

Aus dem Institut für Zell- und Neurobiologie
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Identifizierung und Charakterisierung des
Makrophagen/Mikroglia Aktivierungsfaktors im
geschädigten Hippocampus**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité –
Universitätsmedizin Berlin

von

Anna M. Lünemann, geb. Klötting

aus Berlin

Gutachter: 1. Professor Dr. R. Nitsch, Berlin

2. PD Dr. C. Eder, Berlin

3. Professor Dr. M. T. Heneka, Münster

Datum der Promotion: 22.06.2007

ZUSAMMENFASSUNG

Makrophagen und Mikrogliazellen spielen eine zentrale Rolle im Abwehrsystem des zentralen Nervensystems (ZNS). Sie werden nach einer ZNS Läsion unmittelbar aktiviert, migrieren zum Ort des Schadens und sind hier für den sekundären neuronalen Zellschaden von herausragender Bedeutung. Das Verständnis der genauen molekularen Mechanismen hierfür ist bisher nur lückenhaft vorhanden. Ziel dieser Dissertation war die Charakterisierung der Regulation und des Expressionsmusters des Makrophagen Aktivierungsfaktor (MAF) nach fokaler ZNS Läsion. MAF wurde erstmals als differenzierungsassoziierter Faktor des Monozyten/Makrophagen-Systems beschrieben. Vorarbeiten zu dieser Arbeit zeigten eine konsistente läSIONsassozierte Hochregulation von MAF auf mRNA Ebene nach entorhinaler Kortexläsion (ECL).

Es konnte in dieser Dissertation gezeigt werden, dass (i) MAF differenzierungsabhängig nur in ausdifferenzierten Makrophagen exprimiert wird, (ii), diese Hochregulation von MAF CD11b abhängig induziert wird, (iii) mittels eigenständig generierter polyklonaler, spezifischer Antikörper, dass MAF auf Proteinebene in Makrophagen/Mikroglia nach ECL läSIONsassoziiert und auf den deafferenzierenden Hippocampus beschränkt exprimiert wird, (iv) dass MAF in murinen Mikrogliazellen in vitro und in vivo ein intrazellulär vesikuläres Expressionsmuster aufweist, (v) dass MAF hämolytische Eigenschaften besitzt und (vi) strukturell einer neuartigen hochkonservierten Proteinfamilie zuzuordnen ist, die sich durch ein gemeinsames Motiv von sieben transmembranären Spannen auszeichnet.

Die CD11b-gesteuerte und läSIONsassozierte Expression von MAF im deafferenzierenden Hippokampus weist auf eine mögliche zentrale Rolle im Rahmen der Differenzierung von Mikrogliazellen zum phagozytierenden Phänotyp hin. MAF könnte ein geeignetes Zielmolekül für das therapeutische Vermeiden oder Begrenzen des durch Makrophagen/Mikroglia verursachten sekundären Zellschadens nach ZNS Läsion sein.

Schlagworte: Makrophagen, Mikroglia, entorhinale Kortexläsion, Hippokampus, Deafferenzierung.

ABSTRACT

After traumatic brain lesion, microglial cells are rapidly activated, migrate towards the sites of injury and cause secondary damage that accounts for most of the loss of brain function. This thesis aimed at characterizing the regulation of the macrophage/microglia activation factor (MAF) which expression was previously demonstrated to be differentiation-associated in myeloid hematopoietic cells and was shown to be consistently upregulated following entorhinal cortex lesion (ECL) at the mRNA level. Using the monocytic cell line U937, we could demonstrate that MAF is upregulated after TPA-induced differentiation into macrophages. The maturation-associated MAF upregulation could be blocked by CD11b antisense transfection. Furthermore, we have generated a specific antibody against MAF. In BV-2 microglial cells, MAF is co-localized with IB-4, a classical microglial marker. In addition, we have analyzed the in vivo expression patterns of MAF after ECL. We could show a substantial upregulation of MAF on most macrophages/microglial cells in the deafferented hippocampus, while there was no MAF expression detectable on the contralateral side. In the perilesional region, in most but not all cells MAF is co-localized with CD11b and IB4, two classical markers for microglial cells. Confocal microscopy revealed a lysosome-like expression pattern in BV-2 cells as well as in ECL-associated macrophages/microglial cells in vivo. My data indicate that MAF is upregulated after monocyte maturation in a CD11b-dependent manner. Furthermore, we could demonstrate that MAF is expressed only in selected macrophages/microglial cells around the lesion and in the degenerating hippocampus after ECL. Consistent with these lesion-associated expression patterns, MAF expression in monocytic cells seems to play a functional role in the differentiation to a phagocytosing phenotype and may be, at least partially, required for phagocytotic activity, specifically in lesioned tissue after brain trauma.

