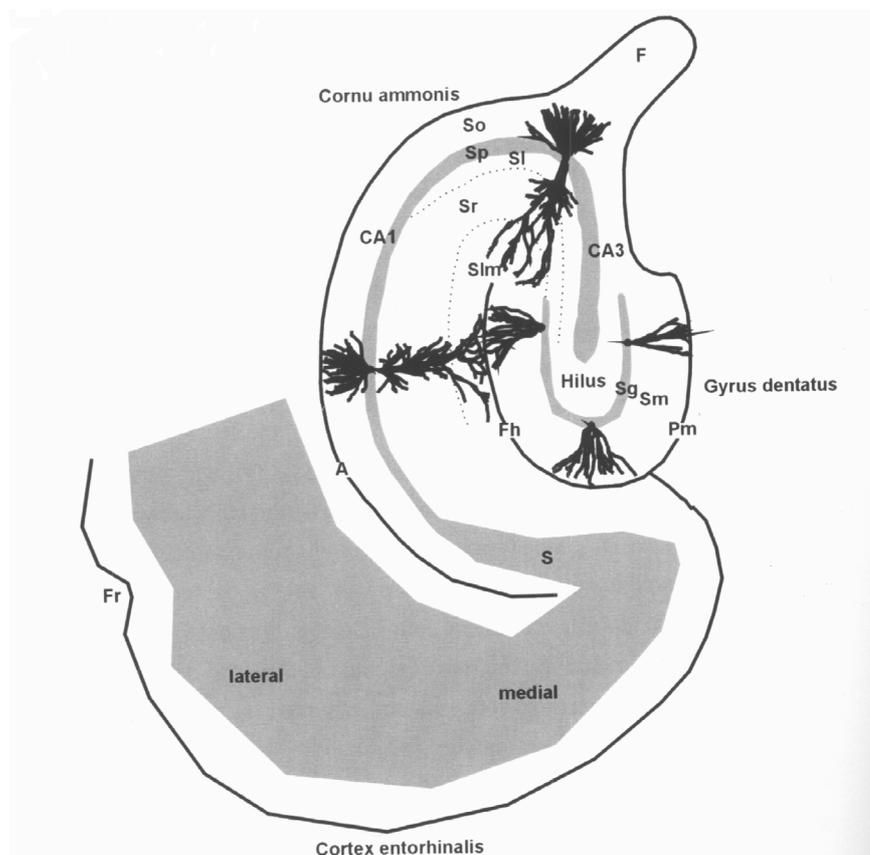
Über den Fornix verlassen die Efferenzen den Hippokampuskomplex. Wichtig ist hierbei die efferente Verbindung vom Subiculum zum Corpus mamillare im kaudalen Teil des Hypothalamus. Vom Corpus mamillare zieht dann der Tractus mamillothalamicus zum Nucleus anterior des Thalamus. Durch das Cingulum gelangt die Information dann wieder in den Hippokampus. Das System Hippokampus - Corpus mamillare - Nucleus anterior - hinterer Gyrus cinguli wird unter dem Begriff Papez-Kreis zusammengefaßt. Das Corpus mamillare ist über den Tractus mamillo tegmentalis und Pedunculus mamillothalamicus reziprok mit limbischen Kerngebieten, die in der Formatio reticularis des Mesencephalons liegen, verbunden. Eine weitere wichtige Efferenz des Hippokampus gelangt über den präkommissuralen Fornix zum Septum. Weiterhin bestehen auch kommissurale Verbindungen zwischen den Hippokampi beider Seiten. Die Blutversorgung erfolgt über die A. cerebri posterior. (ZILLES & REHKÄMPER, 1998).

### 1.3.3 Zytoarchitektur des Gyrus dentatus und des Cornu ammonis

Die zellulären Elemente des Hippokampus zeigen eine spezielle Anordnung und weisen ebenso sehr spezielle Funktionen auf. Man unterscheidet generell Prinzipalneurone, die ein dichtes Zellband bilden und aus exzitatorischen Neuronen mit langen axonalen Fasern bestehen, von Nichtprinzipalneuronen bzw. Interneuronen, die nicht exzitatorisch und nur lokal projizierend sind.

Ein Querschnitt durch den Hippokampus senkrecht zu seiner Längsachse zeigt auffällig zwei U-förmig gebogene, ineinander greifende Hirnwindungen, den Gyrus dentatus (DG) und das Cornu ammonis (CA) oder Ammonshorn (siehe **Abbildung 1.5**). Die Prinzipalneurone des DG werden als Körnerzellen bezeichnet. Sie sind in einer schmalen Schicht angeordnet, wobei die Dendriten ausschließlich apikal in der Molekularschicht lokalisiert sind (AMARAL & WITTER, 1995). Die

Molekularschicht stellt eine wichtige Verbindungsstelle für Neurone innerhalb und außerhalb des Hippokampus dar. Die Körnerzellen sind von Korbzellen (Interneurone) umgeben. Diese bilden hemmende Synapsen um die Zellkörper der Körnerzellen und treten im Zellverband oder vereinzelt auf und sind mit speziellen kalziumbindenden Proteinen (Pavalbumin, Kalbindin oder Kalretinin) kolokalisiert. Im Cornu ammonis bilden die Pyramidenzellen ein schmales Band von Neuronen mit basalen und apikalen Dendriten. Aufgrund der unterschiedlichen Morphologie (in der CA3-Region teilen sich die apikalen Dendriten direkt nach dem Abgang vom Soma, in der CA1-Region gabeln sich die apikalen Dendriten nicht) und Verschaltung (VINOGRADOVA, 2001) werden die Prinzipalneurone in zwei Regionen, CA1 und CA3, eingeteilt.



**Abb. 1.5:** Schematische Darstellung der entorhinal-hippokampalen Formation in einem horizontalen Schnitt durch den temporalen Pol. Graue Flächen beinhalten hauptsächlich Zellkörper, weiße Flächen kennzeichnen die Bereiche, in denen vor allem Zellfortsätze vorkommen. Im Gyrus dentatus und im Cornu ammonis ist beispielhaft die Morphologie der Dendriten von Projektionsneuronen (Prinzipalneuronen) wiedergegeben. **F**, Fimbria; **CA1**, Cornu ammonis Region 1; **CA3**, Cornu ammonis Region 3; **So**, Stratum oriens; **Sp**, Stratum pyramidale; **Sl**, Stratum lucidum; **Sr**, Stratum radiatum; **Slm**, Stratum lacunosum moleculare; **Sg**, Stratum granulosum; **Sm**, Stratum moleculare; **Pm**, Pia mater; **Fh**, Fissura hippocampi; **A**, Alveus; **S**, Subiculum; **Fr**, Fissura rhinalis.

### 1.3.4 Exzitotoxische Schädigung des Hippokampus mit N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)

L-Glutamat ist die vorherrschende exzitatorische Aminosäure im ZNS von Säugetieren. Sie erfüllt spezifische physiologische Funktionen, wie beispielsweise die Beteiligung an der neuronalen Entwicklung und Plastizität, (WENTHOLD & PETRALIA, 1998; WHITING & PRIESTLY, 1998) und kann aber paradoxerweise auch neurotoxisch wirken (OBRENTOVITCH & URENJAK, 1997; MICHAELIS, 1998). Eine Glutamatexzitotoxizität scheint eine wichtige Rolle bei akuten und chronischen Neurodegenerationen zu spielen, wobei die Neurotoxizität auf einen massiven intrazellulären Kalziumeinstrom durch NMDA-Typ-Glutamatrezeptoren und auf die Generation von reaktiven Sauerstoffradikalen zurückzuführen ist (CHOI, 1998; PALMER, 1998).

Modellsysteme der Exzitotoxizität dienen vor allem dazu, die biochemische Basis bei akuten und chronisch-neurodegenerativen Krankheiten aufzuklären. So zeigen Ergebnisse aus *in vivo* Studien, die am Mausmodell durchgeführt wurden, daß Veränderungen in der NMDA-Rezeptorfunktion zu einer exzitotoxischen Schädigung von Neuronen und zu einer anschließenden Neurodegeneration führen können (KUCUKKAYA et al., 1996; CEPEDA et al. 2001; ZERON et al., 2002). Weiterhin gibt es in bestimmten Hirnbereichen für neuronale Zelltypen Unterschiede in der Anfälligkeit für die Glutamat-Rezeptor-vermittelte Exzitotoxizität (BEAMAN-HALL et al., 1998). Hippokampale Pyramidenzellen sind beispielsweise sehr anfällig gegenüber Ischämie, während Körnerzellen des Kleinhirns dies weniger sind (BRIERLY & GRAHAM, 1984; PULSINELLI, 1985). Diese unterschiedliche Sensitivität liegt vermutlich an der unterschiedlichen Dichte oder Zusammensetzung der Glutamatrezeptoren, die die Initialphase der Neurotoxizität durch einen unterschiedlich starken Kalziumeinstrom in die Zelle beeinflussen (BEAMAN-HALL et al., 1998).