Keywords: macrophages, microglia, entorhinal cortex lesion, hippocampus, deafferentiation.

INHALTSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG	3
ABSTRACT	4
ABKÜRZUNGEN	7
1 EINLEITUNG	10
1.1 ALLGEMEINES	10
1.2 HISTORISCHER HINTERGRUND.....	11
1.3 MAKROPHAGEN UND MIKROGLIA IM ZNS.....	12
1.4 ROLLE VON MAKROPHAGEN/MIKROGLIA BEI SCHADENSPROZESSEN IM ZNS	14
1.5 DIE ENTORHINALE KORTEXLÄSION	15
1.6 MIKROGLIA UND MAKROPHAGEN MARKER.....	16
1.7 IDENTIFIZIERUNG DES MAKROPHAGEN AKTIVIERUNGSFAKTORS (MAF)	18
2 ZIEL UND FRAGESTELLUNG DER VORLIEGENDEN ARBEIT	19
2.1 ALLGEMEINES	19
2.2 MAF IN VERSCHIEDENEN MYELOIDEN ZELLPOPULATIONEN	19
2.2.1 <i>Wie zeigt sich MAF in Monozyten, Makrophagen und Mikrogliazellen?</i>	19
2.2.2 <i>Wird die MAF-Expression CD11b-abhängig reguliert?</i>	20
2.2.3 <i>MAF in primären Makrophagen/Mikroglia</i>	20
2.3 MAF-EXPRESSIONSMUSTER NACH LÄSION.....	20
2.4 MAF IN ANDEREN SPEZIES UND VERWANDTSCHAFT ZU ANDEREN MOLEKÜLEN.....	21
2.4.1 <i>Wie lässt sich MAF einordnen?</i>	21
2.4.2 <i>Besitzt MAF hämolytisches Potential?</i>	21
3 MATERIAL UND METHODEN	22
3.1 NORTHERN BLOTTING.....	22
3.2 HERSTELLUNG POLYKLONALER ANTI-MAF-ANTIKÖRPER	22
3.2.1 <i>Auswahl der Peptide</i>	22
3.2.2 <i>Kopplung der Peptide an Trägerproteine</i>	23
3.2.3 <i>Adsorption an Bentonit</i>	25
3.2.4 <i>Immunisierung der Kaninchen</i>	26
3.3 TESTUNG DER NEU PRODUZIERTEN ANTIKÖRPER	27
3.3.1 <i>Dot Blots</i>	27
3.3.2 <i>Western Blot mit U937 Zellen</i>	28
3.3.3 <i>Immunohistochemie mit Peptidinhibition</i>	29

3.4	WESTERN BLOT MIT BV-2 ZELLEN	30
3.5	STEREOTAKTISCHE ENTORHINALE KORTEXLÄSION (ECL) <i>IN VIVO</i>	30
3.6	ZELLKULTUR	31
3.6.1	<i>U937 Zellen</i>	31
3.6.2	<i>BV-2 Mikrogliazellen</i>	31
3.6.3	<i>Gemischte Neuron/Glia-Kokulturen</i>	31
3.7	IMMUNOHISTOCHEMIE.....	31
3.7.1	<i>Visualisierung durch das Chromogen 3,3' Diaminobenzidin (DAB)</i>	32
3.7.2	<i>Immunofluoreszenzfärbungen</i>	32
3.8	KONFOKALE MIKROSKOPIE	33
3.9	GENBANK ANALYSE.....	34
3.10	KYTE-DOOLITTLE-ALGORITHMUS.....	34
3.11	HÄMOLYSEPOTENTIAL	35
4	ERGEBNISSE	36
4.1	MAF WIRD BEI DER REIFUNG VOM MONOZYTEN ZUM MAKROPHAGEN CD11B- ABHÄNGIG HOCHREGULIERT.	36
4.2	GENERIERUNG EINES MAF-SPEZIFISCHEN ANTIKÖRPERS IN KANINCHEN.....	38
4.3	WESTERN BLOT MIT BV-2 ZELLEN	40
4.4	KOKALISATION UND VERTEILUNG DES MAF-ANTIKÖRPER MIT DEM MIKROGLIAMARKER ISOLEKTIN B4 IN BV-2 ZELLEN	41
4.5	EXKLUSIVE MAF-EXPRESSION AUF MAKROPHAGEN/MIKROGLIA ZELLEN IN NEURONEN/GLIA KOKULTUREN	43
4.6	MAF-IMMUNOREAKTIVITÄT AUF MIKROGLIAZELLEN IST AUF DEN DEAFFERENZIERENDEN HIPPOCAMPUS DER LÄSIONSSEITE BESCHRÄNKT	44
4.7	NCBI-GENBANK-ANALYSE	48
4.8	KYTE-DOOLITTLE-ALGORITHMUS UND DIE STRUKTURELLE HOMOLOGIE ZU HÄMOLYSIN III.....	49
4.9	MAF BESITZT HÄMOLYTISCHE EIGENSCHAFTEN.....	51
5	DISKUSSION	54
	DANKSAGUNG.....	74
	LEBENS LAUF.....	76
	ERKLÄRUNG.....	78

ABKÜRZUNGEN

Zum Teil wurde bei der Verwendung von Abkürzungen auf die in der Literatur üblichere angelsächsische Version zurückgegriffen. Die deutsche Übersetzung findet sich (sofern geläufig) in Klammern.

A	Ampere
Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
°C	Grad Celsius
CD	cluster of differentiation
cDNA	complementary DNA (komplementäre Desoxyribonukleinsäure)
CR3	Komplement-Rezeptor Typ 3, Synonyme: Mac-1, OX-42
DAB	3,3' Diaminobenzidin
DMF	Dimethylformamid
DNA	desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	entorhinal cortex lesion (entorhinale Kortexläsion)
FCS	fetal calf serum (fetales Kälberserum)
FITC	Flourescein-Isothiocyanat
g	Gramm
GFAP	glial fibrillary acidic protein
IB4	Isolektin B4
Iba1	ionisierendes Calcium-bindendes Adaptorprotein 1
iC3b	inaktivierter Faktor C3b des Komplementsystems

Ig	Immunglobulin
Kap.	Kapitel
kg	Kilogramm
KLH	keyhole limpet hemocyanin
Mac-1	Komplement-Rezeptor Typ 3, Synonyme: CR3, OX-42
MAF	Macrophage Activation Factor (Makrophagen/Mikroglia Aktivierungsfaktor)
MBS	m-Maleimidobenzoyl-N-Hydroxysuccinimid-Ester
µg	Mikrogramm
mg	Milligramm
MHCII	major histocompatibility complex II (Haupt-Gewebehistokompatibilitäts-Komplex Klasse II)
min	Minute
ml	Milliliter
µm	Mikrometer
mRNA	messenger ribonucleic acid
NCBI	Nationales Center für Biotechnologie Information
NGS	normal goat serum
NIH	National Institutes of Health
nm	Nanometer
OX-42	Komplement-Rezeptor Typ 3, Synonyme: CR3, Mac-1
PB	phosphate buffer (Phosphatpuffer)
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase-Ketten-Reaktion)