In der vorliegenden Arbeit wurde mit dem organotypischen hippokampalen Schnittkulturmodell gearbeitet. In diesen Schnittkulturen herrschen nach neun Tagen *in vitro* in den inneren Zonen auch bezüglich nicht-neuronaler Zellen organotypische Verhältnisse. Explantationsbedingt finden sich zunächst noch amöboide, aktivierte Mikrogliazellen. Diese zeigen jedoch nach neun Tagen in der intakten Schnittkultur eine ramifizierte Morphologie (HAILER et al., 1996). Desweiteren weist das entorhinal-hippokampale System bei Fluoreszenzmarkierung des Tractus perforans eine deutliche Intaktheit auf.

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, einen neuronalen Degenerationsprozess in organotypischen hippokampalen Schnittkulturen zu induzieren: Durch die *in vitro* durchgeführte Läsion des entorhinalen Cortex kann eine experimentelle Deafferenzierung der äußeren Molekularschicht des Gyrus dentatus erreicht werden. Der Einsatz verschiedener Noxen, wie beispielsweise NMDA oder Kainat, bewirkt eine chemische Läsion des Gewebes.

In dieser Arbeit wurde NMDA verwendet, um in den hippokampalen Schnittkulturen eine exzitotoxische Schädigung hervorzurufen. NMDA ist ein Aminosäureanalogon und Agonist für den NMDA-Rezeptor und kann somit die ionotropen Glutamatrezeptoren aktivieren. NMDA kommt normalerweise nicht im Gehirn vor und löst einen Primärschaden im Gewebe durch Überaktivierung

der exzitatorischen Aminosäurerezeptoren (NMDA-Rezeptoren) aus. Dies führt, wie bei der Glutamatergischen Exzitotoxizität, zu einem massiven Kalziumeinstrom durch NMDA-aktivierte Kanäle in die Zelle (MODY & MACDONALD, 1995). Als Folge davon werden intraneuronal Sauerstoffradikale gebildet, die mit Makromolekülen reagieren und akkumulieren können und letztlich zum neuronalen Zelltod führen.

## 1.4 Die Poly(ADP-ribose)-Polymerase-1 (PARP-1)

### 1.4.1 Allgemeine Grundlagen der Poly(ADP-ribosyl)ierung

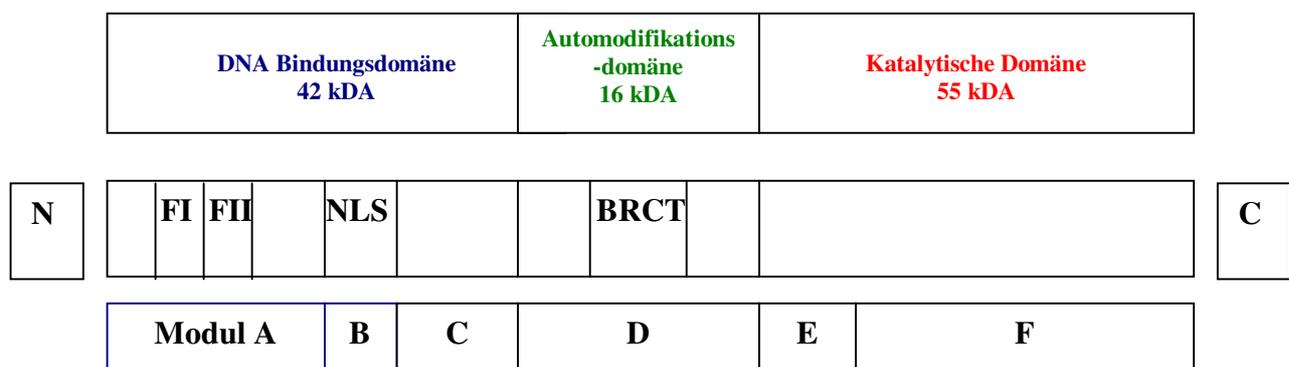
Die Poly(ADP-Ribose)-Polymerase-1 (PARP-1) ist ein ubiquitäres 113 kDa großes nukleäres Enzym, das unter Abspaltung von Nikotinamid den Transfer von ADP-Ribose-Einheiten aus NAD<sup>+</sup> auf spezifische Akzeptorproteine katalysiert (siehe **Abbildung 1.6**). Diese ADP-Ribose-Einheiten erreichen zum Teil eine sehr hohe Komplexität, wobei bis zu 200 Einheiten mit verschiedenen Verzweigungsstellen vorliegen können. Dieser Vorgang wird auch als Poly(ADP-Ribosyl)ierungs-Reaktion bezeichnet und stellt eine posttranslationale Modifikation nukleärer Proteine an ihren Glutamat-, Aspartat- und Lysinreste dar (HA & SNYDER, 2000). Die rein nukleär lokalisierte PARP-1 trägt zu über 80 % der Poly(ADP-Ribosyl)ierungsreaktionen einer Zelle bei. Dabei kommt es entweder direkt zu einer kovalenten Modifikation von Aminosäureketten der Akzeptorproteine durch die Synthese polymerer ADP-Ribose-Ketten (Heteromodifikation), oder es entsteht eine nichtkovalente Bindung von Poly(ADP-Ribose)-Ketten über die automodifizierten PARP-1 an Effektorproteine (DE MURCIA & SHALL, 2000). Die dabei entstehenden ADP-Ribose-Polymere stellen eine große Ansammlung negativer Ladungen dar, die für die physiologische Funktion der modifizierten Proteine entscheidend sind. Weiterhin kommt es über die Poly(ADP-Ribose) Bindungsstellen zu Proteinmodifikationen, wobei die Veränderung der Eigenschaften dann nicht auf die negativen Ladungen zurückzuführen sind.