RCA-1	ricinus communis agglutinin-1
RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT-PCR	Reverse-Transkriptions-Polymerase-Ketten-Reaktion
TPA	12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Azetat
TRITC	Tetramethyl-Rhodamin-Isothiocyanat
V	Volt
ZNS	Zentrales Nervensystem

DANKSAGUNG

Ich danke an allererster Stelle meinem Doktorvater Professor Robert Nitsch herzlich für seine Unterstützung und Förderung. Von Herzen möchte ich mich bei Professor Uwe Heinemann, dem Leiter des Graduiertenkollegs „Schadensmechanismen im Nervensystem“ GRK 238, für seine immerwährende Unterstützung und seine kompetente Beratung in jeglichen Fragen bedanken. Ich hatte das Glück gleich drei Betreuer in der Zeit meiner Doktorarbeit zu haben, die mich jeweils mit ihrer Expertise und Kompetenz nachhaltig beeindruckt haben. Ich danke Olaf Ninnemann für all die molekularbiologischen und forschungs- und lebensbezogenen Lehrstunden! Ohne Dich wäre dieses Projekt nie zustande gekommen. Vielen Dank vor allem für das viele gemeinsame Lachen und Deinen unschlagbaren Humor mit dem Du den Laboralltag immer erhellt hast- und auch die vielen methodischen Frustrationen wettgemacht hast. Thomas Jöns ganz herzlichen Dank für seine Betreuung und Anleitung während des gesamten „Antikörperteils“ meiner Doktorarbeit. Vielen Dank für all Deine Zeit und Deine immer geduldigen Erklärungen. Ein dickes Dankeschön natürlich auch an den Letztautor meines Papers Sven, der nicht nur Anschlussprojekte an meine Doktorarbeit betreut hat, sondern der auch in der Phase des „Zusammenschreibens“ sowohl vom Paper als auch von der Doktorarbeit eine unentbehrliche Hilfe war und der mit Exzellenz die Nachforderungen von Glia sowie die Organisation vor Ort übernommen hat. Vielen Dank außerdem für Deine sorgfältige Korrektur dieser Arbeit!

Ich danke den TA's, die mir mit ihrer Kompetenz bei alltäglichen Detailfragen zur Seite gestanden haben und die mir soviel beigebracht haben: Carola Meier, Jaqueline Mahlo, Sabine Winkler und Frau Hildebrandt. Dr. Martina Plaschke danke ich ganz herzlich für ihre perfekte Organisation des Tierstalls. Der unentbehrlichen immer perfekt organisierten und stets herzlichen Marni Pollich möchte ich für die unzähligen Male danken, die sie mir mit Rat und Tat bei organisatorischen Problemen zur Seite gestanden hat. Dr. Katrin Schulze, der Koordinatorin des Graduiertenkollegs, danke ich ebenfalls sehr herzlich für ihre Hilfe. Vielen Dank an Karl Roth, der die Computer und das Netzwerk am Laufen hält und allen mit Witz bei technikassoziierten Problemen zur Seite steht. Dank gebührt darüber hinaus „meinen“ Kurzzeitpraktikanten Björn Eilers und

Agnieszka. Leman Mutlu und Adam Kovac danke ich für ihre Expertise und tatkräftige Unterstützung bei den entorhinalen Kortextläsionen. Antje Diestel und Oliver Ullrich danke ich für ihre Beiträge zu unserem gemeinsamen Paper und damit zu diesem MAF Projekt. Darüber hinaus möchte ich in alphabetischer Reihenfolge Martin Beyer, Antje Diestel, Ines Häke, Bernd Heimrich, Erik Kwidzinski, Angelika Rappert, Daniel Richter, Eva Simbürger, Laura Spilker, Andreas Steup, Oliver Ullrich und Susanne Wolf für zahlreiche gemeinsam genossene Kaffeetassen und produktive, interessante und lustige Raucherpausen (auch mit Nichtrauchern) danken, mit Euch hat das Arbeiten wirklich Spaß gemacht und Euer Rat war unentbehrlich. Ingo Bechmann danke ich außerdem für seine Beratung in allen histologischen Fragen. Meinem Vertrauensdozenten der Studienstiftung Professor Felix Herzog danke ich für seine Begleitung. Ich danke von Herzen Juanita Nunez, die durch ihre freundschaftliche stundenweise Betreuung meiner Tochter Kea das Schreiben dieser Arbeit wesentlich unterstützt hat. Thank you so much, Juanita!