Das Vorkommen der PARP-1 im Kern von Säugerzellen wurde 1963 erstmals von Chambon et al. beschrieben (CHAMBON et al., 1963). Heute ist bekannt, daß die PARP beispielsweise an der Regulierung wichtiger Zellkernproteine, der DNA-Reperatur, der Apoptose und der Transkriptionsregulation beteiligt ist (BÜRKLE, 2001; D'AMOURS et al., 1999). Weiterhin wird der Poly(ADP-Ribosyl)ierung eine zentrale Rolle bei neuroinflammatorischen Prozessen im ZNS zugeschrieben (HA & SNYDER, 2000). Die PARP-1 scheint dabei eine wichtige Komponente bei der NMDA-vermittelten Exzitotoxizität zu sein (GOTO et al., 2002). Ein besonderer Schwerpunkt wurde deshalb in der vorliegenden Arbeit auf die Rolle der PARP-1 bei der Mikrogliaaktivierung nach exzitotoxischer Hirnschädigung gelegt, da in tierexperimentellen Krankheitsmodellen des ZNS mehrfach gezeigt werden konnte, daß die Inhibition der PARP-1 eine Hemmung der NMDA-Rezeptor vermittelten Glutamatoxizität bewirkt, wodurch einem neuronalen Zelltod entgegengewirkt werden kann (ZHANG et al., 1994; ELIASSON et al., 1997; TOKIME et al., 1998).



### 1.4.2 Proteinstruktur der PARP-1

Die PARP-1 ist ein evolutionär hochkonserviertes Enzym und besitzt eine charakteristische 3-Domänenstruktur: Die aminoternale Domäne, eine 42 kDa große Region, bindet über zwei Zink-Finger-Motive mit hoher Affinität an Einzel- oder Doppelstrangbrüche der DNA (CHERNEY et al., 1987; MAZEN et al., 1989). Dieser Vorgang bewirkt eine sofortige Aktivierung des katalytischen Zentrums in der carboxyterminalen NAD<sup>+</sup>-Bindungsdomäne über einen bisher unbekanntem Mechanismus. Ebenso ist in der aminoternalen Domäne das nukleäre Lokalisationssignal NLS (nuclear localization signal) vorhanden, welches benötigt wird, um die PARP-1 zum Nukleus zu leiten (UCHIDA et al., 1987). Die carboxyterminalen NAD<sup>+</sup>-Bindungsdomäne ist eine 55 kDa große Region, die sämtliche Teilschritte der enzymatischen Reaktion katalysiert (RUF et al., 1996). Die katalytisch aktive Form der PARP-1 ist ein Dimer (MENDOZA-ALVARES & ALVAREZ-GONZALES, 1993). Die zentrale Automodifikationsdomäne ist 16 kDa groß und dient mit 15 konservierten Glutamatseitenketten der Protein-Protein-Interaktion (D'AMOURS et al., 1999). Sie enthält weiterhin eine BRCT (breast cancer susceptibility protein)-Domäne (ZHANG et al., 1998), ein Modul das vermutlich für die starke und spezifische Bindung mit BRCT-Motiv tragenden Proteinen sorgt. Der Hauptakzeptor für poly(ADP-Ribose) ist die PARP-1 selber. Eine weitere sequenzspezifische DNA-Bindungsaktivität wird den Modulen C und D zugeordnet. Diese ist jedoch Strangbruch-unabhängig und wahrscheinlich für die Transkriptionsregulation verantwortlich (D'AMOURS et al., 1999). **Abbildung 1.7** zeigt schematisch vereinfacht den Aufbau der PARP-1.



**Abb. 1.7:** Schematische Darstellung der Proteinstruktur der PARP-1. Die PARP-1 besteht aus drei funktionellen Domänen: Die aminoternale (N) Region enthält die zwei Zink-Finger-Motive (FI und FII) zur DNA-Strangbrucherkenung und das nukleäre Lokalisationssignal NLS, um die PARP-1 in den Nukleus zu leiten. Die mittlere Region ist für die Automodifikation verantwortlich und enthält weiterhin eine BRCT-Domäne, ein Modul für die Protein-Protein-Interaktion mit BRCT-Motiv tragenden Proteinen. Die carboxyterminale ( C ) Region enthält die katalytische Domäne. Die Module C und D sind vermutlich für die Transkriptionsregulation verantwortlich.

Die PARP-1 wird vom humanen *ADPRT*-Gen codiert, welches sich auf dem Chromosom 1q41-q42 befindet (LAMARRE et al., 1988). Dieses wird konstitutionell abhängig vom Zelltyp und Differenzierungsgrad exprimiert. Analog dazu ist das murine *Adprt1*-Gen zu sehen.

### 1.4.3 Die „PARP-Familie“

Die PARP-1 stellt das bisher am besten untersuchte Protein aus der PARP-Protein-Familie dar. Weitere Isoformen unterscheiden sich teilweise grundsätzlich in ihrer Funktion und Lokalisation von der erstgenannten. Es ist erst seit wenigen Jahren bekannt, daß es von der PARP Isoformen gibt, die bis zu 25 % der gesamten zellulären Poly(ADP-Ribose)-Produktion ausmachen (SHIEH et al., 1998). Hierzu gehören die humane hPARP-2, die humane hPARP-3, die murine mPARP-2 und die murine sPARP (AME et al., 1999; BERGHAMMER et al., 1999; JOHANSSON, 1999, SALLMANN et al., 2000). Die Isoformen unterscheiden sich von der PARP-1 im Aufbau der Domänen. So fehlen beispielsweise der 62 kDa großen mPARP-2 die beiden Zink-Finger-Motive und die Kernlokalisationssequenz in der aminoterminalen Domäne (AME et al., 1999). Der 55,3 kDa großen sPARP-2 fehlen die aminoterminalen und zentrale Proteindomäne (SALLMANN et al., 2000). Trotz des unterschiedlichen Aufbaus können diese Isoformen auch durch DNA-Strangbrüche aktiviert werden, die sPARP aber ebenso unabhängig davon.

Das Vorkommen der PARP-Enzyme ist nicht nur auf Säugetiere beschränkt. In den Pflanzenarten *Arabidopsis thaliana* (BABYCHUCK et al., 1998) und *Zea mays* (MAHAJAN & ZUO, 1998) wurde eine PARP, jedoch ohne aminoterminalen Zink-Finger-Domäne nachgewiesen. Auch in *Drosophila* konnte eine PARP mit (dPARP-1) und eine PARP ohne (dPARP-2) Automodifikationsdomäne identifiziert werden (KAWAMURA et al., 1998).

Weitere Mitglieder der PARP-Familie sind beispielsweise die Tankyrase (TRF.1 interacting, ankryin-related ADP-ribose polymerase), die an der Regulation der Telomersynthese beteiligt ist (SMITH et al., 1998b) und die VPARP (Vault-Poly(ADP-Ribose)-Polymerase, die an der Funktion der mitotischen Spindel eine essentielle Funktion ausübt (KICKHOEFER et al., 1999).

### 1.4.4 Enzymatischer Abbau der Poly(ADP-Ribose)

Poly(ADP-Ribose) wird durch die Poly(ADP-Ribose)-Glykohydrolase (PARG) zu freier ADP-Ribose abgebaut (MIWA & SUGIMURA, 1971). Die PARG ist ebenfalls im Zellkern lokalisiert und in etwa 13 bis 50-fach geringerer Konzentration als die PARP vorhanden. Da sie aber bis zu etwa 50 bis 70-fach katalytisch aktiver als die PARP ist, ist sie in der Lage, Poly(ADP-Ribose) ohne kinetische Limetierung abzubauen (HATAKEYAMA et al., 1986). Über die physiologischen und pathophysiologischen Wirkungen der dabei entstehenden freien ADP-Ribose ist bisher nur wenig bekannt. Freie ADP-Ribose ist in der Lage, sehr schnell mit Lysin-Seitenketten von Proteinen zu reagieren und diese nichtenzymatisch zu glykosylieren (CERVANTES-LAUREAN et al., 1996). Vermutungen liegen jedoch nahe, daß dieser Vorgang durch eine ADP-Ribosyl-Protein-Lyase

verhindert werden kann, die in der Lage ist, die ADP-Ribose-Polymere vom Akzeptorprotein abzuspalten. Die freien ADP-Ribose-Monomere werden dann durch eine ADP-Ribose-Pyrophosphatase zu AMP und Ribose-5-Phosphat abgebaut (WIELCKENS et al., 1982).