All meinen Freunden, die mein ständiges im Labor beschäftigt sein mit Geduld ertragen und (teilweise) sogar unterstützt haben, sei außerdem von Herzen gedankt. Das Segeln, die vielen Treffen in (labornahen) Café's (manchmal in langen Inkubationszeiten) und Ausgehen und Feiern mit Euch, auch auf spontane Sofort-Verabredung hin, war genau der Ausgleich, den ich brauchte!

Vielen Dank an meine Mutter und meinen Vater, die mir soviel ermöglicht haben und mit auf den Weg gegeben haben! Ein großes Dankeschön an meine Großeltern und an die gesamte Familie Böttcher für ihre Unterstützung, ihr immerwährendes Interesse und ihren Stolz. Meiner Tochter Kea und dem noch ungeborenen Baby in meinem Bauch danke ich, dass es sie gibt, und für all die Zeit, die ihr auf mich verzichten mussten und in der Mama lieber am Computer gesessen hat, als sich mit euch zu beschäftigen. Meinem Mann Jan, der mich in jedem meiner Schritte voll unterstützt hat, immer an mich glaubt und ohne dessen Wochendendschichten und bereitwilligen Einspringdienste diese Arbeit nie in dieser Zeit geschrieben hätte werden können, danke ich mit meinem ganzen Herzen. Ich bin sehr glücklich und dankbar, mit Dir zusammen durch unser Leben gehen zu dürfen!

LEBENS LAUF

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mitveröffentlicht.

Publikationen

Research Papers **Lünemann A**, Ullrich, O, Diestel A, Jöns T, Ninnemann O, Kovac A, Pohl EE, Hass R, Nitsch R, Hendrix, S :
Macrophage/Microglia Activation Factor Expression is Restricted to Lesion-Associated Microglial Cells Following Brain Trauma. *Glia*. 2006 Mar; 53(4):412-9.

Lünemann JD, **Klötting A**, Bohner G, Katchanov J, Klingebiel R, Zschenderlein R (eingereicht): *A tumor-like lower brainstem lesion associated with pulmonary sarcoidosis*.

Glumm R, **Klötting A**, Heimrich B (2002): Development of Axonal Projections in Cocultures of the Hippocampal Formation Visualized with Actin-gfp Transgenic Slices. *Neuroembryology* 2002;1:17-22 (DOI: 10.1159/000051018).

Abstracts

Müller-Röver S, **Klötting A**, Diestel A, Jöns T, Ninnemann O, Pohl EE, Nitsch R (2004): Macrophage/Microglia Activation Factor (MAF) Expression is Restricted to a Subgroup of Macrophages/Microglia Cells after Brain Trauma, Program No. 820.9. *2004 Abstract Viewer/Itinerary Planner*. Washington, DC: Society for Neuroscience, 2004 [indexed for MedLine].

Klötting A, Jöns T, Ninnemann O, Nitsch R (2002): Identification of a Molecule with Hemolytic Properties in Activated Macrophages/Microglial Cells in the Lesioned Brain, Program No. 101.4. *2002 Abstract Viewer/Itinerary Planner*. Washington, DC: Society for Neuroscience [indexed for MedLine].

Erklärung

„Ich, Anna M. Lünemann, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Identifizierung und Charakterisierung des Makrophagen/ Mikroglia Aktivierungsfaktors im geschädigten Hippocampus“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“