#### 1.4.5 Funktionen der Poly(ADP-ribosyl)ierung

Eine wichtige Funktion erfüllt die PARP-1 bei der DNA-Reparatur und der genomischen Stabilität. Die Poly(ADP-Ribosyl)ierung von Histonen führt zur Chromatindekondensation (FRECHETTE et al., 1985), die eine Voraussetzung für die Bindung von Transkriptionsfaktoren an die DNA darstellt. Nach Abbau der Poly(ADP-Ribose) kommt es dann wieder zur Kondensation des Chromatins (DE MURCIA et al., 1986). Die Aktivierung der PARP-1 und ihre Bindung an DNA-Schäden verhindern effektiv die Interaktion geschädigter DNA mit genetischen Rekombinationssystemen und die Bindung anderer Moleküle (WANG et al., 1997). Durch die Bindung der PARP-1 an Stellen der Transkriptionsinitiation kann ein sofortiger Transkriptionsstopp erreicht werden, so daß eine fehlerhafte Transkription vermieden werden kann („nickprotection“). Nach Abdiffusion der PARP-1 unter Mitnahme von nicht-kovalent-gebundenen Histonen („Histon-Shuttling“) wird die DNA für Reparaturenzyme zugänglich gemacht (DE MURCIA & MENISSIER DE MURCIA, 1994). Im Tierexperiment konnte weiterhin gezeigt werden, daß PARP-1<sup>-/-</sup>-Mäuse eine hohe Anfälligkeit gegenüber alkylierenden Substanzen zeigen (TSUTSUMI et al., 2001).

Die Aktivierung der PARP führt zu einem gesteigerten NAD<sup>+</sup>-Verbrauch (BERGER et al., 1985). Daher können massive DNA-Schäden, die zu einer Überaktivierung der PARP führen, durch schnellen und drastischen Verlust an NAD<sup>+</sup> und ATP zum Zelltod führen. Somit ermöglicht die PARP-1 einerseits das Überleben von moderat geschädigten Zellen durch die Einleitung von Reparaturvorgängen. Liegt andererseits ein schwerer DNA-Schaden in der Zelle vor, so ist das Enzym über den hohen NAD<sup>+</sup> und ATP-Verbrauch in der Lage, die Zelle metabolisch zu töten. Da genomisch schwer geschädigte Zellen eine erhöhte Mutationsrate zeigen und eine höhere Wahrscheinlichkeit zur malignen Transformation aufweisen, erscheint diese „letzte Maßnahme“ als sinnvoll, da somit die Entstehung genomisch geschädigter Zellpopulationen verhindert werden kann.

Die automodifizierte PARP-1 ist ebenso an der Transkriptionskontrolle und damit an der Genexpression beteiligt. Folgende Transkriptionsfaktoren wurden in diesem Zusammenhang gefunden: AP-2, DF1-4, E47, NF- $\kappa$ B, p53, PC1, Oct-1, RXR, TBP, TEF-1 und YY1 (DE MURCIA & SHALL, 2000). Dabei übt die Interaktion der PARP-1 mit den genannten Faktoren entweder einen positiven oder einen negativen Effekt auf den Transaktivierungsprozeß aus. Microarray-Analysen, die mit primären Fibroblasten aus PARP-1<sup>-/-</sup>-Mäusen durchgeführt worden waren, zeigten eine verminderte Expression von Genen, die beim progressiven Zellzyklus, bei der Mitose und bei der DNA-Replikation von Bedeutung sind. Gene, die vermutlich bei der Krebsentstehung und normalen oder vorzeitigen Alterungsprozessen beteiligt sind, wurden verstärkt exprimiert (BÜRKLE, 2001). Die PARP-1 gilt als ein Kofaktor bei der NF- $\kappa$ B-vermittelten Transaktivierung, die eine entscheidende

Rolle bei Immunreaktionen und inflammatorischen Prozessen spielt (OLIVER et al., 1999; KAMEOKA et al., 2000).

Die PARP-1 ist weiterhin in Alterungsprozesse involviert. In diesem Zusammenhang ist es interessant, daß die zelluläre Poly(ADP-Ribosyl)ierungs-Kapazität bei Menschen und bei Ratten im Alter abnimmt, wodurch eine erhöhte Wahrscheinlichkeit genomischer Instabilitäten und maligner Entartungen im alternden Organismus erklärt werden könnten.

Auch bei der Apoptose, dem programmierten und energieabhängigen Zelltod, ist die PARP-1 involviert. Bei der Apoptose, die bei Wachstums- und Entwicklungsvorgängen ohne inflammatorische Komponenten stattfindet, wird die PARP-1 proteolytisch in der DNA-bindenden Domäne gespalten (KAUFMANN et al., 1993). Die PARP-1-Spaltung dient dabei als etablierter Marker für apoptotische Zellen. Die funktionelle Bedeutung der PARP-1-Spaltung liegt darin, ihre drastische Aktivierung durch die bei der Apoptose entstehende DNA-Fragmentierung zu unterbinden. Wie bereits beschrieben, würde eine massive PARP-1-Aktivierung zu einem zellulären Energiedefizit führen und letztendlich einen nekrotischen Zelltod auslösen. (HERCEG & WANG, 1999).

Die PARP-1-Inhibition verhindert den nekrotischen Zelltod bei N-methyl-D-Aspartat (NMDA)-induzierter Neurodegeneration und zerebraler Ischämie (ENDRES et al., 1997; ELIASSON et al., 1999). Weiterhin bewirkt eine Inhibition der PARP-1 einen Schutz vor dem AIF-induzierten programmierten Zelltod, der Caspase unabhängig ist (CREGAN, et al., 2002). AIF ist ein mitochondriales Flavoprotein, das als Antwort auf eine Zellschädigung freigesetzt und vermutlich unter Beteiligung der PARP-1 in den Zellkern transloziert wird (YU et al., 2002). PARP-1<sup>-/-</sup>-Mäuse sind aber nicht gegenüber dem Fas-induzierten apoptotischen Zelltod geschützt (HA & SNYDER, 1999).

#### **1.4.6 Funktionelle Bedeutung der PARP-1 bei Erkrankungen des zentralen Nervensystems (ZNS)**

Die Rolle der PARP-1 bei Erkrankungen des ZNS wird seit 1994 erforscht. Zuerst wurde die PARP-1 mit dem Stickstoffmonoxid (NO) -induzierten neuronalen Zelltod nach einem zerebralen Insult in Verbindung gebracht (ZHANG et al., 1994). Bei dieser neuroexzitotoxischen Schädigung kommt es zunächst zu einem etwa 50-fachen Anstieg der extrazellulären Glutamatkonzentrationen. Dies führt über die Aktivierung von NMDA-Rezeptoren zur Aktivierung der neuronalen Stickstoffoxidsynthetase (nNOS). Daraufhin wird in der Zelle NO freigesetzt, welches zu einer Aktivierung der PARP-1 führt (ZHANG et al., 1994). Durch die massive Aktivierung der PARP-1 erfährt die Zelle einen starken Verbrauch an NAD<sup>+</sup>, was letztendlich zu einem hohen Verlust an ATP führt. Auf diese Weise entsteht ein erhebliches Energiedefizit in der neuronalen Zelle, was schließlich im nekrotischen Tod der Zelle endet (ZHANG et al., 1994; ELIASSON et al., 1997; HA & SNYDER, 2000). Gestützt wurden diese Befunde durch humanes Autopsiematerial, in dem eine erhöhte postmortale PARP-Konzentration nach globaler Ischämie nachgewiesen werden konnte (LOVE et al., 1999).

In tierexperimentellen Krankheitsmodellen des ZNS konnte gezeigt werden, daß die Inhibition der PARP-1 eine Hemmung der NMDA-Rezeptor vermittelten Glutamatoxizität bewirkt (ZHANG et al.,

1994). Die NMDA-Toxizität ist weiterhin in kortikalen Neuronen von PARP<sup>-/-</sup> Mäusen praktisch aufgehoben. Dieser Effekt konnte auch durch die chemische Hemmung mit dem hochspezifischen PARP-Inhibitor DPQ erreicht werden (ZHANG et al., 1994). Ebenso zeigen PARP<sup>-/-</sup> Mäuse eine stärkere Neuroprotektion als Tiere, die mit NMDA-Antagonisten oder NOS-Inhibitoren behandelt wurden (ELIASSON et al., 1997; TOKIME et al., 1998). Die PARP-1 spielt jedoch nur eine Rolle in der NMDA-induzierten, nicht aber in der AMPA-vermittelten Exzitotoxizität (MANDIR et al., 2000).

PARP-Inhibitoren sind demnach bei einer zerebralen Ischämie in der Lage, sowohl die Aktivierung der PARP als auch den darauffolgenden starken Energieverlust der Zelle zu unterbinden (PLASCHKE et al., 2000). Damit erscheint die Anwendung von PARP-Inhibitoren als eine vielversprechende Therapie, um einem neuronalen Zelltod durch exzitotoxische Schädigung oder Ischämie vorzubeugen. Da die PARP-1 jedoch ebenso an der schnellen und effizienten DNA-Reparatur beteiligt ist (DANTZER et al., 1999) und einen essentiellen Schutzmechanismus für die neuronale Zelle darstellt, der es ihr ermöglicht, mit Streßfaktoren wie beispielsweise freien Radikalen umzugehen (COLTON & GILBERT, 1993), erweist sich die systemische PARP-1-Hemmung als kritisch. Messungen über den neuronalen Gesamtschaden bei Ratten nach systemischer PARP-Hemmung ergaben, daß nicht unmittelbar nach dem Infarkt, sondern 72 h nach einer Ischämie eine reduzierte Zahl überlebender Neurone in der hippokampalen CA1-Region vorlagen (LIU et al., 2000). Damit hat eine PARP-1-Aktivierung, wenn die Folge nicht eine ATP-Depletion ist, durchaus auch eine neuroprotektive Wirkung und scheint wichtig für die Reperaturprozesse eines initialen Schadensereignisses zu sein (BÜRKLE, 2001).

Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde in der vorliegenden Arbeit ein Schwerpunkt auf die Neuroprotektion nach einer exzitotoxischen neuronalen Schädigung durch die Hemmung der PARP-1 gelegt. Die weitverbreitete Strategie der systemischen PARP-1-Inhibition wurde jedoch eingengt und auf eine spezielle, immunkompetente Zelle des Gehirns fokussiert, die Mikrogliazelle. Aktivierte Mikrogliazellen sind in der Lage, nach einem neuronalen Initialschaden zum Ort der neuronalen Schädigung spezifisch zu migrieren. Dort setzen sie zytotoxische Produkte frei und stellen somit eine Gefahr für ursprünglich überlebende Neurone dar (SCHUBERT & RUDOLPHI, 1998). Aufgrund eigener Vorarbeiten ist bekannt, daß die PARP-1 in aktivierten Mikrogliazellen in einer hohen Konzentration vorliegt und an der Regulation eines wichtigen antioxidativen Schutzsystems teilnimmt (ULLRICH et al., 2001). Bisherige Studien, die sich allerdings auf Immunzellen des peripheren Körpergewebes beziehen, zeigen eine Beteiligung der PARP-1 bei inflammatorischen Prozessen (ZINGARELLI et al., 1998; LIAUDET et al., 2000). Dabei wird die Funktion der PARP-1 bei der Einwanderung von Entzündungszellen ins Gewebe diskutiert (OLIVER et al., 1999). Die spezifische Hemmung der mikroglialen PARP-1 könnte somit eine neue Strategie zur Protektion initial überlebender Neurone vor weiterer Schädigung darstellen, da ihre eigenen neuronalen Reparaturprogramme nicht beeinträchtigt werden würden.

## 1.5 Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit sollten Fragestellungen auf dem Gebiet der Regulation der Mikrogliazellaktivierung im Rahmen einer exzitotoxischen neuronalen Schädigung in lebendem Hirngewebe bearbeitet werden.

Ein besonderer Schwerpunkt wurde auf die Rolle der Poly(ADP-ribose)-Polymerase-1 (PARP-1) bei der Mikrogliaaktivierung nach exzitotoxischer Hirnschädigung gelegt, da in tierexperimentellen Krankheitsmodellen des ZNS mehrfach gezeigt werden konnte, daß die Inhibition der PARP-1 eine Hemmung der NMDA-Rezeptor vermittelten Glutamattoxizität bewirkt, wodurch einem neuronalen Zelltod entgegengewirkt werden kann.

In dieser Arbeit fanden molekularbiologische und zellbiologische Arbeitsmethoden, sowie immunzytologische und immunhistochemische Techniken ihren Einsatz:

Zunächst sollte durch Einklonieren einer gegen die mRNA der PARP-1 gerichteten antisense-Sequenz in einen pcDNA3.1-Vektor und die anschließende Transfektion von Mikrogliazellen mit diesem Vektor, die Expression dieses Enzyms in Mikrogliazellen verhindert werden. Transfizierte Mikrogliazellen sollten anschließend in Superkultivierungsversuchen auf organotypischen hippocampalen Komplexschnittkulturen eingesetzt werden, um Auskünfte über deren Migrationsverhalten und deren Einfluß auf den neuronalen Zelltod zu erhalten. In Zellkulturversuchen sollten dann intrazelluläre Signalmechanismen näher untersucht werden, um folgende Fragestellungen zu beantworten:

- 1. Ist die PARP-1 in Mikrogliazellen an der Kontrolle der Zellmigration zum Ort der neuronalen Schädigung beteiligt?**
- 2. Über welche migrationsvermittelnden Moleküle könnte die PARP-1 einen Einfluß auf die mikrogliale Migration nehmen?**
- 3. Über welchen Mechanismus werden diese migrationsvermittelnden Moleküle PARP-1-abhängig reguliert?**
- 4. Schützt ein Eingriff in diese Mechanismen initial geschädigte Neurone vor einer weiteren inflammatorischen Schädigung (Sekundärschaden) durch invadierende Mikrogliazellen?**